



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

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

(11)



1-0041479

(51)⁷ C07K 16/18

(13) B

-
- (21) 1-2018-06065 (22) 13/06/2017
(86) PCT/US2017/037226 13/06/2017 (87) WO 2017/218515 A1 21/12/2017
(30) 62/349,705 14/06/2016 US; 62/405,561 07/10/2016 US; 62/422,107 15/11/2016 US
(45) 25/10/2024 439 (43) 25/06/2019 375A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, United States of America
(72) HU, Ying (AU); LATUSZEK, Adrianna (US); ROMANO, Carmelo (US); OLSON, William (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)
-

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN YẾU TỐ BỔ SUNG 5 (C5)
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng mà gắn kết với protein yếu tố bổ sung 5 (C5), và phương pháp sử dụng kháng thể này. Theo các phương án khác nhau của sáng chế, các kháng thể này là các kháng thể hoàn toàn của người mà gắn kết với C5 protein. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để ức chế hoặc làm trung hoà hoạt tính C5, do đó tạo ra phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn liên quan đến C5 ở người. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng C5 mà có các đặc tính dược động học và dược lực học được cải thiện, ví dụ nửa chu kỳ phân rã nhiều hơn 10 ngày.

Tham chiếu đến các đơn sáng chế có liên quan

Đơn này được nộp vào ngày 13 tháng 6 năm 2017 dưới dạng đơn quốc tế và yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ đơn Mỹ tạm thời số 62/349,705, nộp ngày 14 tháng 6 năm 2016; 62/405,561, nộp ngày 7 tháng 7 năm 2016; và 62/422,107 được nộp ngày 15 tháng 1 năm 2016, phần mô tả của từng đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể liên kết đặc hiệu với yếu tố bổ thể C5, và phương pháp điều trị và chẩn đoán sử dụng các kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ thống bổ thể là nhóm protein của protein huyết tương mà khi được hoạt hóa thì dẫn đến quá trình làm tan tế bào đích và hỗ trợ quá trình phân giải đại thực bào thông qua việc opsonin hóa. Bổ thể được hoạt hóa thông qua một loạt các bước phân giải protein bằng ba con đường chính: con đường cổ điển, mà thường được hoạt hóa bởi các phức hợp miễn dịch, một con đường khác mà được tạo ra bởi các bề mặt tế bào không được bảo vệ và con đường lectin liên kết mannoza. Cả ba con đường thuộc thác bổ thể này đều tập trung vào việc phân cắt phân giải protein của thành phần bổ thể 5 (complement component 5 - C5) dẫn đến việc tạo ra các mảnh C5a và C5b, một quy trình mà cần thiết trong quá trình hoạt hóa thác bổ thể nêu trên. C5a có thể tạo ra các đáp ứng sinh lý đa hướng thông qua việc liên kết với các thụ thể của nó (Monk *et al* 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 429-448). C5a là một yếu tố trung gian tiền viêm tiềm ẩn mà tạo ra sự di chuyển hóa hướng hóa chất, tăng cường sự bám dính của tế bào, kích thích việc đốt cháy oxy hóa, và gây giải phóng nhiều chất trung gian gây viêm khác nhau như histamin hoặc các cytokin. C5b điều hòa sự hình thành của các phức hợp tấn công màng (membrane-attack complex – MAC), hoặc C5b-9) dẫn đến việc làm tan tế bào trong các pha muộn của quá trình gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC). Hơn thế nữa, trong các tế bào có nhân mà kháng được quá trình làm tan tế bào này bằng C5b-9, các lượng dưới mức làm tan tế bào của C5b-

9 có thể gây hoạt hóa tế bào mà dẫn đến sự tăng sinh tế bào, tạo ra các chất trung gian tiền viêm và sản sinh ra nền ngoại bào.

Các kháng thể đơn dòng kháng C5 là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả, ví dụ, trong các patent/công bố đơn Mỹ số 9206251, 9107861, 9079949, 9051365, 8999340, 8883158, 8241628, 7999081, 7432356, 7361339, 7279158, 6534058, 6355245, 6074642, 20160299305, 20160051673, 20160031975, 20150158936, 20140056888, 20130022615, 20120308559, và trong WO2015198243, WO2015134894, WO2015120130, EP2563813B1, EP2328616B1, và EP2061810B1.

Các kháng thể hoàn chỉnh ở người liên kết đặc hiệu với protein C5 với ái lực cao và có đặc tính dược động học được cải thiện có thể đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa và điều trị nhiều bệnh khác nhau gắn với C5 (ví dụ, hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết đặc hiệu với yếu tố bổ thể protein 5 (C5). Các kháng thể theo sáng chế có tác dụng để, *ngoài các tác dụng khác*, ức chế hoặc trung hòa hoạt tính của protein C5. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này có tác dụng ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu của bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 ở đối tượng. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này có thể được dùng với mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị cho đối tượng đã mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh hoặc rối loạn gắn với C5. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 là các kháng thể hoàn chỉnh ở người liên kết với C5 với ái lực cao và có đặc tính dược động học (pharmacokinetic - PK) và dược lực học (pharmacodynamic - PD) được cải thiện. Các kháng thể có PK/PD cải thiện có thể được dùng để cung cấp hiệu lực ưu việt hơn, cùng với số lần dùng liều ít ở đối tượng mắc bệnh hoặc rối loạn gắn với C5.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ bao gồm phần liên kết kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂ hoặc scFv), và có thể được cải biến để tác động đến chức năng, ví dụ, làm tăng thời gian lưu lại trong vật chủ hoặc loại bỏ được các chức năng tác động dư thừa

(Reddy *et al.*, 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này có thể có tính đặc hiệu kép.

Theo khía cạnh đầu tiên, sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp đã phân lập hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với protein C5. Theo một số phương án, các kháng thể này là các kháng thể đơn dòng hoàn chỉnh ở người.

Các kháng thể kháng C5 ví dụ theo sáng chế được liệt kê trong các bảng 1 và 2 ở đây. Bảng 1 nêu các mã định danh trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), và vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng C5 ví dụ. Bảng 2 nêu các mã định danh trình tự axit amin của HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 các kháng thể kháng C5 chẳng hạn.

Sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ bất kỳ trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm LCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) bao gồm bất kỳ trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1 được ghép cặp với trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm Cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nằm trong kháng thể kháng C5 bất kỳ ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 98/114, 122/106, 98/130, 138/106, 146/106, 122/130, 146/114, 146/130, 138/130, 154/162, 170/178, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258,

266/258, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, và 338/346. Theo một số phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ một trong số SEQ ID NO: 50/58 (ví dụ, H4H12161P), 98/106 (ví dụ, H4H12166P), 138/106 (ví dụ, H4H12166P5), hoặc 202/210 (ví dụ, H4H12170P). Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm HCVR và LCVR, HCVR nêu trên bao gồm trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có không nhiều hơn năm thay thế axit amin, và LCVR nêu trên bao gồm trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có không nhiều hơn hai thay thế axit amin. Ví dụ, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm HCVR và LCVR, HCVR nêu trên bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 98 có không nhiều hơn năm thay thế axit amin, và LCVR nêu trên bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 106 có không nhiều hơn hai thay thế axit amin. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm HCVR và LCVR, HCVR nêu trên bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 98 có ít nhất là một thay thế axit amin, và LCVR nêu trên bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 106 có một thay thế axit amin.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) bao gồm trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) bao gồm trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) bao gồm trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) bao gồm trình tự axit amin được chọn từ các trình tự axit amin LCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% mức độ đồng nhất về trình tự.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) bao gồm trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) bao gồm trình tự axit amin được chọn từ bất kỳ trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần tương tự của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% mức độ đồng nhất về trình tự.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm cặp trình tự axit amin HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3) bao gồm trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1 được ghép cặp với bất kỳ trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 nằm trong kháng thể kháng C5 bất kỳ ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 56/64 (ví dụ, H4H12161P), 104/112 (ví dụ, H4H12166P), 144/112 (ví dụ, H4H12166P5), và 208/216 (ví dụ, H4H12170P).

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCVR và LCVR, HCVR nêu trên bao gồm HCDR1 bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin. Theo một số phương án nhất định, sáng chế

đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCVR và LCVR, LCVR nêu trên bao gồm LCDR1 bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 bởi 1 axit amin. Ví dụ, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCVR và LCVR, HCVR nêu trên bao gồm HCDR1 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 100 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 100 bởi 1 axit amin, HCDR2 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 102 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 102 bởi 1 axit amin, và HCDR3 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 104 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 104 bởi 1 axit amin. Theo phương án ví dụ khác, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm HCVR và LCVR, LCVR nêu trên bao gồm LCDR1 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 108 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 108 bởi 1 axit amin, LCDR2 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 110 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 110 bởi 1 axit amin, và LCDR3 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 112 hoặc trình tự axit amin khác với SEQ ID NO: 112 bởi 1 axit amin.

Sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 353, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 354, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 353, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 90%; và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin

SEQ ID NO: 354, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 90%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm một bộ gồm sáu CDR (*nghĩa là*, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) nằm trong kháng thể kháng C5 bất kỳ ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án nhất định, bộ trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 52-54-56-60-62-64 (*ví dụ*, H4H12161P), 100-102-104-108-110-112 (*ví dụ*, H4H12166P), 140-142-144-108-110-112 (*ví dụ*, H4H12166P5), và 204-206-208-212-214-216 (*ví dụ*, H4H12170P).

Theo một phương án liên quan, sáng chế đề xuất các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm một bộ gồm sáu CDR (*nghĩa là*, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được xác định bằng kháng thể kháng C5 bất kỳ ví dụ được liệt kê trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, bao gồm bộ trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 50/58 (*ví dụ*, H4H12161P), 98/106 (*ví dụ*, H4H12166P), 138/106 (*ví dụ*, H4H12166P5), hoặc 202/210 (*ví dụ*, H4H12170P). Các phương pháp và các kỹ thuật để xác định các CDR nằm trong Các trình tự axit amin HCVR và LCVR là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng để xác định các CDR nằm trong các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR đã nêu cụ thể được mô tả ở đây. Ví dụ các quy ước có thể được sử dụng để xác định đường biên giới của các CDR bao gồm, *ví dụ*, quy ước xác định Kabat, quy ước xác định Chothia, và quy ước xác định AbM. Thông thường, quy ước xác định Kabat dựa trên tính biến thiên của trình tự, quy ước xác định Chothia dựa trên vị trí của các vùng vòng trong cấu trúc, và quy ước xác định AbM là dạng kết hợp giữa các tiếp cận theo quy ước Kabat và quy ước 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); và Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu đã công bố cũng có sẵn để xác định trình tự CDR trong một kháng thể.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với C5, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm ba vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (CDR) (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó HCVR này bao gồm: (i) trình tự axit amin SEQ ID NO: 98, (ii) trình tự axit amin giống ít nhất là 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 98, (iii) trình tự axit amin giống ít nhất là 95% trình tự nêu trong SEQ ID NO: 98; hoặc (iv) trình tự axit amin SEQ ID NO: 98 có không nhiều hơn 5 thay thế axit amin; và LCVR này bao gồm: (i) trình tự axit amin SEQ ID NO: 106, (ii) trình tự axit amin giống ít nhất là 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 106, (iii) trình tự axit amin giống ít nhất là 95% trình tự nêu trong SEQ ID NO: 106; hoặc (iv) trình tự axit amin SEQ ID NO: 106 có không nhiều hơn 5 thay thế axit amin.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 có mô hình glycosyl hóa cải biến. Theo một số phương án, việc cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể hữu ích, hoặc kháng thể thiếu nhóm fucoza có mặt trên chuỗi oligosacarit, ví dụ, để làm tăng chức năng ADCC (xem tài liệu: Shield *et al.* (2002) JBC 277:26733). Trong các ứng dụng khác, việc cải biến galactosyl hóa có thể được tạo ra để cải biến chức năng CDC.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà biểu hiện việc liên kết C5 phụ thuộc độ pH. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết với C5 với ái lực cao hơn ở độ pH trung tính so với ở độ pH axit (*nghĩa là*, khả năng liên kết giảm ở độ pH axit).

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà thể hiện các đặc điểm dược động học và dược lực học được cải thiện, ví dụ, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 mà có thời gian bán hủy trong huyết thanh dài. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 theo sáng chế có nồng độ trong huyết thanh của C5 ở chuột được làm giống người lớn hơn 10 µg/mL lên tới 40 ngày. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể kháng C5

theo sáng chế phong bế quá trình tan huyết của CP- và AP lên tới 35 ngày khi dùng C5 ở chuột được làm giống người.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng cạnh tranh liên kết đặc hiệu với C5 với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó HCVR và LCVR từng vùng có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng cạnh tranh chéo để liên kết với C5 với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó HCVR và LCVR từng vùng có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với cùng epitop với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó HCVR và LCVR từng vùng có trình tự axit amin được chọn từ các trình tự HCVR và LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với cùng epitop với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng bao gồm các CDR của HCVR và các CDR của LCVR, trong đó cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có SEQ ID NO: 98/106.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với một hoặc nhiều các gốc axit amin nằm trong chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta của C5. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với một hoặc nhiều axit amin trong chuỗi alpha của C5 và một hoặc nhiều axit amin trong chuỗi beta của C5. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với một hoặc nhiều axit amin trong các chuỗi alpha và beta của C5, trong đó các kháng thể này không liên kết với miền C5a anaphylatoxin. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong C5 ở người (SEQ ID

NO: 359). Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong C5 ở người (SEQ ID NO: 359), trong đó các kháng thể này không liên kết với miền C5a anaphylatoxin của C5. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (a) các axit amin 591 đến 599 của SEQ ID NO: 359; (b) các axit amin 593 đến 599 của SEQ ID NO: 359; (c) các axit amin 775 đến 787 của SEQ ID NO: 359; (d) các axit amin 775 đến 794 của SEQ ID NO: 359; và (e) các axit amin 779 đến 787 của SEQ ID NO: 359. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong SEQ ID NO: 359, ví dụ, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với ít nhất là 5 axit amin, ít nhất là 10 axit amin, hoặc ít nhất là 15 axit amin nằm trong SEQ ID NO: 361. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong SEQ ID NO: 359, ví dụ, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với ít nhất là 5 axit amin nằm trong SEQ ID NO: 360. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với ít nhất là 5 axit amin nằm trong SEQ ID NO: 360 và 361. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với trình tự axit amin SEQ ID NO: 360 (tương ứng với các axit amin 591 đến 599 của SEQ ID NO: 359) và với trình tự axit amin SEQ ID NO: 361 (tương ứng với các axit amin 775 đến 794 của SEQ ID NO: 359).

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có thể liên kết đặc hiệu với C5 theo cách chủ vận, nghĩa là, nó có thể tăng cường hoặc kích thích việc liên kết và/hoặc hoạt tính đối với C5; theo các phương án khác, kháng thể có thể liên kết đặc hiệu với C5 theo cách đối kháng, nghĩa là nó có thể phong bế việc liên kết và/hoặc hoạt tính đối với C5.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể đã phân lập và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế việc C5 liên kết với C5 convertase. Theo một số phương

án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế việc C5 liên kết với C5 convertaza có thể liên kết với cùng epitop trên C5 với C5 convertaza hoặc có thể liên kết với epitop khác trên C5 với C5 convertaza. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế liên kết của C5 với C5 convertaza ở khi.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của sáng chế có tính đặc hiệu kép bao gồm tính đặc hiệu liên kết thứ nhất với epitop thứ nhất của protein C5 và tính đặc hiệu liên kết thứ hai với epitop thứ hai của protein C5 trong đó các epitop thứ nhất và thứ hai là khác nhau và không chồng lấp lên nhau.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này và các mảnh liên kết kháng nguyên của sáng chế liên kết với C5a với IC_{50} nhỏ hơn 0,5nM. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này bao gồm HCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 290, 306, 322, và 338. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này bao gồm LCVR bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 298, 314, 330, và 346.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) là kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người; (b) liên kết với C5 ở người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 0,9nM ở 25°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (c) liên kết với C5 ở người với K_D nhỏ hơn 0,3nM ở 37°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (d) liên kết với C5 ở khi với K_D nhỏ hơn 65nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (e) liên kết với biến thể R885H của C5 ở người (SEQ ID NO: 356) với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (f) liên kết với biến thể R885C của C5 ở người (SEQ ID NO: 357) với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (g) phong bế quá trình tan huyết thông qua con đường cổ điển qua trung gian C5 ở người (CP) hơn 95% và với IC_{50} nhỏ hơn 6nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết CP; (h) phong bế quá trình tan huyết thông qua con đường thay thế qua trung gian C5 ở người (AP) hơn 70% và với IC_{50} nhỏ hơn 165nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP; (i) ức chế quá trình tan huyết CP qua trung

gian C5 ở khí xanh Châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 185nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết CP; (j) ức chế quá trình tan huyết AP qua trung gian C5 ở khí xanh Châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 235nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP; (k) ức chế quá trình tan huyết CP qua trung gian C5 ở khí đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 145nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết CP; và (l) ức chế quá trình tan huyết AP qua trung gian C5 ở khí đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 30nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng C5 đơn dòng tái tổ hợp đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) bao gồm một bộ gồm sáu CDR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 100-102-104-108-110-112; (b) liên kết với C5 ở người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 0,2nM ở 25°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (c) liên kết với C5 ở người với K_D nhỏ hơn 0,3nM ở 37°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (d) liên kết với biến thể của C5 ở người (R885H) với K_D nhỏ hơn 0,4nM ở 37°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (e) ức chế quá trình tan huyết qua trung gian là con đường cổ điển (CP) của huyết thanh người với IC_{50} nhỏ hơn 3nM; (f) ức chế quá trình tan huyết qua trung gian là con đường thay thế (AP) của huyết thanh người với IC_{50} nhỏ hơn 27nM; (g) ức chế quá trình tan huyết qua trung gian CP của huyết thanh khỉ với IC_{50} nhỏ hơn 21nM; (g) ức chế quá trình tan huyết qua trung gian AP của huyết thanh khỉ với IC_{50} nhỏ hơn 10nM; (h) có thời gian bán hủy ($t_{1/2}$) lớn hơn 10 ngày ở chuột có C5 được làm giống người; (i) có nồng độ trong huyết thanh lớn hơn 10 $\mu\text{g/mL}$ cho tới tận ngày thứ 40 khi dùng C5 ở chuột được làm giống người; (j) phong bế quá trình tan huyết qua trung gian CP cho tới tận ngày thứ 50 ở chuột có C5 được làm giống người; và (k) liên kết với một hoặc nhiều axit amin nằm trong chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta của SEQ ID NO: 359, trong đó kháng thể không liên kết với miền C5a anaphylatoxin của C5.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa các kháng thể kháng C5 hoặc các phần của chúng. Ví dụ, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa bất kỳ trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự

gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic HCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic HCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa các trình tự axit amin LCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic LCDR1 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic

LCDR2 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa bất kỳ trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1; theo các phương án nhất định phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic LCDR3 bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các phân tử axit nucleic mã hóa HCVR, trong đó HCVR này bao gồm một bộ gồm ba CDR (*nghĩa là*, HCDR1-HCDR2-HCDR3), trong đó bộ trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3 này là như được xác định bằng kháng thể kháng C5 bất kỳ ví dụ được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa LCVR, trong đó LCVR này bao gồm một bộ gồm ba CDR (*nghĩa là*, LCDR1-LCDR2-LCDR3), trong đó bộ trình tự axit amin LCDR1-LCDR2-LCDR3 là như được xác định bằng kháng thể kháng C5 bất kỳ ví dụ được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cả HCVR và LCVR, trong đó HCVR này bao gồm trình tự axit amin của trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, và trong đó LCVR này bao gồm trình tự axit amin của trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic này bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ các trình tự axit nucleic HCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 các trình tự axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1, hoặc trình tự gần tương tự của nó có mức độ đồng nhất 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 nhất định theo khía cạnh này của sáng chế, phân tử axit nucleic này mã hóa HCVR và LCVR, trong đó HCVR và LCVR cả hai đều thu được từ cùng kháng thể kháng C5 được liệt kê trong Bảng 1.

Theo phương án liên quan, sáng chế đề xuất các vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng C5. Ví dụ, sáng chế bao gồm các vector biểu hiện tái tổ hợp bao gồm

các phân tử axit nucleic bất kỳ đã nêu trên, *nghĩa là*, các phân tử axit nucleic mã hóa bất kỳ HCVR này, LCVR, và/hoặc CDR các trình tự như nêu trong Bảng 2. Cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế là các tế bào chủ mà được kết hợp các vector nêu trên, cũng như các phương pháp sản xuất các kháng thể này hoặc các phần của chúng bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ này trong các điều kiện cho phép sản xuất các kháng thể này hoặc các mảnh kháng thể, và thu hồi các kháng thể này và các mảnh kháng thể được tạo ra như vậy.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm lượng cho hiệu quả điều trị của ít nhất là một kháng thể đơn dòng tái tổ hợp hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết đặc hiệu với C5 và chất mang dược dụng. Theo phương án liên quan, sáng chế đề xuất được phẩm mà là hỗn hợp của kháng thể kháng C5 và chất trị liệu thứ hai. Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai này là chất bất kỳ mà được kết hợp theo cách thuận lợi với kháng thể kháng C5. Ví dụ các chất mà có thể được kết hợp theo cách thuận lợi với kháng thể kháng C5 bao gồm, không giới hạn ở, các chất khác mà liên kết với và/hoặc ức chế hoạt tính C5 (bao gồm các kháng thể khác hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, v.v.) và/hoặc các chất mà không liên kết trực tiếp với C5 nhưng tuy nhiên điều trị hoặc làm giảm ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu bệnh hoặc rối loạn gắn với C5. Các liệu pháp kết hợp khác và các dược phẩm cùng dùng liên quan đến các kháng thể kháng C5 theo sáng chế được mô tả trong phần bất kỳ ở đây.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 ở đối tượng bằng cách sử dụng kháng thể kháng C5 hoặc phần liên kết kháng thể của kháng thể theo sáng chế, trong đó phương pháp trị liệu bao gồm việc dùng lượng cho hiệu quả điều trị của dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế cho đối tượng có nhu cầu. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc rối loạn bất kỳ mà được cải thiện, làm giảm, ức chế hoặc bị ngăn chặn bằng cách ức chế hoạt tính C5. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp để ngăn chặn, điều trị hoặc làm giảm ít nhất là một triệu chứng của hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình (aHUS), phương pháp này bao gồm việc dùng lượng cho hiệu quả điều trị của kháng thể kháng C5 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế cho đối tượng có nhu

cầu. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp làm giảm hoặc giảm bớt mức độ trầm trọng của ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu của bệnh Bệnh tiểu huyết sắc tố kịch phát về đêm (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - PNH) ở đối tượng bằng cách dùng kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có thể được dùng với mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị cho đối tượng đã mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh hoặc rối loạn gắn với C5. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng sáng chế được dùng kết hợp với chất trị liệu thứ hai cho đối tượng có nhu cầu. Chất trị liệu thứ hai này có thể được chọn từ nhóm gồm có được chất chống viêm (như các corticosteroid, và các dược chất chống viêm không steroid), kháng thể khác kháng protein C5, thực phẩm bổ sung như các chất chống oxy hóa và được chất hoặc liệu pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án nhất định, chất trị liệu thứ hai này có thể là chất mà giúp triệt tiêu hoặc giảm bớt (các) tác dụng phụ bất kỳ có thể xuất hiện gắn với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế, nếu (các) tác dụng phụ này sẽ xuất hiện. Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được dùng dưới da, trong tĩnh mạch, trong da, trong màng bụng, qua đường miệng hoặc trong cơ. Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được dùng ở liều khoảng 0,1 mg/kg cân nặng cơ thể đến khoảng 100 mg/kg cân nặng của cơ thể đối tượng. Theo một số phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng ở một hoặc nhiều liều bao gồm từ 50mg đến 600mg.

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng C5 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn mà sẽ có lợi từ việc phong bế liên kết và/hoặc hoạt tính của C5.

Các phương án khác sẽ trở lên rõ ràng khi xem xét phần mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các mức ức chế C5a của kháng thể kháng C5 H4H12166P theo cách phụ thuộc liều, như được xác định bằng ELISA (được mô tả trong Ví dụ 9 ở đây).

Fig.2 thể hiện tổng nồng độ trong huyết thanh theo thời gian sau khi tiêm trong tĩnh mạch một liều đơn 15 mg/kg của H4H12166P, H4H12161P, hoặc chất so sánh 2 cho các con khi đầu chó cái (được mô tả trong Ví dụ 10 ở đây). Profin nồng độ theo thời

gian được dựng đồ thị điểm từ liều dùng sau lần thứ nhất dưới giới hạn của kết quả định lượng (below the limit of quantitation - BLQ), nếu có thể áp dụng, mà được nhập vào là LLOQ/2. Mỗi điểm số liệu là giá trị trung bình ($\pm$ SD) ($n = 4$ con khi/nhóm); các nồng độ được coi là bị ảnh hưởng bởi ADA được loại trừ khỏi 1 con trong nhóm H4H12166P và 1 con ở nhóm H4H12161P lần lượt bắt đầu ở ngày thứ 36 và ngày thứ 29. LLOQ = giới hạn định lượng dưới

Fig.3 thể hiện mức độ tan huyết tính bằng % theo thời gian trong thử nghiệm con đường cổ điển tế bào máu đỏ ex vivo (A) và (B) con đường thay thế sau khi tiêm trong tĩnh mạch một liều đơn của H4H12166P, H4H12161P hoặc Chất so sánh 2 cho các con khi cái đầu chó. % tan huyết, được tính là tỷ lệ tan thử nghiệm so với cực đại với % làm tan nền được trừ đi từ cả hai giá trị này, là % so với lượng C5 bị ức chế bởi kháng thể kháng C5 cụ thể có mặt trong huyết thanh ở một thời điểm nhất định. Mỗi điểm số liệu là giá trị trung bình ($\pm$ SD).

Fig.4 thể hiện profin tổng nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của các kháng thể kháng C5 đã chọn kháng C5 ở chuột được làm giống người (được mô tả trong Ví dụ 11 ở đây). Chuột mang C5 được làm giống người được dùng liều đơn dưới da 15 mg/kg của H4H12166P, Chất so sánh 1 hoặc Chất so sánh 2. Mỗi điểm số liệu là giá trị trung bình $\pm$ s.e.m. ($n = 4-5$ mỗi nhóm). Nồng độ của kháng thể trong huyết thanh được theo dõi 1, 10, 20, 30 và 40 ngày sau khi tiêm sử dụng ELISA bán kẹp.

Fig.5 thể hiện mức độ tan huyết tính bằng % theo thời gian trong thử nghiệm tan huyết theo con đường cổ điển bổ trợ của các kháng thể kháng C5 đã chọn kháng C5 ở chuột được làm giống người. Chuột mang C5 được làm giống người được dùng liều đơn dưới da 15 mg/kg của H4H12166P, Chất so sánh 1 hoặc Chất so sánh 2. Mỗi điểm số liệu là giá trị trung bình $\pm$ s.e.m. ($n = 4-5$ mỗi nhóm). Mức độ tan huyết tính theo % được theo dõi ở các thời điểm trước khi dùng, 10, 20, 30, 40 và 50 ngày sau khi tiêm. Mức độ tan huyết tính bằng %, được tính là tỷ lệ tan thử nghiệm so với cực đại với % làm tan nền được trừ đi từ cả hai giá trị này, so với lượng C5 ức chế bởi kháng thể kháng C5 cụ thể có mặt trong huyết thanh ở một thời điểm nhất định.

Fig.6 thể hiện profin tổng nồng độ trong huyết thanh theo thời gian của các kháng thể kháng C5 đã chọn kháng C5 ở chuột được làm giống người (được mô tả trong Ví dụ 11 ở đây). Các con chuột này được dùng liều đơn dưới da 15 mg/kg H4H12166P,

H4H12161P, Chất so sánh 1 hoặc đối chứng isotyp IgG4^P. Mỗi điểm số liệu là giá trị trung bình $\pm$ s.e.m. (n = 5 mỗi nhóm). Các mức kháng thể trong huyết thanh được theo dõi 6 giờ, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 30, 45 và 59 ngày sau khi tiêm sử dụng ELISA bán kép.

Fig.7 là đồ thị thể hiện điểm số trong chụp cắt lớp kết hợp quang học (optical coherence tomography - OCT) ở chuột được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc bằng kháng thể kháng -C5, M1M17628N ở 10 mg/kg hoặc 50 mg/kg (được mô tả trong Ví dụ 14 ở đây). ****p<0,0001, điều trị ANOVA hai chiều bằng kháng thể kháng C5 ở 50 mg/kg so với khi không điều trị hoặc điều trị bằng đối chứng isotyp.

Fig.8 thể hiện ức chế quá trình tan huyết theo con đường cổ điển bằng kháng thể kháng C5 M1M17628N khi không có mặt C3 (**A**); và khi có mặt 80 μ g/mL C3 ở người (**B**) (được mô tả trong Ví dụ 14 ở đây).

Fig.9 thể hiện số đếm cụm tế bào ở chuột có C5 được làm giống người được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc bằng kháng thể kháng C5 ở người H4H12170P ở 10 mg/kg hoặc 50 mg/kg (được mô tả trong Ví dụ 15 ở đây). n=8-12 con cho mỗi nhóm.

Fig.10 là đồ thị thể hiện điểm số OCT ở chuột có C5 được làm giống người, được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc bằng kháng thể kháng -C5 ở người H4H12170P ở 10 mg/kg hoặc 50 mg/kg (được mô tả trong Ví dụ 15 ở đây). n=8-12 con cho mỗi nhóm.

Fig.11 đồ thị thể hiện điểm số OCT ở chuột có C5 được làm giống người, được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc bằng kháng thể kháng -C5 ở người H4H12166P ở 3 mg/kg hoặc 10 mg/kg, hoặc Chất so sánh 2 ở 10 mg/kg. n=6-12 con cho mỗi nhóm. (được mô tả trong Ví dụ 15 ở đây).

Fig.12 thể hiện số đếm cụm tế bào ở chuột có C5 được làm giống người được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc bằng kháng thể kháng C5 ở người H4H12166P ở 3 mg/kg hoặc 10 mg/kg, hoặc Chất so sánh 2 ở 10 mg/kg. n=6-12 con cho mỗi nhóm (được mô tả trong Ví dụ 15 ở đây).

Fig.13 là đường cong sống sót của chuột NZBWF1 được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc bằng các kháng thể kháng C5 M1M17628N hoặc M1M17627N (được mô tả trong Ví dụ 17 ở đây).

Fig.14 thể hiện các mức của (**A**) albumin trong nước tiểu và (**B**) albumin trong nước tiểu được chuẩn hóa theo creatinin trong nước tiểu ở chuột NZBWF1 được điều trị

bằng đối chứng isotyp hoặc bằng các kháng thể kháng C5 M1M17628N hoặc M1M17627N (được mô tả trong Ví dụ 17 ở đây).

Fig.15 thể hiện các mức nitơ ure trong máu ở chuột NZBWF1 được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc bằng các kháng thể kháng C5 M1M17628N hoặc M1M17627N (được mô tả trong Ví dụ 17 ở đây).

Fig.16 là đồ thị thể hiện tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể của các tế bào hình sao của các kháng thể kháng C5 H4H12166P, H4H12170P, Chất so sánh 1 và Chất so sánh 2, như được mô tả trong Ví dụ 18.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Trừ khi được định nghĩa khác đi nếu không tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có kỹ năng trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên sẽ được mô tả dưới đây. Tất cả các ấn phẩm được đề cập trong bản mô tả này đều được kết hợp vào đây với toàn bộ nội dung của chúng bằng cách viện dẫn.

Các định nghĩa

Thuật ngữ “C5”, cũng được gọi là “thành phần bổ thể 5” hoặc “yếu tố bổ thể 5” chỉ một protein trong huyết thanh của thỏ bổ thể. Protein C5 này là một protein gồm 1676 axit amin bao gồm hai chuỗi, alpha và beta. Protein này là điểm hội tụ cho ba con đường hoạt hóa bổ thể: con đường cổ điển, con đường thay thế và con đường lectin liên kết manosa. Trình tự axit amin của protein C5 có chiều dài đầy đủ được ví dụ bằng trình tự axit amin được cung cấp trong ngân hàng gen với số truy cập

NP_001726,2 (SEQ ID NO: 355). Thuật ngữ “C5” bao gồm protein C5 tái tổ hợp hoặc mảnh của nó. Thuật ngữ này cũng bao gồm protein C5 hoặc mảnh của nó kết hợp với, ví dụ, thẻ histidin, Fc chuột hoặc người hoặc trình tự tín hiệu như ROR1. Ví dụ, thuật ngữ bao gồm các trình tự được ví dụ bằng trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 356 hoặc 357, bao gồm thẻ histidin ở đầu tận cùng C, được kết hợp với các gốc axit amin 19 – 1676 của protein C5 có chiều dài đầy đủ. Thuật ngữ cũng bao gồm các biến thể protein mà bao gồm thẻ histidin ở đầu tận cùng C, được kết hợp với các gốc axit amin 19 – 1676 của protein C5 có chiều dài đầy đủ với sự thay đổi R885H hoặc sự thay đổi R885C.

Thuật ngữ "kháng thể", khi được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để chỉ các phân tử globulin miễn dịch bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bằng các liên kết disulfua (*nghĩa là*, "các phân tử kháng thể hoàn chỉnh"), cũng như các multime của chúng (*ví dụ* IgM) hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (“HCVR” hoặc “V_H”) và vùng cố định chuỗi nặng (bao gồm các miền C_{H1}, C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (“LCVR hoặc “V_L”) và vùng cố định chuỗi nhẹ (C_L). Các vùng V_H và V_L có thể được chia tiếp thành các vùng siêu biến, gọi bằng thuật ngữ vùng quyết định tính bổ trợ (CDR), được đan xen bởi các vùng mà là các vùng được bảo toàn ở mức độ cao hơn, được gọi là các vùng khung làm việc làm việc (workframe region - FR). Mỗi V_H và V_L lại được cấu thành từ ba CDR và bốn FR, được bố trí từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo một số phương án nhất định của sáng chế, các FR của kháng thể (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng) có thể giống với các trình tự dòng mầm ở người, hoặc có thể được cải biến tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự axit amin liên ứng có thể được xác định dựa trên việc phân tích liên tiếp hai hoặc nhiều CDR.

Việc thay thế một hoặc nhiều gốc trong CDR hoặc loại bỏ một hoặc nhiều CDR cũng có thể xảy ra. Các kháng thể đã được mô tả trong tài liệu khoa học trong đó một hoặc hai CDR có thể được phân bổ để liên kết. Padlan và các đồng tác giả (1995 FASEB J. 9:133-139) đã phân tích các vùng tiếp xúc giữa các kháng thể và các kháng nguyên, dựa trên các cấu trúc tinh thể đã công bố, và kết luận rằng khoảng 1/5 đến 1/3

các gốc của CDR tiếp xúc thực tế với kháng nguyên. Padlan cũng phát hiện thấy rằng nhiều kháng thể trong đó một hoặc hai CDR không có các axit amin tiếp xúc với kháng nguyên (cũng xem tài liệu, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Các gốc trong CDR không tiếp xúc với kháng nguyên có thể được xác định dựa trên các nghiên cứu trước đó (ví dụ các gốc H60-H65 trong CDRH2 thường không cần đến), từ các vùng của CDR theo Kabat nằm ngoài các CDR theo Chothia, bằng kỹ thuật mô hình hóa phân tử và/hoặc bằng thực nghiệm. Nếu CDR hoặc (các) gốc của nó bị loại bỏ thì nó thường bị thay thế bằng axit amin xuất hiện ở vị trí tương ứng trong trình tự khác thể khác ở người hoặc trình tự liên ứng của các trình tự này. Các vị trí để thay thế bên trong các CDR và các axit amin để thay thế có thể cũng được chọn lựa bằng thực nghiệm. Các thay thế được xác định bằng thực nghiệm có thể là các thay thế có tính bảo toàn hoặc không có tính bảo toàn.

Các kháng thể đơn dòng hoàn chỉnh kháng C5 ở người được mô tả ở đây có thể bao gồm một hoặc nhiều thay thế, cài xen và/hoặc loại bỏ axit amin trong vùng khung làm việc làm việc và/hoặc các vùng CDR của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khi so sánh với các trình tự dòng mầm tương ứng. Các đột biến này có thể dễ dàng xác định bằng cách so sánh các trình tự axit amin được mô tả ở đây với các trình tự dòng mầm đã sẵn có từ, ví dụ, dữ liệu trình tự kháng thể đã công bố. Sáng chế bao gồm các kháng thể, và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, mà thu được từ các trình tự axit amin bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó một hoặc nhiều axit amin bên trong một hoặc nhiều vùng khung làm việc và/hoặc vùng CDR bị đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể này thu được, hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác ở người, hoặc thành thay thế axit amin có tính bảo toàn của (các) gốc trong dòng mầm tương ứng (các thay đổi về trình tự này ở đây gọi chung là "các đột biến dòng mầm"). Người có kỹ năng trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu từ các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả ở đây, có thể dễ dàng tạo ra rất nhiều kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà bao gồm một hoặc nhiều các đột biến dòng mầm riêng lẻ hoặc các tổ hợp của chúng. Theo một số phương án nhất định, tất cả các gốc trong vùng khung làm việc và/hoặc trong CDR bên trong các miền V_H và/hoặc V_L đều bị đột biến ngược về các gốc mà được phát hiện thấy có trong trình tự dòng mầm ban đầu mà từ đó thu được kháng thể. Theo

các phương án khác, chỉ một số gốc nhất định bị đột biến ngược về trình tự dòng mầm ban đầu, *ví dụ*, chỉ có các gốc bị đột biến mà phát hiện thấy bên trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc bên trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ có các gốc bị đột biến mà phát hiện thấy bên trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều (các) gốc vùng khung làm việc và/hoặc CDR bị đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (*nghĩa là*, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể được tạo ra đầu tiên). Hơn thế nữa, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến của dòng mầm bên trong vùng khung làm việc và/hoặc các vùng CDR, *ví dụ*, trong đó một số gốc nhất định bị đột biến thành gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể trong khi đó các gốc nhất định khác mà khác với trình tự dòng mầm ban đầu được giữ lại hoặc bị đột biến thành gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác. Ngay sau khi thu được, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều các đột biến dòng mầm có thể dễ dàng được đánh giá về một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, cải thiện tính đặc hiệu liên kết, ái lực liên kết tăng, đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận tăng (khi trường hợp này có thể xuất hiện), tính sinh miễn dịch giảm, v.v.. Các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên thu được theo cách thông thường này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đơn dòng đầy đủ ở người kháng C5 bao gồm các biến thể của trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR bất kỳ được mô tả ở đây có một hoặc nhiều thay thế bảo toàn. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 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 axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR bất kỳ được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "kháng thể người", khi được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và cố định thu được từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Các mAb người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người (*ví dụ*, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến định hướng điểm *in vitro* hoặc bằng cách đột biến soma *in vivo*), ví dụ trong các CDR và cụ thể là trong CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể người", khi được

sử dụng trong bản mô tả này, không được dự định bao gồm các mAb trong đó các trình tự CDR thu được từ dòng mầm của loài động vật có vú khác (*ví dụ*, chuột), đã được ghép lên các trình tự FR ở người. Thuật ngữ bao gồm các kháng thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp ở động vật có vú không phải là người, hoặc trong các tế bào của động vật có vú không phải là người. Thuật ngữ này không được dự định bao gồm các kháng thể được phân lập từ hoặc được tạo ra ở đối tượng là người.

Thuật ngữ “tái tổ hợp”, khi được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế được tạo ra, được biểu hiện, được phân lập hoặc thu được bằng các công nghệ hoặc các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như công nghệ ADN tái tổ hợp mà bao gồm, *ví dụ*, lai ghép ADN và biểu hiện chuyển gen. Thuật ngữ này chỉ các kháng thể được biểu hiện ở động vật có vú không phải là người (bao gồm các động vật có vú chuyển gen không phải là người, *ví dụ*, chuột chuyển gen), hoặc hệ thống biểu hiện bằng tế bào (*ví dụ*, các tế bào CHO) hoặc được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp tái tổ hợp.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” hoặc “liên kết đặc hiệu với”, hoặc các thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tạo thành phức hợp với kháng nguyên mà tương đối phù hợp trong các điều kiện sinh lý. Việc liên kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng thấp nhất vào khoảng 1×10^{-8} M hoặc thấp hơn (*ví dụ*, K_D nhỏ hơn chỉ liên kết chặt chẽ hơn). Các phương pháp để xác định xem liệu hai phân tử có liên kết đặc hiệu hay không là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, *ví dụ*, thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và các phương pháp tương tự. Như được mô tả ở đây, các kháng thể được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, BIACORE™, mà liên kết đặc hiệu với C5. Hơn thế nữa, các kháng thể đa đặc hiệu liên kết với một miền trong C5 và một hoặc nhiều kháng nguyên khác hoặc tuy nhiên, các kháng thể có tính đặc hiệu kép mà liên kết với hai vùng khác nhau của C5, được coi là các kháng thể “liên kết đặc hiệu”, khi được sử dụng trong bản mô tả này.

Thuật ngữ kháng thể “ái lực cao” chỉ các mAb có ái lực liên kết với C5, được biểu hiện là K_D , ít nhất là 10^{-8} M; tốt hơn là 10^{-9} M; tốt hơn nữa là 10^{-10} M, thậm chí tốt hơn nữa là 10^{-11} M, thậm chí tốt hơn nữa là 10^{-12} M, như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, BIACORE™ hoặc ELISA đo ái lực của dung dịch.

Các thuật ngữ “tốc độ phân hủy chậm”, “Koff” hoặc “kd” có nghĩa là kháng thể phân ly khỏi C5, với hằng số tốc độ $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc thấp hơn, tốt hơn là $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ hoặc thấp hơn, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Các thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, khi được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ xuất hiện trong tự nhiên, thu được bằng kỹ thuật enzym, tổng hợp hoặc xử lý kỹ thuật di chuyển liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Các thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, hoặc "mảnh kháng thể", khi được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ một hoặc nhiều các mảnh của kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết với protein C5.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với nhóm như phối tử hoặc nhóm có tác dụng trị liệu (“thể liên hợp miễn dịch”), kháng thể kháng C5 thứ hai, hoặc nhóm bất kỳ khác có tác dụng trị liệu hữu ích cho mục đích điều trị bệnh hoặc rối loạn gắn với C5.

Thuật ngữ "kháng thể đã phân lập", khi được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để chỉ kháng thể mà gần như không chứa các kháng thể khác (các Ab) có tính đặc hiệu với kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể đã phân lập liên kết đặc hiệu với C5, hoặc mảnh của nó, gần như không chứa các Ab liên kết đặc hiệu với kháng nguyên ngoài C5).

“Kháng thể phong bế” hoặc "kháng thể trung hòa", khi được sử dụng trong bản mô tả này (hoặc "kháng thể mà trung hòa hoạt tính C5" hoặc “kháng thể đối kháng”), được dự định để chỉ kháng thể có liên kết với C5 dẫn tới việc ức chế ít nhất là một hoạt tính sinh học của C5. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể ngăn ngừa hoặc phong bế quá trình tan huyết qua trung gian bổ thể thông qua con đường cổ điển hoặc con đường thay thế.

Thuật ngữ "cộng hưởng plasmon bề mặt", khi được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ hiện tượng quang học mà cho phép phân tích các tương tác của phân tử sinh học theo thời gian thực bằng cách phát hiện các thay đổi trong nồng độ của protein bên trong một nền cảm biến sinh học, ví dụ sử dụng hệ thống BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Thuật ngữ " K_D ", khi được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để chỉ hằng số phân ly cân bằng của một tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ "epitop" chỉ phần xác định tính kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể được biết là paratope. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một epitop. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các khu vực khác nhau trên một kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Thuật ngữ "epitop" cũng chỉ vị trí trên kháng nguyên đáp ứng với tế bào B và/hoặc T. Nó cũng chỉ một vùng của kháng nguyên mà liên kết với kháng thể. Các epitop có thể được xác định là epitop cấu trúc hoặc epitop chức năng. Các epitop chức năng thường là một bộ nhỏ bao gồm các epitop cấu trúc và có các gốc mà trực tiếp góp phần tạo nên ái lực của tương tác. Các epitop có thể cũng có thể là epitop cấu dạng, mà được tạo thành từ các axit amin không thẳng. Theo một số phương án nhất định, các epitop có thể bao gồm các phần xác định mà là các nhóm nằm trên bề mặt và hoạt động hóa học của các phân tử như các axit amin, các mạch nhánh của phân tử đường, các nhóm phosphoryl, hoặc các nhóm sulfonyl, và, theo các phương án nhất định, có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều cụ thể, và/hoặc đặc điểm mang điện tích cụ thể.

Thuật ngữ "cạnh tranh chéo", khi được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa rằng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với kháng nguyên và ức chế hoặc phong bế liên kết của kháng thể khác hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Thuật ngữ cũng bao gồm sự cạnh tranh giữa hai kháng thể ở cả hai hướng, *nghĩa là*, kháng thể thứ nhất liên kết với và phong bế liên kết của kháng thể thứ hai và ngược lại. Theo một số phương án nhất định, kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai có thể liên kết với cùng epitop. Theo cách khác, các kháng thể thứ nhất và thứ hai có thể liên kết với các epitop khác nhau nhưng chồng lấp sao cho liên kết của một kháng thể sẽ ức chế hoặc phong bế liên kết của kháng thể thứ hai, *ví dụ*, thông qua sự án ngữ không gian. Mức độ cạnh tranh chéo giữa các kháng thể có thể có thể đo được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng thử nghiệm đo mức độ giao thoa lớp sinh học không chất đánh dấu và theo thời gian thực. Mức độ cạnh tranh chéo giữa hai kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng liên kết của kháng thể thứ hai thấp hơn tín hiệu nền do việc liên kết cùng loại (trong đó các kháng thể thứ nhất và thứ hai

là cùng một kháng thể). Mức độ cạnh tranh chéo giữa 2 kháng thể có thể được biểu hiện, ví dụ, dưới dạng % liên kết kháng thể thứ hai mà thấp hơn liên kết của nền cùng loại cơ sở (trong đó thứ nhất và thứ hai các kháng thể là cùng một kháng thể).

Thuật ngữ "gần đồng nhất" hoặc "về cơ bản đồng nhất," khi đề cập đến axit nucleic hoặc mảnh của nó, thể hiện rằng, khi được làm thẳng tối ưu với các đoạn xen hoặc loại bỏ nucleotit thích hợp so với axit nucleic khác (hoặc mạch bổ trợ của nó), thì có mức độ đồng nhất về trình tự nucleotit ít nhất là khoảng 90%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất là khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% các bazơ nucleotit, như được xác định bằng thuật toán bất kỳ đã biết dùng để tính mức độ đồng nhất về trình tự, như FASTA, BLAST hoặc GAP, như được thảo luận dưới đây. Phân tử axit nucleic có mức độ gần đồng nhất với một phân tử axit nucleic tham chiếu có thể, trong một số trường hợp nhất định, mã hóa polypeptit có cùng trình tự axit amin hoặc về cơ bản tương tự như polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu này.

Khi được dùng cho các polypeptit, thuật ngữ "gần đồng nhất" hoặc "gần tương tự" chỉ hai trình tự peptit, khi được làm thẳng tối ưu, như bằng các chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng các trọng số khoảng trống mặc định, có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, thậm chí tốt hơn nữa nếu mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95%, 98% hoặc 99%. Tốt hơn, nếu các phân gốc, mà không đồng nhất, khác bởi sự thay thế axit amin bảo toàn. "Thay thế axit amin bảo toàn" là trường hợp trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có mạch nhánh (nhóm R) có tính chất hóa học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Thông thường, việc thay thế axit amin bảo toàn gần như sẽ không làm thay đổi tính chất chức năng của protein. Trong các trường hợp trong đó hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau ở các thay thế bảo toàn, thì % hoặc mức độ tương tự có thể được điều chỉnh tăng để hiệu chỉnh cho bản chất bảo toàn của các thay thế này. Các phương tiện để điều chỉnh là đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các ví dụ về nhóm các axit amin có các mạch nhánh mà có tính chất hóa học tương tự nhau bao gồm 1) các mạch nhánh béo: glyxine, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) các mạch nhánh hydroxyl béo: serin và threonin; 3) các mạch nhánh chứa amit: asparagin và glutamin; 4) các mạch nhánh thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; 5) các mạch nhánh có

tính bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) các mạch nhánh có tính axit: aspartat và glutamat, và 7) các mạch nhánh chứa lưu huỳnh: cystein và methionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo toàn được ưu tiên: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, sự thay thế bảo toàn là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận log xác suất PAM250 được mô tả trong tài liệu: Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-45, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Thay thế "bảo toàn vừa phải" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận log xác suất PAM250.

Tính tương tự về mặt trình tự của các polypeptit thường được tính sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein sẽ ghép các trình tự tương tự nhau sử dụng các giá trị đo tương tự được gán cho các thay thế, loại bỏ khác nhau, và các cải biến khác, bao gồm thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG có chương trình như GAP và BESTFIT mà có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định mức độ tương đồng về mặt trình tự hoặc mức độ đồng nhất về trình tự giữa các polypeptit có mối quan hệ mật thiết với nhau, như các polypeptit tương đồng từ các loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu dại và thể đột biến của chúng. Ví dụ, ví dụ, GCG phiên bản 60,1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh sử dụng FASTA với các thông số mặc định hoặc được khuyến cáo; chương trình trong GCG phiên bản 60,1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) đề xuất các trình tự đã làm thẳng hàng và % mức độ đồng nhất về trình tự của các vùng chồng lấp lớn nhất giữa trình tự cần truy vấn và các trình tự tra cứu (Pearson (2000) *supra*). Một thuật toán khác được ưu tiên khi so sánh trình tự theo sáng chế với dữ liệu chứa một số lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, cụ thể là BLASTP hoặc TBLASTN, sử dụng các thông số mặc định. Xem, ví dụ tài liệu: Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 và (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, từng tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Cụm từ “lượng cho hiệu quả điều trị” chỉ lượng tạo ra tác dụng mong muốn khi lượng này được dùng. Lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích điều trị, và sẽ được người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xác định sử dụng các kỹ thuật

đã biết (Xem, ví dụ, tài liệu: Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” chỉ động vật, tốt hơn nếu là động vật có vú, tốt hơn nữa là người, cần làm giảm, ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 như hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình (aHUS) hoặc bệnh tiểu huyết sắc tố kịch phát về đêm (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - PNH). Thuật ngữ bao gồm các đối tượng là người đã mắc hoặc có nguy cơ đã mắc bệnh hoặc rối loạn này.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị” ở dạng động từ, động danh từ hoặc danh từ chỉ việc làm giảm hoặc giảm bớt mức độ trầm trọng của ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 nhờ việc dùng chất trị liệu như kháng thể theo sáng chế cho đối tượng có nhu cầu. Các thuật ngữ này bao gồm việc ức chế quá trình tiến triển của bệnh hoặc quá trình xấu đi của triệu chứng/dấu hiệu bệnh. Các thuật ngữ này cũng bao gồm việc chẩn đoán tích cực bệnh, nghĩa là, đối tượng có thể không bị mắc hoặc có thể giảm bệnh khi dùng chất trị liệu như kháng thể theo sáng chế. Chất trị liệu này có thể được dùng ở liều điều trị cho đối tượng.

Thuật ngữ “ngăn ngừa” ở dạng động từ, động danh từ hoặc danh từ chỉ việc ức chế sự biểu hiện của bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 hoặc triệu chứng hoặc dấu hiệu bệnh bất kỳ của bệnh hoặc rối loạn này khi dùng kháng thể theo sáng chế.

Các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể

Trừ khi được thể hiện rõ một cách cụ thể nếu không, thuật ngữ "kháng thể" khi được sử dụng trong bản mô tả này, sẽ được hiểu là bao gồm các phân tử kháng thể có hai chuỗi nặng globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (*nghĩa là*, "phân tử kháng thể hoàn chỉnh") cũng như các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, khi được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ xuất hiện trong tự nhiên, có thể thu được bằng kỹ thuật enzym, tổng hợp hoặc được xử lý kỹ thuật di truyền và liên kết đặc hiệu với kháng nguyên tạo ra phức hợp. Các thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, hoặc "mảnh kháng thể", khi được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ một

hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với protein C5. Mảnh kháng thể có thể bao gồm mảnh Fab, mảnh $F(ab')_2$, mảnh Fv, mảnh dAb, mảnh chứa CDR, hoặc CDR đã phân lập. Theo một số phương án nhất định, thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” chỉ mảnh polypeptit của phân tử liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu. Các mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể thu được, *ví dụ*, từ phân tử kháng thể hoàn chỉnh sử dụng các kỹ thuật chuẩn bất kỳ thích hợp như tiêu hóa phân giải protein hoặc các kỹ thuật xử lý di truyền tái tổ hợp bao gồm thao tác và biểu hiện ADN mã hóa các vùng biến đổi kháng thể và (tùy ý) vùng cố định. ADN này là đã biết và/hoặc dễ dàng có được từ, *ví dụ*, các nguồn thương mại, các thư viện ADN (bao gồm, *ví dụ*, các thư viện thể thực khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được đọc trình tự và thao tác hóa học hoặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, *ví dụ*, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng biến đổi và/hoặc cố định vào trong một cấu hình thích hợp, và để đưa vào các codon, tạo ra các gốc xystein, cải biến, bổ sung hoặc xóa bỏ các axit amin, v.v..

Ví dụ không giới hạn về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) các phân tử dạng mảnh Fv mạch đơn (scFv); (vi) mảnh dAb; và (vii) các đơn vị nhận diện nhỏ của các gốc axit amin mà mô phỏng vùng siêu biến của kháng thể (*ví dụ*, vùng xác định tính bổ trợ đã phân lập (complementarity determining region - CDR) như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ở dạng liên kết. Các phân tử được xử lý kỹ thuật khác như kháng thể đặc hiệu miễn, kháng thể miễn đơn, các kháng thể đã loại bỏ miễn, các kháng thể khảm, các kháng thể ghép CDR, các kháng thể thể hai, các kháng thể thể ba, các kháng thể thể bốn, các kháng thể nhỏ, các kháng thể cỡ nano (*ví dụ* các kháng thể nano hóa trị một, các kháng thể nano hóa trị hai, v.v..), các dược chất miễn dịch modul nhỏ (small modular immunopharmaceutical - SMIP), và các miễn IgNAR biến đổi mạnh, cũng nằm trong phạm vi của cụm từ "mảnh liên kết kháng nguyên," khi được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường bao gồm ít nhất là một vùng biến đổi. Vùng biến đổi này có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và sẽ thường bao gồm ít nhất là một CDR, mà nằm liền kề với hoặc trong một khung với một hoặc nhiều trình tự vùng khung làm việc. Trong mảnh liên kết kháng

nguyên có miền V_H gắn với miền V_L , các miền V_H và V_L có thể nằm ở vị trí tương quan với nhau theo một cách sắp xếp bất kỳ thích hợp. Ví dụ, vùng biến đổi này có thể là một dime và chứa các dime $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ hoặc $V_L - V_L$. Theo cách khác, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L ở dạng monome.

Theo một số phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất là một vùng biến đổi liên kết đồng hóa trị với ít nhất là một miền cố định. Ví dụ không giới hạn về các cấu hình của miền biến đổi và các miền cố định mà có thể được phát hiện thấy bên 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) $V_L - C_L$. Trong cấu hình bất kỳ của miền biến đổi và miền cố định, bao gồm cấu hình ví dụ bất kỳ được liệt kê ở trên, các miền biến đổi và miền cố định có thể liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể liên kết bởi một vùng hoàn chỉnh hoặc vùng bản lề một phần hoặc vùng chất liên kết. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất là 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin, từ đó tạo ra liên kết linh động hoặc bán linh động giữa miền biến đổi và/hoặc miền cố định trong một phân tử polypeptit. Hơn thế nữa, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm đồng dime hoặc dị dime (hoặc multime khác) có cấu hình miền biến đổi và miền cố định bất kỳ được liệt kê ở trên kết hợp không đồng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L ở dạng monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Như với các phân tử kháng thể hoàn chỉnh, mảnh liên kết kháng nguyên có thể có tính đơn đặc hiệu hoặc đa hiệu (ví dụ, đặc hiệu đôi). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể sẽ thường bao gồm ít nhất là hai vùng biến đổi khác nhau, trong đó mỗi vùng biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên riêng biệt hoặc với epitop khác trên cùng kháng nguyên. Dạng kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, bao gồm thể ví dụ các dạng kháng thể đặc hiệu đôi được mô tả ở đây, có thể được sửa đổi phù hợp để sử dụng cho mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế sử dụng các kỹ thuật thông thường có sẵn trong tình trạng kỹ thuật này.

Tạo ra các kháng thể người

Các phương pháp tạo ra các kháng thể người ở chuột chuyển gen là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp bất kỳ đã biết này có thể được sử dụng trong theo sáng chế để tạo ra các kháng thể người liên kết đặc hiệu với protein C5.

Các chất sinh miễn dịch bao gồm chất sinh miễn dịch bất kỳ trong số các chất sinh miễn dịch dưới đây có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể liên kết với protein C5. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế thu được từ chuột được gây miễn dịch bằng protein C5 tự nhiên, có chiều dài đầy đủ (Xem, ví dụ, số truy cập trong ngân hàng gen NP_001726.2) (SEQ ID NO: 355), hoặc bằng ADN mã hóa protein này hoặc mảnh của nó. Theo cách khác, protein này hoặc mảnh của nó có thể được tạo ra sử dụng các kỹ thuật sinh học chuẩn và được cải biến và được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Theo một số phương án nhất định của sáng chế, chất sinh miễn dịch này là một mảnh của protein C5 mà nằm trong khoảng các gốc axit amin 19 – 1676 của SEQ ID NO: 355.

Theo một số phương án, chất sinh miễn dịch này có thể là protein C5 tái tổ hợp hoặc mảnh của nó được biểu hiện trong *E. coli* hoặc trong các tế bào nhân chuẩn bất kỳ khác hoặc trong các tế bào động vật có vú bất kỳ khác như tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO).

Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE® (Xem, ví dụ, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc phương pháp bất kỳ khác đã biết dùng để tạo ra các kháng thể đơn dòng, các kháng thể khảm có ái lực cao với C5 được phân lập đầu tiên có vùng biến đổi ở người và vùng cố định ở chuột. Công nghệ VELOCIMMUNE® liên quan đến việc tạo ra chuột chuyển gen có hệ gen bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người liên kết có điều khiển với loci ở vùng cố định của chuột nội sinh và vùng cố định ở chuột để đáp ứng với sự kích thích bằng kháng nguyên. ADN mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được phân lập và liên kết có điều khiển với ADN mã hóa các vùng cố định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người. ADN này sau đó được biểu hiện trong tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể hoàn chỉnh ở người.

Thông thường, chuột VELOCIMMUNE® được thử bằng kháng nguyên quan tâm, và dòng tế bào lympho (như các tế bào B) được thu hồi từ chuột mà biểu hiện các

kháng thể. Các tế bào lympho này có thể được dung hợp với dòng tế bào u tủy để tạo ra các dòng tế bào lai bất tử, và các dòng tế bào lai này được sàng lọc và chọn lựa để xác định các dòng tế bào lai mà tạo ra các kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên quan tâm. ADN mã hóa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được phân lập và liên kết với các vùng cố định isotyp mong muốn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Protein kháng thể này có thể được tạo ra trong tế bào, như tế bào CHO. Theo cách khác, ADN mã hóa các kháng thể khảm đặc hiệu kháng nguyên hoặc các vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được phân lập trực tiếp từ các tế bào lympho đặc hiệu kháng nguyên.

Ban đầu, các kháng thể khảm có ái lực cao được phân lập có vùng biến đổi ở người và vùng cố định ở chuột. Như trong phần thử nghiệm dưới đây, các kháng thể này được phân tích đặc điểm và được chọn theo đặc tính mong muốn bao gồm ái lực, tính chọn lọc, epitop, v.v.. Các vùng cố định ở chuột được thay thế bằng vùng cố định ở người mong muốn để tạo ra kháng thể hoàn chỉnh ở người theo sáng chế, ví dụ IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc được cải biến. Trong khi vùng cố định được chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể thì liên kết kháng nguyên với ái lực cao và tính đặc hiệu đích lại phụ thuộc vào vùng biến đổi này.

Các tương đương sinh học

Các kháng thể kháng C5 và các mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm các protein có trình tự axit amin mà thay đổi so với các kháng thể đã mô tả, nhưng vẫn giữ lại khả năng liên kết với protein C5. Các biến thể này của các kháng thể và các mảnh kháng thể bao gồm một hoặc nhiều bổ sung, loại bỏ, hoặc thay thế các axit amin khi so sánh với trình tự gốc, nhưng bộc lộ hoạt tính sinh học mà về cơ bản tương đương với hoạt tính sinh học của các kháng thể đã mô tả. Ngược lại, các trình tự ADN mã hóa kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự thay thế bao gồm một hoặc nhiều bổ sung, loại bỏ, hoặc thay thế các nucleotit khi so sánh với trình tự được mô tả, nhưng mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà về cơ bản tương đương sinh học với kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế.

Hai protein liên kết kháng nguyên, hoặc các kháng thể, được coi là tương tự nếu, ví dụ, chúng là các tương đương về được lý hoặc các thay thế được lý có tốc độ

và mức độ hấp thụ không thể hiện sự khác nhau đáng kể khi được dùng ở cùng liều mol trong các điều kiện thử nghiệm giống nhau, ở dạng liều đơn hoặc đa liều. Một số kháng thể sẽ được coi là các tương đương hoặc thay thế được lý nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng không tương đương về tốc độ hấp thụ chúng và tuy nhiên có thể được coi là tương đương sinh học vì sự khác nhau ở tốc độ hấp thụ mang tính chủ đích và được phản ánh trong việc đánh dấu, không được coi cần thiết cho việc thu được các nồng độ được chất hữu hiệu trong cơ thể khi, ví dụ, sử dụng lâu dài và được coi là không có ý nghĩa trong y học đối với một sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

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

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học khi bệnh nhân chuyển đổi việc dùng một hoặc nhiều lần sản phẩm tham chiếu sang sản phẩm sinh học mà không thấy sự gia tăng nguy cơ xuất hiện các tác dụng phụ như dự đoán, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng trong tính sinh miễn dịch hoặc hiệu quả bị giảm xuống, khi so với liệu pháp đang dùng mà không có sự chuyển đổi này.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học khi cả hai protein này đều tác động thông qua một cơ chế chúng hoặc các cơ chế tác động chung cho điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, tới mức độ mà các cơ chế này là đã biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và/hoặc *in vitro*. Các phương pháp đo tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) phép thử *in vivo* test ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc các dịch sinh học khác dưới dạng hàm của thời gian; (b) phép thử *in vitro* có mối tương quan với và có tính dự báo hợp lý số liệu về độ sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) phép thử *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú trong đó tác dụng được lý tức thì thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo dưới dạng hàm của thời gian; và (d)

trong thử nghiệm lâm sàng có kiểm soát chặt chẽ mà thiết lập nên độ an toàn, hiệu lực hoặc độ sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của các kháng thể theo sáng chế có thể được xây dựng cấu trúc bằng cách, ví dụ, tạo ra các thay thế khác nhau đối với các gốc hoặc các trình tự hoặc loại bỏ các gốc ở đầu tận cùng hoặc các gốc nội bộ hoặc các trình tự không cần thiết cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc xystein không cần thiết cho hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc thay thế bằng các axit amin khác để ngăn chặn sự tạo thành các cầu disulfua nội phân tử không cần thiết hoặc không chính xác. Trong các nội dung khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể của kháng thể bao gồm các thay đổi axit amin, mà làm thay đổi các đặc tính glycosyl hóa của các kháng thể, *ví dụ*, các đột biến mà loại bỏ hoặc triệt tiêu việc glycosyl hóa.

Các kháng thể kháng C5 bao gồm các biến thể Fc

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, các kháng thể kháng C5 được cung cấp bao gồm miền Fc bao gồm một hoặc nhiều đột biến mà tăng cường hoặc làm giảm liên kết của kháng thể với thụ thể FcRn, *ví dụ*, ở độ pH axit khi so với độ pH trung hòa. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 bao gồm một đột biến trong vùng C_{H2} hoặc vùng C_{H3} của miền Fc, trong đó (các) 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 khoảng pH từ khoảng 5,5 đến 6,0). Các đột biến này có thể làm tăng thời gian bán hủy của kháng thể khi được dùng cho động vật. Ví dụ không giới hạn về các cải biến của miền Fc này bao gồm, *ví dụ*, cải biến ở vị trí 250 (*ví dụ*, E hoặc Q); 250 và 428 (*ví dụ*, L hoặc F); 252 (*ví dụ*, L/Y/F/W hoặc T), 254 (*ví dụ*, S hoặc T), và 256 (*ví dụ*, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc cải biến ở vị trí 428 và/hoặc 433 (*ví dụ*, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (*ví dụ*, A, W, H, F hoặc Y [N434A, N434W, N434H, N434F hoặc N434Y]); hoặc cải biến ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc cải biến ở vị trí 307 hoặc 308 (*ví dụ*, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, cải biến này bao gồm cải biến 428L (*ví dụ*, M428L) và 434S (*ví dụ*, N434S); cải biến 428L, 259I (*ví dụ*, V259I), và 308F (*ví dụ*, V308F); cải biến 433K (*ví dụ*, H433K) và cải biến 434 (*ví dụ*, 434Y); cải biến 252, 254, và 256 (*ví dụ*, 252Y, 254T, và 256E); cải biến 250Q và 428L (*ví dụ*, T250Q và M428L); và cải biến 307 và/hoặc 308 (*ví dụ*, 308F hoặc 308P). Theo

phương án khác nữa, cải biến này bao gồm cải biến 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc cải biến 297A (ví dụ, N297A).

Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 bao gồm miền Fc bao gồm một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm các đột biến được chọn từ nhóm gồm có: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); 257I và 311I (ví dụ, P257I và Q311I); 257I và 434H (ví dụ, P257I và N434H); 376V và 434H (ví dụ, D376V và N434H); 307A, 380A và 434A (ví dụ, T307A, E380A và N434A); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Tất cả các tổ hợp có thể có của các đột biến trong miền Fc nêu trên và các đột biến khác bên trong các vùng biến đổi của kháng thể được mô tả ở đây, được dự định trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng C5 bao gồm vùng cố định chuỗi nặng (C_H) ở dạng khảm, trong đó vùng C_H dạng khảm này bao gồm các đoạn thu được từ các vùng C_H có nhiều hơn một isotyp globulin miễn dịch. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm vùng C_H dạng khảm bao gồm một phần hoặc toàn bộ miền C_{H2} thu được từ phân tử IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người, kết hợp với một phần hoặc toàn bộ miền C_{H3} thu được từ phân tử IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng C_H dạng khảm có vùng bản lề dạng khảm. Ví dụ, vùng bản lề dạng khảm có thể bao gồm trình tự axit amin “bản lề trên” (các gốc axit từ các vị trí 216 đến 227 theo cách đánh số EU) thu được từ vùng bản lề của IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người, kết hợp với trình tự “bản lề dưới” (các gốc axit từ các vị trí 228 đến 236 theo cách đánh số EU) thu được từ vùng bản lề của IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người. Theo các phương án nhất định, vùng bản lề dạng khảm bao gồm các gốc axit amin thu được từ IgG1 người hoặc vùng bản lề trên của IgG4 người và các gốc axit amin thu được từ vùng bản lề của IgG2 người. Kháng thể bao gồm vùng C_H dạng khảm như được mô tả ở đây có thể, theo các phương án nhất định, bộc lộ các chức năng tác động Fc cải biến mà không ảnh hưởng bất lợi đến tác dụng trị liệu hoặc dược động học của kháng thể. (Xem, ví dụ, công bố đơn Mỹ số 2014/0243504, phần mô tả của công bố đơn này được kết hợp toàn bộ nội dung vào đây bằng cách viện dẫn).

Đặc tính sinh học của các kháng thể

Thông thường, các kháng thể theo sáng chế thực hiện chức năng bằng cách liên kết với protein C5 và ngăn cản sự phân cắt chúng thành C5a và C5b. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể mà liên kết với protein C5 (*ví dụ*, ở 25°C hoặc ở 37°C) với K_D nhỏ hơn 9nM như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với C5 với K_D nhỏ hơn khoảng 9nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 2nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 500pM, nhỏ hơn 250pM, hoặc nhỏ hơn 100pM, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết với protein C5 ở người thời gian bán hủy ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 2 phút như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 4 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của sáng chế liên kết với protein C5 với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn khoảng 150 phút, lớn hơn khoảng 200 phút, hoặc lớn hơn khoảng 250 phút, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây (*ví dụ*, dạng bắt giữ mAb hoặc bắt giữ kháng nguyên), hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết với protein C5 ở người thời gian bán hủy ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 1,5 phút như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 4 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của sáng chế liên kết với protein C5 với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 2 phút, lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 25 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn khoảng 150 phút, hoặc lớn hơn

khoảng 200 phút, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây (*ví dụ*, dạng bắt giữ mAb hoặc bắt giữ kháng nguyên), hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể mà liên kết với protein C5 ở khi (*ví dụ*, ở 25°C hoặc ở 37°C) với K_D nhỏ hơn 120nM như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với C5 ở khi với K_D nhỏ hơn khoảng 120nM, nhỏ hơn khoảng 100nM, nhỏ hơn khoảng 50nM, nhỏ hơn khoảng 25nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 500pM, hoặc nhỏ hơn 250pM, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể mà liên kết với protein C5 đã cải biến ở người có thay đổi R885H (được ví dụ bằng SEQ ID NO: 356) với K_D nhỏ hơn 70nM như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây. Các biến thể của C5 đã được chỉ ra đáp ứng kém với các kháng thể kháng C5 đã được mô tả trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này (*ví dụ*, Nishimura *et al* 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với protein C5 đã cải biến ở người với K_D nhỏ hơn khoảng 65nM, nhỏ hơn khoảng 50nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 3nM, hoặc nhỏ hơn 2nM, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể mà liên kết với protein C5 đã cải biến ở người có thay đổi R885C (được ví dụ bằng SEQ ID NO: 357) với K_D nhỏ hơn 160nM như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây. Các biến thể của C5 đã được chỉ ra là có đáp ứng kém với các

kháng thể kháng C5 đã được mô tả trước đó trong lĩnh vực kỹ thuật này (*ví dụ*, Nishimura *et al* 2014, New Engl. J. Med. 370: 632-639). Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với protein C5 đã cải biến ở người với K_D nhỏ hơn khoảng 150nM, nhỏ hơn khoảng 100nM, nhỏ hơn khoảng 50nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, hoặc nhỏ hơn 2nM, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể mà ức chế tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC) với IC_{50} nhỏ hơn 10nM như được xác định bằng thử nghiệm phát quang, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 6 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng ức chế CDC với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 3,5nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 2nM, như được xác định bằng thử nghiệm phát quang tế bào B, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 6 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà phong bế quá trình tan huyết qua con đường cổ điển (CP) qua trung gian C5 ở người lớn hơn 94% và với IC_{50} nhỏ hơn 6nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết CP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế quá trình tan huyết CP với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 6nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 4nM, nhỏ hơn khoảng 3nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 2nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết CP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà phong bế quá trình tan huyết qua con đường thay thế (AP) qua trung gian C5 ở người lớn hơn 70% và với IC_{50} nhỏ hơn 165nM, như được xác định bằng thử nghiệm làm tan huyết AP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của

chúng phong bế quá trình tan huyết AP với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 160nM, nhỏ hơn khoảng 150nM, nhỏ hơn khoảng 100nM, nhỏ hơn khoảng 50nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 20nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết AP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà phong bế quá trình tan huyết qua con đường cổ điển (CP) qua trung gian C5 ở khí xanh Châu Phi lớn hơn 40% và với IC_{50} nhỏ hơn 185nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết CP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế quá trình tan huyết CP với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 180nM, nhỏ hơn khoảng 150nM, nhỏ hơn khoảng 100nM, nhỏ hơn khoảng 75nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 50nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết CP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà phong bế quá trình tan huyết qua con đường thay thế (AP) qua trung gian C5 ở khí xanh Châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 235nM, như được xác định bằng thử nghiệm làm tan huyết AP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế quá trình tan huyết AP với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 200nM, nhỏ hơn khoảng 150nM, nhỏ hơn khoảng 100nM, nhỏ hơn khoảng 50nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 20nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết AP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà phong bế hơn 90% quá trình tan huyết qua con đường cổ điển (CP) qua trung gian C5 ở khí đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 145nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết CP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế quá trình tan huyết CP với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 140nM, nhỏ hơn khoảng 120nM, nhỏ hơn khoảng 100nM, nhỏ hơn khoảng 75nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 50nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết CP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà phong bế quá trình tan huyết qua con đường thay thế (AP) qua trung gian C5 ở khi đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 30nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết AP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng phong bế quá trình tan huyết AP với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 25nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 2nM, như được xác định bằng thử nghiệm tan huyết AP, *ví dụ*, sử dụng dạng thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 8 ở đây, hoặc thử nghiệm gần tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà thể hiện đặc tính được động học (PK) và dược lực học (PD) cải thiện hơn so với các kháng thể kháng C5 trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kháng thể kháng C5 theo sáng chế thể hiện khả năng ít bị thanh thải qua trung gian đích khi dùng, như được thể hiện trong các Ví dụ 9 và 10 ở đây. Theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà thể hiện các nồng độ trong huyết thanh trong một thời gian dài, *ví dụ*, lớn hơn 20 ngày, lớn hơn 25 ngày, lớn hơn 30 ngày, lớn hơn 35 ngày, lớn hơn 40 ngày, lớn hơn 45 ngày, lớn hơn 50 ngày, lớn hơn 55 ngày, hoặc lớn hơn 60 ngày, như được mô tả trong các Ví dụ 9 và 10 ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 theo sáng chế thể hiện thời gian bán hủy trong huyết thanh dài lâu hơn 10 ngày, khi so sánh với các kháng thể kháng C5 trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có ái lực cao đối với C5 ở người (*ví dụ*, K_D nhỏ hơn 0,3nM) và độ thanh thải thấp hơn (*ví dụ*, thời gian bán hủy dài, hoạt tính dược lực học được cải thiện trong nhiều ngày hơn so với các kháng thể kháng C5 đã biết trước đây). Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng thuận lợi với ít lần dùng hơn ở đối tượng bị bệnh hoặc rối loạn gắn với C5.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể tái tổ hợp đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết đặc hiệu với protein C5, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó bộc lộ một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) là kháng thể đơn dòng hoàn chỉnh ở người; (b) liên kết với C5 ở người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn

0,9nM ở 25°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (c) liên kết với C5 ở người với K_D nhỏ hơn 0,3nM ở 37°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (d) có nồng độ trong huyết thanh lớn hơn 10 µg/mL cho tới tận ngày thứ 70 khi dùng cho khỉ đầu chó; (e) phong bế quá trình tan huyết CP- và AP cho tới tận ngày thứ 35 khi dùng cho khỉ đầu chó, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*; (f) có thời gian bán hủy lớn hơn 10 ngày ở khỉ đầu chó; (g) có nồng độ trong huyết thanh lớn hơn 10 µg/mL cho tới tận ngày thứ 40 khi dùng cho C5 ở chuột được làm giống người; (h) quá trình tan huyết CP cho tới tận ngày thứ 30 khi dùng cho C5 ở chuột được làm giống người, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*; và (i) có thời gian bán hủy lớn hơn 10 ngày ở C5 ở chuột được làm giống người.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể tái tổ hợp đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết đặc hiệu với protein C5, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó bộc lộ một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) là kháng thể đơn dòng hoàn chỉnh ở người; (b) liên kết với C5 ở người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 0,9nM ở 25°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (c) liên kết với C5 ở người với K_D nhỏ hơn 0,3nM ở 37°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (d) liên kết với C5 ở khỉ với K_D nhỏ hơn 65nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (e) liên kết với biến thể R885H của C5 ở người (SEQ ID NO: 356) với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (f) liên kết với biến thể R885C của C5 ở người (SEQ ID NO: 357) với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (g) phong bế quá trình tan huyết thông qua con đường cổ điển (CP) qua trung gian C5 ở người hơn 95% và với IC_{50} nhỏ hơn 6nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP; (h) phong bế quá trình tan huyết qua con đường thay thế (AP) qua trung gian C5 ở người lớn hơn 70% và với IC_{50} nhỏ hơn 165nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP; (i) ức chế quá trình tan huyết CP qua trung gian C5 ở khỉ xanh Châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 185nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP; (j) ức chế quá trình tan huyết AP qua trung gian C5 ở khỉ xanh Châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 235nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP; (k) ức chế quá trình tan huyết CP qua trung gian C5 ở khỉ đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 145nM, như đo được trong

thử nghiệm tan huyết CP; và (l) ức chế quá trình tan huyết AP qua trung gian C5 ở khi đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 30nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc tính sinh học nêu trên, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Các đặc tính sinh học khác của các kháng thể theo sáng chế sẽ trở lên rõ ràng đối với người có trình độ trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này khi xem phần mô tả của sáng chế bao gồm các ví dụ thực hiện dưới đây.

Lập bản đồ epitop và các công nghệ liên quan

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin được phát hiện thấy bên trong một hoặc nhiều vùng của phân tử protein C5 bao gồm, alphapolypeptit và betpolypeptit. Epitop mà liên kết với các kháng thể này có thể gồm một trình tự liên kề bao gồm 3 axit amin hoặc nhiều hơn (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) nằm bên trong các miền bất kỳ của phân tử protein C5 này (ví dụ epitop thẳng trong miền). Theo cách khác, epitop có thể gồm nhiều axit amin (hoặc trình tự axit amin) không liên tiếp bên trong một hoặc cả hai miền nêu trên của phân tử protein (ví dụ epitop cầu dạng).

Các kỹ thuật khác nhau đã biết đối với người có kỹ năng trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để xác định xem kháng thể có "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" bên trong polypeptit hoặc protein hay không. Ví dụ các kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm phong bế chéo thông thường, như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Các phương pháp khác bao gồm phân tích đột biến quét alanin, phân tích đốm peptit (Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63), các nghiên cứu hình học tinh thể phân tích sự phân cắt peptit và phân tích NMR. Ngoài ra, các phương pháp như cắt epitop, tách chiết epitop, và cải biến hóa học đối với các kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496). Phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định các axit amin bên trong polypeptit mà tương tác với kháng thể là phát hiện sự trao đổi hydro/đơteri bằng cách ghi phổ khối. Nói chung, phương pháp trao đổi hydro/đơteri liên quan đến việc đánh dấu bằng đơteri đối với protein quan tâm, sau đó liên kết kháng thể này với protein đã đánh dấu bằng đơteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và các proton có thể trao

đổi được bên trong các axit amin được bảo vệ bằng phức hợp của kháng thể sẽ trải qua việc trao đổi ngược đơteri – hydro ở tốc độ nhỏ hơn tốc độ của các proton có thể trao đổi được bên trong các axit amin mà không phải là một phần của bề mặt chung. Kết quả là, các axit amin mà tạo thành một phần của bề mặt chung protein/kháng thể có thể giữ lại đơteri và do đó, có khối lượng cao hơn tương đối so với các axit amin không được bao gồm trong bề mặt chung này. Sau khi phân ly kháng thể, protein đích bị proteaza phân cắt và được phân tích phổ khối, theo đó phát hiện ra các gốc được gắn đơteri mà tương ứng với các axit amin cụ thể mà tương tác với kháng thể. *Xem*, ví dụ tài liệu: Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Thuật ngữ "epitop" chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc T đáp ứng với chúng. Các epitop tế bào B có thể được tạo thành từ bởi cả các axit amin liền kề nhau hoặc các axit amin không liền kề được đặt kề nhau nhờ sự gấp nếp bậc ba của protein. Các epitop được tạo thành từ các axit amin liền kề nhau thường được giữ lại khi tiếp xúc với dung môi làm biến tính, trong khi đó các epitop được tạo thành nhờ sự gấp nếp bậc ba nêu trên lại thường bị mất đi khi xử lý bằng dung môi làm biến tính. Một epitop thường bao gồm ít nhất là 3, và phổ biến hơn, ít nhất là 5 hoặc 8-10 axit amin trong một cấu dạng không gian đặc trưng.

Phương pháp phân tích đặc điểm được hỗ trợ bằng cải biến (Modification-Assisted Profiling - MAP), cũng được biết là phương pháp phân tích đặc điểm kháng thể dựa trên cấu trúc của kháng nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling - ASAP) là một phương pháp phân loại một số lượng lớn các kháng thể đơn dòng (mAbs) định hướng đến cùng một kháng nguyên theo tính tương tự của profin liên kết của từng kháng thể đối với các bề mặt kháng nguyên đã cải biến hóa học hoặc cải biến bằng enzym (xem US 2004/0101920, tài liệu này được kết hợp chi tiết vào đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của nó). Mỗi nhóm có thể phản ánh một epitop đặc trưng mà khác biệt gần như hoàn toàn so với chồng lấp một phần với epitop nằm trong nhóm khác. Công nghệ này cho phép lọc nhanh các kháng thể giống nhau về mặt di truyền, vì vậy việc phân tích đặc tính có thể tập trung vào các kháng thể khác nhau về mặt di truyền. Khi được ứng dụng để sàng lọc các tế bào lai, MAP có thể hỗ trợ việc xác định các dòng tế bào lai hiếm gặp mà tạo ra các mAb có các đặc tính mong muốn.

MAP có thể được sử dụng để phân loại các kháng thể theo sáng chế thành các nhóm kháng thể liên kết với các epitop khác nhau.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể kháng C5 hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết với epitop bên trong một hoặc nhiều vùng bất kỳ được ví dụ trong protein C5, ở dạng tự nhiên, như được ví dụ trong SEQ ID NO: 355, hoặc được tạo ra theo cách tái tổ hợp, hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế liên kết với một vùng bao gồm một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin 19 – 1676 của protein C5 ở người.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế, tương tác với ít nhất là một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các gốc axit amin nằm từ vị trí khoảng 19 đến vị trí khoảng 750; hoặc các gốc axit amin nằm từ vị trí khoảng 751 đến vị trí khoảng 1676 của SEQ ID NO: 355.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà tương tác với một hoặc nhiều epitop được phát hiện thấy trong chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta của C5 (SEQ ID NO: 359). (Các) epitop này có thể gồm một hoặc nhiều các trình tự liên kế gồm 3 axit amin hoặc nhiều hơn (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) nằm bên trong chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta của C5. Theo cách khác, epitop có thể gồm nhiều các axit amin không liên kế (hoặc các trình tự axit amin) nằm bên trong C5, như được thể hiện trong 11 ở đây, epitop của C5 mà tương tác với kháng thể ví dụ theo sáng chế H4H12166P được xác định bằng: (i) trình tự axit amin NMGATGMDSW (SEQ ID NO: 360) mà tương ứng với các axit amin 591 đến 599 nằm trong chuỗi beta của SEQ ID NO: 359; và (ii) trình tự axit amin WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SEQ ID NO: 361), mà tương ứng với các axit amin 775 đến 794 nằm trong chuỗi alpha của SEQ ID NO: 359. Do đó, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 mà tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong vùng bao gồm (i) trình tự axit amin NMGATGMDSW (SEQ ID NO: 360), mà tương ứng với các axit amin 591 đến 599 của SEQ ID NO: 359; và (ii) trình tự axit amin WEVHLVPRRKQLQFALPDSL (SEQ ID NO: 361), mà tương ứng với các axit amin 775 đến 794 của SEQ ID NO: 359.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 liên kết với cùng một epitop, hoặc một phần của epitop, như các kháng thể ví dụ cụ thể bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1.

Mặt khác, sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng C5 mà cạnh tranh liên kết với protein C5 hoặc mảnh của nó các kháng thể ví dụ cụ thể bất kỳ được liệt kê trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng C5 cạnh tranh chéo để liên kết với protein C5 với một hoặc nhiều các kháng thể được liệt kê trong Bảng 1.

Người có trình độ trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định được rằng kháng thể liên kết với cùng epitop hay không, hoặc cạnh tranh để liên kết với, kháng thể kháng C5 tham chiếu bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, để xác định xem kháng thể thử có liên kết với cùng một epitop với kháng thể kháng C5 tham chiếu theo sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu được cho phép liên kết với protein C5 hoặc peptit trong các điều kiện làm trung hòa. Tiếp theo, khả năng của kháng thể thử liên kết với phân tử protein C5 được đánh giá. Nếu kháng thể thử có khả năng liên kết với C5 sau khi đã liên kết trung hòa với kháng thể kháng C5 tham chiếu, thì có thể kết luận được rằng kháng thể thử liên kết với epitop khác với kháng thể kháng C5 tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử không có khả năng liên kết với protein C5 sau khi liên kết trung hòa với kháng thể kháng C5 tham chiếu, thì kháng thể thử có thể liên kết với cùng epitop với epitop được liên kết bởi kháng thể kháng C5 tham chiếu theo sáng chế.

Để xác định xem kháng thể có cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng C5 tham chiếu, phương pháp liên kết đã mô tả ở trên được tiến hành theo hai hướng. Ở hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho liên kết với protein C5 trong các điều kiện trung hòa sau đó đánh giá liên kết của kháng thể thử với phân tử C5. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử được cho liên kết với phân tử C5 trong các điều kiện trung hòa sau đó đánh giá liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử C5. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ có kháng thể thử nhất (trung hòa) có khả năng liên kết với phân tử C5, thì kết luận rằng kháng thể thử và kháng thể tham chiếu cạnh tranh để liên kết với C5. như sẽ được đánh giá bởi người có trình độ trung bình về 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 epitop giống như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế về mặt không gian lập thể liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết với epitop chồng lấn hoặc liên kề.

Hai kháng thể liên kết với cùng epitop hoặc epitop chồng lẫn nếu từng kháng thể này ức chế (phong bế) theo cách cạnh tranh liên kết của kháng thể còn lại với kháng nguyên. Nghĩa là, mức vượt 1-, 5-, 10-, 20- hoặc 100-lần của một kháng thể ức chế liên kết của kháng thể còn lại ít nhất là 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% như đo được trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh (Xem, ví dụ, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể có cùng epitop nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên này sẽ làm giảm hoặc loại bỏ khả năng liên kết của một kháng thể, làm giảm hoặc loại bỏ khả năng liên kết của kháng thể còn lại. hai kháng thể có các epitop chồng lẫn nếu một số axit amin đột biến mà giảm bớt hoặc loại bỏ sự liên kết của một kháng thể, giảm bớt hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể còn lại.

Việc tiến hành thử nghiệm bổ sung thông thường (ví dụ, đột biến peptit và các phân tích liên kết) sau đó có thể diễn ra để khẳng định việc thiếu liên kết của kháng thể thử như đã quan sát được thực tế có phải do việc liên kết với cùng epitop với kháng thể tham chiếu hay không hoặc nếu việc phong bế không gian lập thể (hoặc hiện tượng khác) chịu trách nhiệm cho việc không liên kết như đã quan sát thấy. Các thử nghiệm loại này có thể được tiến hành sử dụng ELISA, RIA, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, đo dòng tế bào hoặc thử nghiệm liên kết kháng thể định tính hoặc định lượng bất kỳ khác đã có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng kháng C5 ở người được liên hợp với nhóm trị liệu (“thể dung hợp miễn dịch”), để điều trị bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 (ví dụ, hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình). Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thể dung hợp miễn dịch” chỉ kháng thể mà liên kết hóa học hoặc sinh học với chất có hoạt tính phóng xạ, xytokin, interferon, đích hoặc nhóm thông báo, enzym, peptit hoặc protein hoặc chất trị liệu. Kháng thể có thể được liên kết với chất có hoạt tính phóng xạ, xytokin, interferon, đích hoặc nhóm thông báo, enzym, peptit hoặc chất trị liệu ở vị trí bất kỳ dọc theo phân tử này miễn là nó có thể liên kết với đích của nó. Các ví dụ về các thể dung hợp miễn dịch bao gồm các thể dung hợp kháng thể-dược chất và protein dung hợp kháng thể-độc tố. Theo một phương án, chất

này có thể kháng thể khác thứ hai liên kết với protein C5. Loại nhóm trị liệu mà có thể được liên hợp với kháng thể kháng C5 và sẽ tính đến tình trạng bệnh được điều trị và tác dụng điều trị mong muốn cần đạt được. Các ví dụ về các chất thích hợp để tạo ra các thể dung hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này; xem ví dụ, WO 05/103081.

Các kháng thể đa đặc hiệu

Các kháng thể theo sáng chế có thể có tính đặc hiệu đơn, đôi hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể có tính đặc hiệu đối với các epitop khác nhau của một đích polypeptit hoặc có thể chứa các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu đối với nhiều hơn một đích polypeptit. Xem, ví dụ tài liệu: Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Phân tử liên kết với kháng nguyên đa đặc hiệu bất kỳ theo sáng chế, hoặc các biến thể của nó, có thể được xây dựng cấu trúc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn (ví dụ, công nghệ ADN tái tổ hợp và biểu hiện protein), như đã biết rõ đối với người có trình độ trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, các kháng thể đặc hiệu với C5 được tạo ra ở dạng đặc hiệu đôi ("đặc hiệu đôi") trong đó các vùng biến đổi liên kết với các miền khác nhau của protein C5 cùng nhau liên kết để tạo ra tính đặc hiệu miền kép trong một phân tử liên kết. Dạng đặc hiệu đôi được thiết kế phù hợp có thể tăng cường toàn bộ hiệu lực ức chế protein C5 thông qua việc làm tăng tính đặc hiệu và ái lực liên kết. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với các miền đơn lẻ, (ví dụ, các đoạn của miền mang đầu tận cùng N), hoặc mà có thể liên kết với các vùng khác nhau bên trong một miền, được ghép cặp trên khung cấu trúc mà cho phép mỗi vùng liên kết đồng thời với các epitop riêng biệt, hoặc với các vùng khác nhau bên trong một miền. Trong một ví dụ về vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) đặc hiệu đôi từ chất liên kết có tính đặc hiệu đối một miền được tái kết hợp với vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) từ loạt chất liên kết có tính đặc hiệu đối với miền thứ hai để xác định các đối tác V_L không cùng nguồn gốc mà có thể được ghép cặp với V_H ban đầu mà không làm mất đi tính đặc hiệu ban đầu đối với V_H đó. Theo cách này, một đoạn V_L (ví dụ, V_{L1}) có thể được kết hợp với hai miền V_H khác nhau (ví dụ, V_{H1} và V_{H2}) để tạo ra kháng thể đặc hiệu đôi được tạo thành bởi hai

nhánh liên kết (V_{H1} - V_{L1} và V_{H2} - V_{L1}). Việc sử dụng một đoạn V_L sẽ làm giảm tính phức tạp của hệ thống và theo đó đơn giản hóa và làm tăng hiệu quả trong quá trình tách dòng, biểu hiện, và tinh chế được sử dụng để tạo ra kháng thể đặc hiệu đôi (Xem, ví dụ, USSN13/022759 và US2010/0331527).

Theo cách khác, các kháng thể mà liên kết với nhiều hơn một miền và đích thứ hai, như, bao gồm nhưng không giới hạn ở, ví dụ, kháng thể kháng C5 khác thứ hai, có thể được tạo ra ở dạng đặc hiệu đôi sử dụng các kỹ thuật đã mô tả ở đây, hoặc các kỹ thuật khác đã biết đối với người có kỹ năng trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng biến đổi của kháng thể liên kết với các vùng khác nhau có thể cùng nhau liên kết với các vùng biến đổi liên kết với các vị trí liên quan trên, ví dụ, miền ngoại bào của C5, để tạo ra tính đặc hiệu kháng nguyên kép bên trong một phân tử liên kết. Dạng đặc hiệu đôi được thiết kế phù hợp có bản chất nêu trên sẽ đóng vai trò chức năng kép. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với miền ngoại bào được kết hợp với vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với bên ngoài vùng ngoại bào và được ghép cặp trên khung cấu trúc mà cho phép mỗi vùng biến đổi liên kết với các kháng nguyên riêng biệt.

Dạng kháng thể đặc hiệu đôi ví dụ mà có thể được sử dụng trong theo sáng chế liên quan đến việc sử dụng miền C_{H3} của globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền C_{H3} của Ig thứ hai, trong đó các miền C_{H3} thứ nhất và thứ hai khác nhau bởi ít nhất là một axit amin, và trong đó ít nhất là một sự khác biệt về axit amin sẽ làm giảm khả năng liên kết của kháng thể đặc hiệu đôi với protein A khi so sánh với kháng thể đặc hiệu đôi thiếu sự khác biệt về axit amin. Theo một phương án, miền C_{H3} của globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất liên kết với Protein A và miền C_{H3} của Ig thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc triệt tiêu liên kết của protein A như cải biến H95R (bằng cách đánh số exon IMGT; H435R bằng cách đánh số EU). Miền C_{H3} thứ hai còn có thể bao gồm cải biến Y96F (bằng IMGT; Y436F bằng EU). Các cải biến khác có thể được phát hiện thấy trong miền C_{H3} thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (bằng IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I bằng EU) đối với trường hợp là các kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I bằng EU) đối với trường hợp các kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (bằng IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I bằng EU) đối với trường hợp IgG4 các kháng thể. Các biến

thể của dạng kháng thể đặc hiệu đôi đã mô tả ở trên được dự định trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ khác về các dạng đặc hiệu đôi có thể được sử dụng trong theo sáng chế bao gồm, không giới hạn ở, *ví dụ*, các dạng đặc hiệu đôi dựa trên scFv hoặc thể hai, các thể dung hợp IgG-scFv, vùng biến đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, chia trong ổ, chuỗi nhẹ phổ biến (*ví dụ*, chuỗi nhẹ phổ biến có dạng chia trong ổ, v.v.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác động kép, và các dạng đặc hiệu đôi Mab² (*Xem*, ví dụ tài liệu: Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu được trích dẫn ở đây, để xem các dạng nêu trên). Các kháng thể đặc hiệu đôi có thể cũng được xây dựng cấu trúc sử dụng việc liên hợp peptit/axit nucleic, *ví dụ*, trong đó các axit amin không có trong tự nhiên có tính phản ứng hóa học chéo được sử dụng để tạo ra thể liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu điểm mà sau đó tự lắp ráp thành các phức hợp đa thể có thành phần, hóa trị và hình học xác định. (*Xem*, ví dụ tài liệu: Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Dùng trong điều trị bệnh và các dạng bào chế

Sáng chế đề xuất các dược phẩm trị liệu chứa các kháng thể kháng C5 hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Các dược phẩm trị liệu theo sáng chế sáng chế sẽ được dùng với các chất mang, các tá dược thích hợp, và các chất khác mà có thể được kết hợp vào trong các dạng bào chế để tạo ra việc vận chuyển, phân phối, độ dung nạp và các yếu tố khác được cải thiện. Rất nhiều dạng bào chế thích hợp có thể được tìm thấy trong các công thức đã biết đối với tất cả các dược sĩ: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dạng bào chế này bao gồm, ví dụ, bột, cao, thuốc mỡ, mứt, sáp, dầu, chất lỏng, lipid (cation hoặc anion) chứa các dạng túi (như LIPOFECTIN™), thể liên hợp ADN, cao hấp phụ khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, sáp cacbon dạng nhũ tương, (các polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau), các gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa sáp cacbon. Cũng xem tài liệu: Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều kháng thể có thể thay đổi phụ thuộc vào độ tuổi và cân nặng chiều cao của đối tượng được dùng, bệnh, tình trạng bệnh cần điều trị, đường dùng và các yếu tố

khác tương tự. Khi kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở bệnh nhân là người lớn, hoặc để ngăn ngừa bệnh này thì sẽ thuận tiện hơn nếu dùng kháng thể theo sáng chế thuần ở liều đơn khoảng từ 0,1 đến khoảng 100 mg/kg cân nặng cơ thể, tốt hơn nữa là khoảng 5 đến khoảng 80, khoảng 10 đến khoảng 70, hoặc khoảng 20 đến khoảng 50 mg/kg cân nặng cơ thể. Phụ thuộc vào mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể được dùng ở liều thứ nhất ít nhất vào khoảng 0,1 mg đến khoảng 800 mg, khoảng 1 đến khoảng 600 mg, khoảng 5 đến khoảng 500 mg, hoặc khoảng 10 đến khoảng 400 mg. Theo một số phương án nhất định, liều thứ nhất có thể được dùng trước khi dùng các liều thứ hai hoặc nhiều liều sau đó của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng với lượng liều thứ hai hoặc nhiều liều sau đó có thể gần bằng hoặc thấp hơn liều thứ nhất, trong đó các liều sau đó được dùng tách riêng ít nhất là 1 ngày đến 3 ngày; ít nhất là một tuần, ít nhất là 2 tuần; ít nhất là 3 tuần; ít nhất là 4 tuần; ít nhất là 5 tuần; ít nhất là 6 tuần; ít nhất là 7 tuần; ít nhất là 8 tuần; ít nhất là 9 tuần; ít nhất là 10 tuần; ít nhất là 12 tuần; hoặc ít nhất là 14 tuần.

Các hệ giải phóng khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để dùng được phẩm theo sáng chế, *ví dụ*, bao nang trong thể mỡ, các hạt cỡ micro, vi nang, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện các virus đột biến, việc nhập bào qua trung gian thụ thể (Xem, *ví dụ*, Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Các phương pháp để đưa vào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong da, qua da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, trong màng cứng và qua đường miệng. Dược phẩm này có thể được dùng bằng đường dùng thuận tiện, *ví dụ* bằng cách truyền hoặc tiêm liều lớn, bằng cách hấp thu qua các lớp biểu mô 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 chất có hoạt tính sinh học khác. Việc dùng có thể là toàn thân hoặc khu trú. Dược phẩm này có thể được cũng được phân phối trong dạng túi, cụ thể là trong thể mỡ (Xem, *ví dụ* tài liệu: Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Việc sử dụng các hạt nano để phân phối các kháng thể theo sáng chế cũng được dự định ở đây. Các hạt nano liên hợp với kháng thể có thể được dùng cho cả ứng dụng điều trị lẫn chẩn đoán. Các hạt nano liên hợp với kháng thể và các phương pháp tạo ra

và việc sử dụng đã được mô tả chi tiết trong tài liệu Arruebo, M., *et al.* 2009 (“Antibody -conjugated nanoparticles for biomedical applications” in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 100,1155/2009/439389), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các hạt nano có thể phát triển và được liên hợp với các kháng thể có mặt trong các dược phẩm để nhắm đích các tế bào. Các hạt nano để phân phối dược chất cũng đã mô tả trong, ví dụ, US 8257740, hoặc US 8246995, từng tài liệu được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng.

Trong một số 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 dùng. Theo phương án khác, các vật liệu polyme có thể được sử dụng. Theo phương án khác nữa, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở vị trí gần đích của dược phẩm này, theo đó chỉ cần dùng đến một phần của liều toàn thân.

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

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối dưới da hoặc trong tĩnh mạch bằng kim tiêm và xylanh chuẩn. Ngoài ra, liên quan đến việc phân phối dưới da, dụng cụ phân phối dạng bút sẵn sàng có các ứng dụng trong phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể được tái sử dụng hoặc dùng một lần.

Thiết bị phân phối dạng bút tái sử dụng thường sử dụng hộp chứa dược phẩm thay thế. Ngay sau khi toàn bộ dược phẩm bên trong hộp này được dùng và hộp này rỗng thì hộp rỗng này có thể dễ dàng được tháo ra và thay bằng một hộp chứa dược phẩm mới. Thiết bị phân phối dạng bút này sau đó có thể tái sử dụng. Trong thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần, không có hộp mực thay thế. Thay vào đó, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần này được điền đầy trước dược phẩm được chứa trong một bình chứa đặt bên trong thiết bị. Ngay khi bình chứa này được dùng hết dược phẩm, toàn bộ thiết bị này sẽ được thải bỏ.

Rất nhiều thiết bị phân phối dạng bút tái sử dụng được và thiết bị tự tiêm có các ứng dụng trong việc phân phối dưới da dược phẩm theo sáng chế. Các ví dụ bao gồm, nhưng chắc chắn không bị giới hạn ở bút AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), trong số nhiều loại khác. Các ví dụ về các thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần có các ứng dụng trong phân phối dưới da dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng chắc chắn không bị giới hạn ở bút SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), thiết bị tự tiêm SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), the PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), bút EPIPEN (Dey, L.P.) và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), trong số nhiều loại khác.

Thuận lợi hơn nếu các dược phẩm để dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa đã mô tả ở trên được bào chế thành các dạng liều trong các liều đơn vị thích hợp với liều lượng của thành phần có hoạt tính. Các dạng liều này trong liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, thuốc tròn, viên nang, dạng tiêm (ông tiêm), viên đạn, v.v.. Lượng kháng thể được bao gồm thường khoảng 5 đến khoảng 500 mg/dạng liều trong đơn vị liều; cụ thể ở dạng tiêm, tốt hơn nếu kháng thể có mặt với lượng khoảng 5 đến khoảng 300 mg và từ khoảng 10 đến khoảng 300 mg đối với các dạng liều khác.

Sử dụng các kháng thể trong điều trị bệnh

Các kháng thể theo sáng chế có tác dụng để điều trị, và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh gắn với C5 và/hoặc để làm giảm ít nhất là một triệu chứng gắn với bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh này. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể được dùng ở liều điều trị cho bệnh nhân mắc bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh gắn với C5.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng điều trị hoặc ngăn ngừa triệu chứng hoặc dấu hiệu của hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình (aHUS). Các triệu chứng và dấu hiệu của aHUS bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hoạt hóa tiểu cầu, tan huyết, bệnh lý vi mạch tắc nghẽn toàn thân (tạo thành các cục máu đông trong các tiểu mạch máu trong toàn bộ cơ thể) dẫn đến đột quỵ, đau tim, suy thận và/hoặc chết, bệnh thận giai đoạn cuối, tổn thương thận vĩnh viễn, đau bụng, phù, mệt mỏi, buồn nôn/nôn mửa, tiêu chảy, và thiếu máu trong bệnh lý vi mạch.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng để in điều trị hoặc ngăn ngừa triệu chứng hoặc dấu hiệu bệnh tiểu huyết sắc tố kịch phát về đêm (PNH). Các triệu chứng và dấu hiệu PNH bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phá hủy tế bào máu đỏ, chứng huyết khối (bao gồm chứng huyết khối tĩnh mạch sâu, thuyên tắc động mạch phổi), thiếu máu do tan huyết trong mạch, mất màu đỏ của nước tiểu, các triệu chứng thiếu mệt mỏi, thở ngắn, và tim đập nhanh, đau bụng và khó nuốt.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 được chọn từ nhóm gồm có các rối loạn thần kinh, các rối loạn của thận, đa xơ cứng, đột quỵ, hội chứng Guillain Barre, tổn thương não do chấn thương, bệnh Parkinson, các rối loạn do hoạt hóa bổ thể không thích hợp hoặc không mong muốn, các biến chứng thẩm tách máu, thải bỏ mảnh ghép khác loại siêu cấp tính, thải bỏ mảnh ghép ngoại lai, độc tính do interleukin gây ra trong khi điều trị bằng IL-2, các rối loạn viêm, viêm trong các bệnh tự miễn, bệnh Crohn, hội chứng suy hô hấp ở người trưởng thành, tổn thương do nhiệt bao gồm các vết bỏng hoặc chứng tổn thương do

lạnh giá, các tình trạng bệnh do tràn sau khi thiếu máu cục bộ, nhồi máu cơ tim, hội chứng rò ống mao quản, béo phì, đái tháo đường, bệnh Alzheimer, tâm thần phân liệt, đột quỵ, chứng động kinh, vữa xơ động mạch, viêm mạch, bệnh bong nước, viêm cầu thận C3, viêm cầu thận tăng sinh màng, tạo hình mạch bằng bóng can thiệp, hội chứng sau bơm trong kỹ thuật bắc cầu tim phổi hoặc bắc cầu thận, thẩm tách máu, thiếu máu cục bộ thận, tràn động mạch màng treo ruột sau khi tái cấu trúc động mạch chủ, các bệnh lây nhiễm hoặc nhiễm khuẩn, các rối loạn phức hợp miễn dịch và các bệnh tự miễn, bệnh lý thận do đái tháo đường, hội chứng Alport, suy thận tiến triển, các bệnh thận protein niệu, tổn thương tràn do thiếu máu cục bộ, viêm thận luput, bệnh lý tiểu cầu thận, viêm khớp dạng thấp, luput ban đỏ toàn thân (SLE), viêm thận SLE, viêm thận tăng sinh màng, thiếu máu do tan huyết, viêm tủy thị thần kinh, cấy ghép thận, thiếu hụt CD59 di truyền, bệnh vẩy nến, và bệnh nhược cơ. Theo các phương án nhất định khác, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu bệnh hoặc rối loạn gắn với C5 được chọn từ nhóm gồm có bệnh và rối loạn của phổi như chứng khó thở, ho ra máu, ARDS, hen, phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), khí phũng, thuyên tắc và nhồi máu động mạch phổi, sưng phổi, bệnh bụi gây xơ hóa, tổn thương do bụi và khoáng chất trơ (ví dụ, silic oxit, bụi than, berili, và amiăng), xơ hóa phổi, bệnh bụi hữu cơ, tổn thương do hóa chất (do các khí và hóa chất gây kích ứng, ví dụ, clorin, phosgen, lưu huỳnh oxit, hydro sulfua, nito dioxit, amoniac, và axit clohydric), tổn thương do khói, tổn thương do nhiệt (ví dụ, bỏng, lạnh), hen, dị ứng, co thắt phế quản, viêm thành phế nang quá mẫn, các bệnh ký sinh trùng, hội chứng Goodpasture, viêm mạch phổi, phù mạch di truyền, và viêm gắn với phức hợp miễn dịch.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng để điều trị cho các đối tượng bị mắc bệnh về mắt như thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi (AMD), phù điểm vàng do đái tháo đường (DME), bệnh thận do đái tháo đường, bệnh sinh mạch mắt (tạo hệ mạch mới trong mắt ảnh hưởng đến mô màng mạch, màng sàng hoặc màng lưới), teo cơ địa lý (GA), nhược cơ và viêm tủy thị thần kinh. Các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng để điều trị hoặc để làm giảm ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu AMD khô hoặc AMD ướt. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng trong việc ngăn ngừa hoặc làm chậm việc mất thị

lực. Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng làm giảm chất lắng cặn trong mắt của đối tượng mắc AMD khô. Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế có tác dụng trong việc ngăn ngừa hoặc làm giảm/làm chậm tốc độ mất thị lực ở đối tượng mắc AMD.

Một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được dùng để làm giảm hoặc ngăn ngừa hoặc giảm bớt mức độ trầm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng hoặc tình trạng bệnh/dấu hiệu của bệnh hoặc rối loạn của mắt. Các kháng thể có thể được dùng để làm giảm hoặc giảm bớt mức độ trầm trọng của ít nhất là một triệu chứng bao gồm, bao gồm nhưng không giới hạn ở, mất thị lực, méo thị lực, khó điều chỉnh về các mức ánh sáng thấp, tầm nhìn ở tâm bị cong, tăng tình trạng sương mù tại tâm/toàn bộ tầm nhìn, xuất hiện chất lắng cặn trong mắt (các khối tích tụ rất nhỏ của vật liệu ngoại bào mà cấu tạo nên võng mạc), các thay đổi sắc tố, thị lực bị biến dạng ở dạng loạn thị hình thể trong đó mạng lưới các đường thẳng xuất hiện dạng sóng và các phần của mạng lưới này có thể xuất hiện các ô trống, rỉ dịch (xuất tiết trong mắt, như mắt, các dịch dưới màng lưới/dưới-RPE/trong võng mạc), phục hồi chậm chức năng nhìn sau khi tiếp xúc với ánh sáng chói (phép thử tập trung ánh sáng (photostress)), teo cơ khởi phát và teo cơ địa lý, giảm mạnh độ rõ của hình ảnh quan sát (hai độ hoặc cao hơn), ví dụ, 20/20 đến 20/80, các thay đổi trong giá trị đo thị trường tăng độ nhạy của cảm giác chiếm ưu thế (đối với AMD ướt), thị lực mờ, mất dần thị lực trung tâm (đối với các đối tượng bị thoái hóa điểm vàng không tiết dịch, khởi phát nhanh việc mất thị lực (thường bị rò rỉ và chảy máu ở các mạch máu bất thường ở các đối tượng bị thoái hóa điểm vàng có tiết dịch, ám điểm trung tâm (bị bóng hoặc mất một số vùng quan sát), khó phân biệt màu sắc, đặc biệt là đi từ chỗ tối sang chỗ tối khác và từ một chỗ sáng sang một chỗ sáng khác, mất độ nhạy về sự tương phản, các đường thẳng dường như cong trong mạng lưới Amsler.

Cũng được dự định ở đây là việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế với mục đích ngăn ngừa cho các đối tượng có nguy cơ phát triển tình trạng thoái hóa điểm vàng như các đối tượng ở độ tuổi trên 50, các đối tượng có tiền sử gia đình bị thoái hóa điểm vàng, những người hút thuốc, và các đối tượng bị béo phì, mức cholesterol cao, bệnh tim mạch, hoặc ăn uống không lành mạnh.

Theo một phương án khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được dùng để bào chế được phẩm hoặc thuốc để điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh hoặc rối loạn gắn với C5. Theo phương án khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng làm liệu pháp bổ sung cùng với chất khác hoặc liệu pháp điều trị bất kỳ khác đã biết đối với người có kỹ năng trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hữu ích để điều trị hoặc làm giảm bệnh hoặc rối loạn gắn với C5.

Liệu pháp kết hợp

Các liệu pháp kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng C5 theo sáng chế và chất trị liệu bất kỳ bổ sung mà có thể được kết hợp theo cách thuận lợi với kháng thể theo sáng chế, hoặc với mảnh có hoạt tính sinh học của kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể theo sáng chế có thể kết hợp theo cách hợp đồng với một hoặc nhiều thuốc hoặc liệu pháp được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn gắn với C5. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp với chất trị liệu thứ hai để làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh nêu trên.

Phụ thuộc vào bệnh hoặc rối loạn gắn với C5, các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung bao gồm, bao gồm nhưng không giới hạn ở, chất chống đông (ví dụ, warfarin, aspirin, heparin, phenindione, fondaparinux, idraparinux, và các chất ức chế thrombin như argatroban, lepirudin, bivalirudin, hoặc dabigatran) được chất chống viêm (ví dụ, các corticosteroid, và các dược chất chống viêm không steroid), chất chống tăng huyết áp (ví dụ, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin), chất ức chế miễn dịch (ví dụ, vincristin, cyclosporin A, hoặc methotrexat), chất làm tan fibrin (ví dụ, aniclod, axit ϵ -aminocaproic, antipain-a₁, prostacyclin, và defibrotin), chất làm giảm mức lipid như chất ức chế hydroxymethylglutaryl CoA reductaza, chất kháng CD20 như rituximab, chất chống TNF như infliximab, chất chống tai biến ngập máu (ví dụ, magie sulfat), chất ức chế C3, hoặc chất chống huyết khối.

Theo một số phương án nhất định, chất trị liệu thứ hai này là kháng thể kháng protein C5 khác. Cũng được dự định ở đây là việc sử dụng tổ hợp (“hỗn hợp”) của các kháng thể có hoạt tính trung hòa hoặc ức chế phổ rộng đối với C5. Theo một số phương án, các kháng thể không cạnh tranh có thể được kết hợp lại và được dùng cho

đối tượng có nhu cầu. Theo một số phương án, các kháng thể này bao gồm hỗn hợp liên kết với các epitop khác biệt và không chồng lấp trên protein này. Các kháng thể này bao gồm hỗn hợp có thể phong bế C5 liên kết với C5 convertaza và/hoặc có thể ngăn ngừa/ức chế sự phân cắt của C5 thành C5a và C5b. Theo một số phương án nhất định, kháng thể thứ hai có thể có thời gian bán hủy lâu hơn trong huyết thanh người.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kết hợp với” có nghĩa là (các) thành phần bổ sung có tác dụng điều trị có thể được dùng trước, đồng thời với, hoặc sau khi dùng kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Thuật ngữ “kết hợp với” cũng bao gồm việc dùng liên tiếp hoặc đồng thời kháng thể kháng C5 và chất trị liệu thứ hai.

(Các) Thành phần bổ sung có tác dụng điều trị có thể được dùng cho đối tượng trước khi dùng kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất có thể được xem là “được dùng “trước” thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được dùng trước 1 tuần, trước 72 giờ, trước 60 giờ, trước 48 giờ, trước 36 giờ, trước 24 giờ, trước 12 giờ, trước 6 giờ, trước 5 giờ, trước 4 giờ, trước 3 giờ, trước 2 giờ, trước 1 giờ, trước 30 phút, trước 15 phút, trước 10 phút, trước 5 phút, trước hoặc ít hơn 1 phút trước khi dùng thành phần thứ hai. Theo các phương án khác, (các) thành phần bổ sung có tác dụng điều trị có thể được dùng cho đối tượng sau khi dùng kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất có thể được xem là được dùng “sau” thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được dùng sau 1 phút, sau 5 phút, sau 10 phút, sau 15 phút, sau 30 phút, sau 1 giờ, sau 2 giờ, sau 3 giờ, sau 4 giờ, sau 5 giờ, sau 6 giờ, sau 12 giờ, sau 24 giờ, sau 36 giờ, sau 48 giờ, sau 60 giờ, sau 72 giờ sau khi dùng thành phần thứ hai. Theo các phương án khác nữa, (các) thành phần bổ sung có tác dụng điều trị có thể được dùng cho đối tượng đồng thời với khi dùng kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Dùng “đồng thời”, cho các mục đích của sáng chế, bao gồm, *ví dụ*, khi kháng thể kháng C5 và thành phần bổ sung có tác dụng điều trị cho đối tượng ở dạng đơn liều, hoặc ở các dạng liều riêng biệt được dùng cho đối tượng trong vòng khoảng 30 phút hoặc chưa tới 30 phút so với thời điểm dùng thành phần kia. Nếu được dùng ở các dạng liều riêng biệt, thì mỗi dạng liều này có thể được dùng thông qua cùng đường dùng (*ví dụ*, cả kháng thể kháng C5 và thành phần bổ sung có tác dụng điều trị có thể được dùng trong tĩnh mạch, v.v.); theo cách khác, mỗi dạng liều

này có thể được dùng thông qua đường dùng khác nhau (*ví dụ*, kháng thể kháng C5 có thể được dùng trong tĩnh mạch, và thành phần bổ sung có tác dụng điều trị có thể được dùng qua đường miệng). Trong trường hợp bất kỳ, việc dùng các thành phần này ở dạng liều đơn, ở các dạng liều riêng biệt bằng cùng đường dùng hoặc ở các dạng liều riêng biệt bằng các đường dùng khác nhau đều được coi là “dùng đồng thời”, đối với các mục đích của sáng chế. Đối với các mục đích của sáng chế, việc dùng kháng thể kháng C5 "trước", "đồng thời với," hoặc "sau" (khi các thuật ngữ này được định nghĩa trên đây) khi dùng thành phần bổ sung có tác dụng điều trị được coi là việc dùng kháng thể kháng C5 "kết hợp với" thành phần bổ sung có tác dụng điều trị.

Sáng chế bao gồm được phẩm trong đó kháng thể kháng C5 theo sáng chế được cùng bào chế với hoặc nhiều (các) thành phần bổ sung có tác dụng điều trị như đã mô tả ở đoạn bất kỳ trong bản mô tả này.

Các chế độ dùng

Theo các phương án nhất định, liều đơn của kháng thể kháng C5 theo sáng chế (hoặc được phẩm bao gồm hỗn hợp của kháng thể kháng C5 và chất bổ sung có tác dụng điều trị bất kỳ được đề cập ở đây) có thể được dùng cho đối tượng có nhu cầu. Theo các phương án nhất định theo sáng chế, nhiều liều của kháng thể kháng C5 (hoặc được phẩm bao gồm hỗn hợp của kháng thể kháng C5 và chất bổ sung có tác dụng điều trị bất kỳ được đề cập ở đây) có thể được dùng cho đối tượng trong một khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc dùng lần lượt cho đối tượng nhiều liều của kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, "việc dùng lần lượt" có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng C5 được dùng cho đối tượng ở các thời điểm khác nhau, *ví dụ*, vào các ngày khác nhau mà cách nhau một khoảng thời gian xác định (*ví dụ*, giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế bao gồm các phương pháp bao gồm việc dùng lần lượt cho bệnh nhân một liều đơn ban đầu của kháng thể kháng C5, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng C5, và tùy ý sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng C5.

Các thuật ngữ "liều thứ nhất", "liều thứ hai" và "liều thứ ba" chỉ thứ tự tạm thời của việc dùng kháng thể kháng C5 theo sáng chế. Theo đó, "liều thứ nhất" là liều được

dùng vào thời điểm bắt đầu chế độ điều trị (cũng được gọi là "liều cơ sở"); "liều thứ hai" là các liều được dùng sau liều thứ nhất; và "liều thứ ba" là các liều được dùng sau liều thứ hai. Các liều thứ nhất, liều thứ hai và liều thứ ba tất cả đều có thể chứa cùng một lượng kháng thể kháng C5, nhưng thường có thể khác nhau về số lần sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, lượng kháng thể kháng C5 được bao gồm trong các liều thứ nhất, liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba có thể khác nhau (*ví dụ*, điều chỉnh tăng hoặc giảm khi cần) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án nhất định, hai hoặc nhiều hơn (*ví dụ*, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được dùng vào thời điểm bắt đầu chế độ điều trị dưới dạng "liều tải nạp", sau đó là các liều tiếp theo được dùng với tần suất ít hơn (*ví dụ*, "các liều duy trì").

Theo các phương án *ví dụ* nhất định theo sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được dùng từ 1 đến 48 giờ (*ví dụ*, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc lâu hơn) sau liều ngay trước đó. Cụm từ "liều ngay trước đó" khi được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa, trong một trình tự nhiều lần dùng, liều của kháng thể kháng C5 được dùng cho bệnh nhân trước khi dùng liều kế cận theo trình tự không có liều xen giữa.

Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm việc dùng cho bệnh nhân số lượng bất kỳ liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba kháng thể kháng C5. *Ví dụ*, theo các phương án nhất định, chỉ một liều thứ hai duy nhất được dùng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai liều thứ hai hoặc nhiều hơn hai (*ví dụ*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) được dùng cho bệnh nhân. Cũng như vậy, theo các phương án nhất định, chỉ một liều thứ ba duy nhất được dùng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai liều thứ ba hoặc nhiều hơn (*ví dụ*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) được dùng cho bệnh nhân.

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, tần suất dùng liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba cho bệnh nhân có thể thay đổi trong quá trình thực hiện chế độ điều trị. Tần suất dùng có thể cũng được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sĩ phụ trách phụ thuộc vào nhu cầu của cá nhân bệnh nhân sau khi xét nghiệm lâm sàng.

Sử dụng các kháng thể trong chẩn đoán

Các kháng thể kháng C5 theo sáng chế có thể được dùng để phát hiện và/hoặc đo mức C5 trong mẫu, *ví dụ*, cho mục đích chẩn đoán. Một số phương án dự định bao gồm việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế trong các thử nghiệm để phát hiện bệnh hoặc rối loạn gắn với C5. Ví dụ, thử nghiệm chẩn đoán cho C5 có thể bao gồm *ví dụ*, cho mẫu, thu được từ bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể kháng C5 theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng C5 này được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử thông báo hoặc được sử dụng làm phối tử bắt giữ để phân lập có chọn lọc C5 ra khỏi các mẫu thu được từ bệnh nhân. Theo cách khác, kháng thể kháng C5 không được đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai mà chính chúng được đánh dấu để phát hiện thấy. Chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử thông báo có thể được đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; nhóm phát huỳnh quang hoặc nhóm phát quang hóa học như florexin isothioxyanat, hoặc rhodamin; hoặc enzym như phosphatasa kiềm, β -galactosidaza, peroxidaza cải ngựa, hoặc luciferaza. Các thử nghiệm cụ thể được lấy làm ví dụ mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc đo mức C5 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch gắn kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (radioimmunoassay - RIA), và phân loại thể bào được hoạt hóa bằng huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting - FACS).

Các mẫu mà có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán C5 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc mẫu dịch bất kỳ có thể thu được từ bệnh nhân, mà chứa lượng có thể phát hiện của protein C5, hoặc các mảnh của nó, trong điều trị bình thường hoặc trong điều kiện bệnh lý. Thông thường, các mức protein C5 trong một mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khỏe mạnh (*ví dụ*, bệnh nhân không bị mắc bệnh gắn với C5) sẽ được đo để ban đầu thiết lập được mức cơ sở, hoặc mức chuẩn của C5. Mức C5 cơ sở này sau đó có thể được so sánh với mức C5 đo được trong các mẫu thu được từ các cá thể bị nghi ngờ mắc tình trạng bệnh gắn với C5, hoặc các triệu chứng gắn với tình trạng bệnh này.

Các kháng thể đặc hiệu đối với protein C5 có thể không chứa chất đánh dấu hoặc nhóm bổ sung, hoặc chúng có thể chứa chất đánh dấu hoặc nhóm ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Theo một phương án, chất đánh dấu hoặc nhóm này là biotin.

Trong thử nghiệm liên kết, vị trí của chất đánh dấu (nếu có) có thể xác định hướng của peptit so với bề mặt khi này peptit được liên kết. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ avidin, peptit chứa biotin ở đầu tận cùng N sẽ được định hướng sao cho phần nằm ở đầu tận cùng C của peptit này sẽ cách xa bề mặt.

Các phương án chọn lựa

Các phương án được chọn theo sáng chế bao gồm các phương án sau:

Trong phương án 1, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết đặc hiệu với yếu tố bổ thể protein 5 (C5), trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong C5 (SEQ ID NO: 359), như được xác định bằng phương pháp trao đổi hydro/đoteri.

Trong phương án 2, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong chuỗi alpha và/hoặc chuỗi beta của C5, như được xác định bằng phương pháp trao đổi hydro/đoteri.

Trong phương án 3, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo các phương án 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng không tương tác với axit amin của vùng anaphylatoxin C5a của C5, như được xác định bằng phương pháp trao đổi hydro/đoteri.

Trong phương án 4, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm trong SEQ ID NO: 360 và/hoặc SEQ ID NO: 361, như được xác định bằng phương pháp trao đổi hydro/đoteri.

Trong phương án 5, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tương tác với trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có (a) các axit amin 59 từ 1 đến 599 của SEQ ID NO: 359; (b) các axit amin 593 đến 599 của SEQ ID NO: 359; (c) các axit amin 775 đến 787 của

SEQ ID NO: 359; (d) các axit amin 775 đến 794 của SEQ ID NO. 359; và (e) các axit amin 779 đến 787 của SEQ ID NO: 359.

Trong phương án 6, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tương tác với ít nhất là năm axit amin nằm trong trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 360 và 361.

Trong phương án 7, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tương tác với trình tự axit amin SEQ ID NO: 360 và 361.

Trong phương án 8, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết đặc hiệu với yếu tố bổ thể protein 5 (C5), trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng tương tác với ít nhất là một trong số các gốc axit amin sau đây: N591, M592, A593, T594, G595, M596, D597, S598, W599, W775, E776, V777, H778, L779, V780, P781, R782, R783, K784, Q785, L786, Q787, F788, A789, L790, P791, D792, S793, hoặc L794 của SEQ ID NO: 359.

Trong phương án 9, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 8, trong đó kháng thể có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây: (a) có nồng độ trong huyết thanh lớn hơn 10 $\mu\text{g/mL}$ cho tới tận ngày thứ 70 khi dùng cho khỉ đầu chó; (b) phong bế quá trình tan huyết thông qua con đường cổ điển (CP) cho tới tận ngày thứ 35 khi dùng cho khỉ đầu chó, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*; (c) phong bế quá trình tan huyết thông qua con đường thay thế (AP) cho tới tận ngày thứ 35 khi dùng cho khỉ đầu chó, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*; (d) có thời gian bán hủy lớn hơn 10 ngày ở *khỉ đầu chó*; (e) có nồng độ trong huyết thanh lớn hơn 10 $\mu\text{g/mL}$ cho tới tận ngày thứ 40 khi dùng cho C5 ở chuột được làm giống người; (f) quá trình tan huyết CP cho tới tận ngày thứ 30 khi dùng cho C5 ở chuột được làm giống người, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*; và (g) có thời gian bán hủy lớn hơn 10 ngày ở C5 ở chuột được làm giống người.

Trong phương án 10, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 9, trong đó kháng thể có các đặc tính bổ sung được chọn từ nhóm gồm có: (a) là kháng thể đơn dòng hoàn chỉnh ở người; (b) liên kết với C5 ở người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 0,9nM ở 25°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (c) liên kết với C5 ở người với K_D nhỏ hơn 0,3nM ở 37°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (d) liên kết với C5 ở khỉ với K_D nhỏ hơn 65nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (e) liên kết với biến thể R885H của C5 ở người (SEQ ID NO: 356) với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (f) liên kết với biến thể R885C của C5 ở người (SEQ ID NO: 357) với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (g) phong bế quá trình tan huyết thông qua con đường cổ điển (CP) qua trung gian C5 ở người hơn 95% và với IC_{50} nhỏ hơn 6nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP; (h) phong bế quá trình tan huyết qua con đường thay thế (AP) qua trung gian C5 ở người lớn hơn 70% và với IC_{50} nhỏ hơn 165nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP; (i) ức chế quá trình tan huyết CP qua trung gian C5 ở khỉ xanh Châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 185nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP; (j) ức chế quá trình tan huyết AP qua trung gian C5 ở khỉ xanh Châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 235nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP; (k) ức chế quá trình tan huyết CP qua trung gian C5 ở khỉ đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 145nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP; và (l) ức chế quá trình tan huyết AP qua trung gian C5 ở khỉ đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 30nM, như đo được trong thử nghiệm làm tan huyết AP.

Trong phương án 11, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 10, trong đó the kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm three vùng quyết định tính bổ trợ của chuỗi nặng (CDR) (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong một trình tự bất kỳ của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được liệt kê trong Bảng 1; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong một trình tự bất kỳ của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được liệt kê trong Bảng 1.

Trong phương án 12, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 11, bao gồm: (a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 124, 140, 148, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 276, 292, 308, 324, và 340; (b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 126, 142, 150, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 278, 294, 310, 326, và 342; (c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 128, 144, 152, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 296, 312, 328, và 344; (d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 116, 132, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 284, 300, 316, 332, và 348; (e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 118, 134, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 286, 302, 318, 334, và 350; và (f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 120, 136, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 288, 304, 320, 336, và 352.

Trong phương án 13, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 12 bao gồm HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự HCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Trong phương án 14, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 13 bao gồm LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có các trình tự LCVR được liệt kê trong Bảng 1.

Trong phương án 15, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 từ 1 đến 14 bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 98/114, 122/106, 98/130, 138/106, 146/106, 122/130, 146/114, 146/130, 138/130, 154/162, 170/178, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/258, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, và 338/346.

Trong phương án 16, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 từ 1 đến 15 bao gồm ba CDR nằm trong HCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 50, 98, 138, và 202; và ba CDR nằm trong LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 58, 106, và 210.

Trong phương án 17, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 16 bao gồm các CDR được chọn từ nhóm gồm có: (a) SEQ ID NO: 52, 54, 56, 60, 62, và 64; (b) SEQ ID NO: 100, 102, 104, 108, 110, và 112; (c) SEQ ID NO: 140, 142, 144, 108, 110, và 112; và (d) SEQ ID NO: 204, 206, 208, 212, 214, và 216.

Trong phương án 18, sáng chế bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 17 bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 50/58, 98/106, 138/106, và 202/210.

Trong phương án 19, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà cạnh tranh để liên kết với C5 với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 17.

Trong phương án 20, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết với cùng epitop với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 17.

Trong phương án 21, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 9 hoặc 10 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có không nhiều hơn 5 thay thế axit amin.

Trong phương án 22, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 21, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được liệt kê trong Bảng 1 có không nhiều hơn 5 thay thế axit amin.

Trong phương án 23, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 9 hoặc 10 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có mức độ đồng nhất về trình tự với SEQ ID NO: 98 ít nhất là 90%.

Trong phương án 24, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng theo phương án 23 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ đồng nhất về trình tự với SEQ ID NO: 106 ít nhất là 90%.

Trong phương án 25, sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà phong bế sự phân cắt C5 thành C5a và C5b bao gồm ba CDR của HCVR, trong đó HCVR này có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 122, 138, 146, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 274, 290, 306, 322, và 338; và ba CDR của LCVR, trong đó LCVR này có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 114, 130, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 282, 298, 314, 330, và 346.

Trong phương án 26, sáng chế bao gồm dược phẩm bao gồm kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết với C5 theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 25 và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

Trong phương án 27, sáng chế bao gồm phân tử polynucleotit đã phân lập bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa HCVR của kháng thể như nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 25.

Trong phương án 28, sáng chế bao gồm phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa LCVR của kháng thể như nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 25.

Trong phương án 29, sáng chế bao gồm vector bao gồm trình tự polynucleotit theo phương án 27 hoặc 28.

Trong phương án 30, sáng chế bao gồm tế bào biểu hiện vector theo phương án 29.

Trong phương án 31, sáng chế bao gồm phương pháp ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm ít nhất là một triệu chứng hoặc dấu hiệu bệnh hoặc rối loạn gắn với C5, phương pháp này bao gồm việc dùng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 25 cho đối tượng có nhu cầu.

Trong phương án 32, sáng chế bao gồm phương pháp của phương án 31, trong đó bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm gồm có hội chứng tan huyết tăng ure máu không điển hình (aHUS), bệnh tiểu huyết sắc tố kịch phát về đêm (PNH), thoái hóa

điểm vàng liên quan đến tuổi, teo cơ địa lý, nhược cơ, viêm tủy thị thần kinh, đa xơ cứng, đột quỵ, hội chứng Guillain Barre, tổn thương não do chấn thương, bệnh Parkinson, các rối loạn do hoạt hóa bổ thể không thích hợp hoặc không mong muốn, các biến chứng thẩm tách máu, thải bỏ mảnh ghép khác loại siêu cấp tính, thải bỏ mảnh ghép ngoại lai, độc tính do intoleukin gây ra trong khi điều trị bằng IL-2, các rối loạn viêm, viêm trong các bệnh tự miễn, bệnh Crohn, hội chứng suy hô hấp ở người trưởng thành, tổn thương do nhiệt bao gồm các vết bỏng hoặc chứng tổn thương do lạnh giá, các tình trạng bệnh do tràn sau khi thiếu máu cục bộ, nhồi máu cơ tim, hội chứng rò ống mao quản, béo phì, đái tháo đường, bệnh Alzheimer, tâm thần phân liệt, đột quỵ, chứng động kinh, vữa xơ động mạch, viêm mạch, bệnh bong nước, viêm cầu thận C3, viêm cầu thận tăng sinh màng, bệnh lý thận do đái tháo đường, hội chứng Alport, suy thận tiến triển, các bệnh thận protein niệu, tổn thương tràn do thiếu máu cục bộ, viêm thận luput, tạo hình mạch bằng bóng can thiệp, hội chứng sau bơm trong kỹ thuật bắc cầu tim phổi hoặc bắc cầu thận, thẩm tách máu, thiếu máu cục bộ thận, tràn động mạch màng treo ruột sau khi tái cấu trúc động mạch chủ, các bệnh lây nhiễm hoặc nhiễm khuẩn, các rối loạn phức hợp miễn dịch và các bệnh tự miễn, các rối loạn của thận, viêm khớp dạng thấp, luput ban đỏ toàn thân (SLE), viêm thận SLE, viêm thận tăng sinh, thiếu máu do tan huyết, hen, phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), khí phế quản, thuyên tắc và nhồi máu động mạch phổi, sung phổi, và bệnh nhược cơ.

Trong phương án 33, sáng chế bao gồm phương pháp của phương án 31, trong đó bệnh hoặc rối loạn là aHUS.

Trong phương án 34, sáng chế bao gồm phương pháp của phương án 31, trong đó bệnh hoặc rối loạn là PNH.

Trong phương án 35, sáng chế bao gồm phương pháp của một phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 34, trong đó được phẩm được dùng với mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị cho đối tượng có nhu cầu.

Trong phương án 36, sáng chế bao gồm phương pháp của một phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 35, trong đó được phẩm được dùng kết hợp với chất trị liệu thứ hai.

Trong phương án 37, sáng chế bao gồm phương pháp của phương án 36, trong đó chất trị liệu thứ hai này được chọn từ nhóm gồm có chất chống đông, được chất

chống viêm, chất chống tăng huyết áp, chất ức chế miễn dịch, chất làm hạ mức lipit, chất kháng CD20 như rituximab, chất chống TNF như infliximab, chất chống tai biến ngập máu, chất ức chế C3, kháng thể kháng C5 thứ hai, và chất chống huyết khối.

Trong phương án 38, sáng chế bao gồm phương pháp của một phương án bất kỳ trong số các phương án từ 31 đến 37, trong đó được phẩm được dùng dưới da, trong tĩnh mạch, trong da, trong màng bụng, qua đường miệng, trong cơ hoặc trong sọ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dựa vào các ví dụ sau, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu được hoàn toàn sáng chế và phần mô tả về cách tạo ra và sử dụng phương pháp và được phẩm theo sáng chế và các ví dụ này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế. Các nỗ lực đã được thực hiện để đảm bảo một cách chính xác liên quan đến các số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.) nhưng một vài sai số và độ lệch qua thử nghiệm nên được xét đến. Trừ khi có quy định khác, các phần là các phần theo trọng lượng, trọng lượng phân tử là trọng lượng phân tử trung bình, nhiệt độ tính theo độ C, nhiệt độ trong phòng là 25°C và áp suất bằng hoặc gần bằng áp suất không khí.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể người kháng protein yếu tố bổ sung 5 (C5)

Kháng thể người kháng C5 protein được tạo ra ở chuột VELOCIMMUNE® bao gồm ADN mã hoá vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kapa của người. Chuột được gây miễn dịch với C5 protein tinh khiết huyết thanh người (Calbiochem Cat #20-4888).

Kiểm tra sự đáp ứng miễn dịch kháng thể bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu C5. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn, gom tế bào lá lách và dung hợp với tế bào u tủy của chuột để bảo tồn khả năng sống của chúng và tạo ra dòng tế bào lai. Sàng lọc và chọn dòng tế bào lai này để nhận biết các dòng tế bào mà tạo ra kháng thể đặc hiệu C5. Sử dụng dòng tế bào này để thu được vài kháng thể kháng C5 (nghĩa là, kháng thể có miền biến đổi của người và miền cố định của chuột); các kháng thể lấy làm ví dụ được tạo ra theo cách này được ký hiệu là H2M11683N và H2M11686N.

Kháng thể kháng C5 cũng được phân lập trực tiếp từ tế bào B chuột dương tính kháng nguyên mà không dung hợp với tế bào u tủy, như được mô tả trong patent Mỹ số 7582298, nội dung của patent Mỹ này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Bằng cách sử dụng phương pháp này, thu được vài kháng thể hoàn toàn của người kháng C5 (tức là kháng thể có miền biến đổi của người và miền cố định của người); các kháng thể lấy làm ví dụ được tạo ra theo cách này được ký hiệu là H4H12159P, H4H12161P, H4H12163P, H4H12164P, H4H12166P, H4H12167P, H4H12168P, H4H12169P, H4H12170P, H4H12171P, H4H12175P, H4H12176P2, H4H12177P2 và H4H12183P2.

Các đặc tính sinh học của các kháng thể lấy làm ví dụ được tạo ra theo các phương pháp của ví dụ này được mô tả một cách chi tiết trong các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 2: Axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và trình tự nucleotit

Bảng 1 đưa ra ký hiệu nhận biết trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và CDR của kháng thể được chọn kháng C5 của sáng chế.

Bảng 1: Ký hiệu nhận biết trình tự axit amin

	SEQ ID NO:							
Xác định kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H2M11683N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M11686N	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H12159P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H12161P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H12163P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H12164P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H12166P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H12166P2	98	100	102	104	114	116	118	120
H4H12166P3	122	124	126	128	106	108	110	112
H4H12166P4	98	100	102	104	130	132	134	136
H4H12166P5	138	140	142	144	106	108	110	112
H4H12166P6	146	148	150	152	106	108	110	112

H4H12166P7	122	124	126	128	130	132	134	136
H4H12166P8	146	148	150	152	114	116	118	120
H4H12166P9	146	148	150	152	130	132	134	136
H4H12166P10	138	140	142	144	130	132	134	136
H4H12167P	154	156	158	160	162	164	166	168
H4H12168P	170	172	174	176	178	180	182	184
H4H12169P	186	188	190	192	194	196	198	200
H4H12170P	202	204	206	208	210	212	214	216
H4H12171P	218	220	222	224	226	228	230	232
H4H12175P	234	236	238	240	242	244	246	248
H4H12176P2	250	252	254	256	258	260	262	264
H4H12177P2	266	268	270	272	258	260	262	264
H4H12183P2	274	276	278	280	282	284	286	288
H2M11682N	290	292	294	296	298	300	302	304
H2M11684N	306	308	310	312	314	316	318	320
H2M11694N	322	324	326	328	330	332	334	336
H2M11695N	338	340	342	344	346	348	350	352

Các ký hiệu nhận biết trình tự axit nucleic tương ứng được nêu trong bảng 2.

Bảng 2: Ký hiệu nhận biết trình tự axit nucleic

	SEQ ID NO:							
Xác định kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H2M11683N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M11686N	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H12159P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H12161P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H12163P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H12164P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H12166P	97	99	101	103	105	107	109	111

H4H12166P2	97	99	101	103	113	115	117	119
H4H12166P3	121	123	125	127	105	107	109	111
H4H12166P4	97	99	101	103	129	131	133	135
H4H12166P5	137	139	141	143	105	107	109	111
H4H12166P6	145	147	149	151	105	107	109	111
H4H12166P7	121	123	125	127	129	131	133	135
H4H12166P8	145	147	149	151	113	115	117	119
H4H12166P9	145	147	149	151	129	131	133	135
H4H12166P10	137	139	141	143	129	131	133	135
H4H12167P	153	155	157	159	161	163	165	167
H4H12168P	169	171	173	175	177	179	181	183
H4H12169P	185	187	189	191	193	195	197	199
H4H12170P	201	203	205	207	209	211	213	215
H4H12171P	217	219	221	223	225	227	229	231
H4H12175P	233	235	237	239	241	243	245	247
H4H12176P2	249	251	253	255	257	259	261	263
H4H12177P2	265	267	269	271	257	259	261	263
H4H12183P2	273	275	277	279	281	283	285	287
H2M11682N	289	291	293	295	297	299	301	303
H2M11684N	305	307	309	311	313	315	317	319
H2M11694N	321	323	325	327	329	331	333	335
H2M11695N	337	339	341	343	345	347	349	351

Thông thường, các kháng thể được dùng trong bản mô tả này theo các danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ "H4H", "H2M", v.v.), tiếp theo là các ký hiệu nhận biết theo số (ví dụ "11686," "12166," "12183," v.v., như được thể hiện trong Bảng 2), tiếp theo hậu tố "P," "P2," hoặc "N". Do đó, theo danh pháp này, trong bản mô tả này kháng thể có thể được dùng dưới dạng, ví dụ, "H2M11686N," "H4H12183P2," "H4H12168P," v.v. Các tiền tố H4H và H2M theo sự xác định kháng thể được sử dụng trong bản mô tả này thể hiện lớp kháng thể vùng Fc cụ thể. Ví dụ, kháng thể "H4H" có Fc IgG4 người bao gồm đột biến serin thành prolin trong vùng bản lề (S108P) để thúc đẩy quá

trình ổn định dime và kháng thể "H2M" có Fc IgG2 chuột (hoặc lớp kháng thể b) (tất cả các vùng biến đổi là hoàn toàn của người như được xác định bởi 'H' thứ nhất trong việc xác định kháng thể). Như sẽ được đánh giá cao bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, kháng thể có lớp kháng thể Fc cụ thể có thể được chuyển hoá thành kháng thể với lớp kháng thể Fc khác (ví dụ, kháng thể với Fc IgG1 chuột có thể được chuyển hoá thành kháng thể với IgG4 người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, các miền biến đổi (bao gồm CDR) – mà được xác định bởi các ký hiệu nhận biết theo số được thể hiện trong bảng 2 – vẫn sẽ giống nhau và các đặc tính gắn kết với kháng nguyên được dự định là giống nhau hoặc hầu như giống nhau bất chấp bản chất của miền Fc.

Theo một số phương án, các kháng thể được chọn có Fc IgG1 chuột được biến đổi thành các kháng thể Fc IgG4 người. Theo một phương án, miền Fc IgG4 bao gồm 2 sự thay đổi axit amin hoặc nhiều hơn như được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US20100331527.

Để tạo ra các kháng thể đột biến, các gốc khác nhau trong các vùng quyết định phân bù (CDR) của H4H12166P được tạo đột biến thành histidin để tạo ra 9 kháng thể đột biến, được nhận biết là H4H12166P2 đến H4H12166P10. Các đột biến histidin trong CDR được thể hiện tạo ra sự phụ thuộc độ pH gắn kết với kháng nguyên đích dẫn đến được động học được cải thiện (Igawa *et al.* 2010, Nat. Biotechnol. 28: 1203-1207).

Cấu trúc đối chứng được sử dụng trong các ví dụ sau

Các cấu trúc đối chứng sau (kháng thể kháng C5) có trong các thử nghiệm được bộc lộ trong bản mô tả này, ví dụ nhằm mục đích so sánh: "So sánh 1", kháng thể đơn dòng kháng C5 của người có trình tự V_H/V_L của kháng thể "h5G1.1" theo patent Mỹ số 6,355,245 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.); và "So sánh 2", kháng thể đơn dòng của người kháng C5 của người có trình tự V_H/V_L của kháng thể "8109" theo công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2013/0022615 (Novartis).

Ví dụ 3: Kháng thể gắn kết với C5 như xác định được bởi cộng hưởng Plasmon bề mặt

Hằng số phân ly cân bằng (trị số K_D) để C5 gắn kết với kháng thể tinh khiết kháng C5 được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học cộng hưởng

plasmon bề mặt theo thời gian thực trên thiết bị Biacore T200. Bề mặt cảm biến Biacore thu được bằng cách ghép cặp amin với kháng đơn dòng chuột kháng Fc người (GE Healthcare, # BR-1008-39) để bẫy kháng thể kháng C5 được biểu hiện với các vùng cố định Fc người. Các nghiên cứu gắn kết Biacore được thực hiện trong dung dịch đệm chạy HBST (0,01M HEPES độ pH=7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% thể tích Surfactant P20). C5 người thu được từ nguồn bán trên thị trường (EMD). Các thuốc thử C5 khác được biểu hiện với myc-myc-hexahistidin đầu C (sau đây được gọi là C5-mmh). Thuốc thử C5-mmh của người cũng được biểu hiện chứa các đột biến điểm histidin và xystein ở arginin 885 (sau đây lần lượt được gọi là C5 R885H-mmh và C5 R885C-mmh). Các nồng độ khác nhau của C5 người, C5 R885H-mmh người (SEQ ID No: 356), C5 R885C-mmh người (SEQ ID No: 357) và C5-mmh khi (SEQ ID No: 358) (nằm trong khoảng từ 100nM đến 1,23nM, pha loãng gấp 3 lần) được tạo ra trong dung dịch đệm chạy HBST được phun lên bề mặt bẫy kháng thể kháng C5 ở tốc độ dòng 30 μ L/phút. Sự kết hợp của tất cả thuốc thử C5 với mỗi kháng thể trong số các kháng thể đơn dòng đã bẫy được kiểm tra trong 3 phút và sự phân ly của chúng trong dung dịch đệm chạy HBST được kiểm tra trong 8 phút. Tất cả các thử nghiệm động học gắn kết được thực hiện ở 25°C hoặc 37°C. Hằng số kép hợp (k_a) và hằng số phân ly (k_d) động học được xác định bằng cách so khớp biểu đồ cảm biến theo thời gian thực với mô hình gắn kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm so khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly gắn kết (K_D) và nửa chu kỳ phân rã phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán dựa vào hằng số động học như: K_D (M) = k_d/k_a và $t_{1/2}$ (phút) = $\ln 2/(60 \times k_d)$

Các tham số động học gắn kết đối với sự gắn kết C5 người với các kháng thể kháng C5 ở 25°C và 37°C được thể hiện trong các bảng 3 và 4.

Bảng 3: Các tham số động học gắn kết của các kháng thể đơn dòng kháng C5 gắn kết với C5 người ở 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể được bày (RU)	100nM C5 người Gắn kết (RU)	k_a	k_d	KD	$t_{1/2}$
			(1/Ms)	(1/s)	(M)	(phút)
H4H11683N	231	439	4,17E+05	5,14E-05	1,23E-10	225
H4H12171P	51	64	1,49E+05	8,16E-05	5,49E-10	142
H4H12161P	38	64	2,58E+05	4,37E-05	1,70E-10	264
H4H12176P2	50	96	3,36E+05	6,75E-05	2,01E-10	171
H4H12163P	51	108	6,43E+05	2,08E-04	3,24E-10	55
H4H12167P	52	116	1,09E+06	1,31E-04	1,21E-10	88
H4H12175P	51	100	2,16E+05	1,96E-04	9,10E-10	59
H4H12159P	53	118	9,75E+05	7,13E-05	7,31E-11	162
H4H12164P	52	103	2,92E+05	8,84E-05	3,02E-10	131
H4H12168P	50	113	4,23E+05	4,75E-05	1,12E-10	243
H4H12169P	51	18	2,24E+05	4,40E-04	1,96E-09	26
H4H11686N	200	341	2,20E+05	3,31E-05	1,50E-10	349
H4H12170P	51	119	5,25E+05	6,79E-05	1,29E-10	170
H4H12177P2	47	60	6,56E+04	6,29E-05	9,59E-10	184
H4H12183P2	46	50	1,66E+05	2,70E-05	1,63E-10	427
H4H12166P	53	105	6,42E+05	1,10E-04	1,71E-10	105
H4H12166P2	53	95	8,26E+05	3,61E-04	4,38E-10	32
H4H12166P3	59	124	4,03E+05	4,65E-04	1,15E-09	25
H4H12166P4	49	92	4,46E+05	1,76E-04	3,95E-10	66
H4H12166P5	59	110	2,85E+05	3,28E-04	1,15E-09	35
H4H12166P6	64	131	4,89E+05	1,84E-04	3,75E-10	63
H4H12166P7	50	92	2,74E+05	1,01E-03	3,67E-09	11
H4H12166P8	50	91	4,84E+05	6,86E-04	1,42E-09	17
H4H12166P9	52	100	3,32E+05	2,64E-04	7,94E-10	44
H4H12166P10	49	69	1,57E+05	1,32E-03	8,38E-09	9
Comparator 1	232	250	9,69E+04	1,46E-04	1,51E-09	79
Comparator 2	117	170	2,62E+05	2,39E-04	9,12E-10	48

Bảng 4: Tham số động học gắn kết của các kháng thể đơn dòng kháng C5 gắn kết với C5 người ở 37°C

Kháng thể	Lượng kháng	100nM C5	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
-----------	-------------	----------	-------	-------	-------	-----------

	thể bầy (RU)	đã người Gắn kết (RU)	(1/Ms)	(1/s)	(M)	(phút)
H4H11683N	257	492	4,54E+05	2,41E-04	5,32E-10	48
H4H12171P	59	58	1,22E+05	7,62E-04	6,27E-09	15
H4H12161P	40	66	1,16E+05	1,15E-04	9,90E-10	101
H4H12176P2	38	71	1,47E+05	2,34E-04	1,59E-09	49
H4H12163P	65	139	9,11E+05	6,65E-04	7,29E-10	17
H4H12167P	75	153	1,29E+06	3,81E-04	2,95E-10	30
H4H12175P	74	132	2,96E+05	6,37E-04	2,15E-09	18
H4H12159P	70	145	1,04E+06	1,07E-04	1,03E-10	108
H4H12164P	66	140	3,96E+05	1,28E-04	3,23E-10	90
H4H12168P	34	12	2,50E+04	4,64E-04	1,85E-08	25
H4H12169P	59	65	1,15E+05	3,52E-04	3,06E-09	33
H4H11686N	206	406	3,33E+05	1,56E-04	4,69E-10	74
H4H12170P	34	55	2,97E+05	4,15E-04	1,40E-09	28
H4H12177P2	41	37	4,42E+04	5,78E-04	1,31E-08	20
H4H12183P2	29	30	4,30E+04	2,50E-04	5,81E-09	46
H4H12166P	69	127	8,80E+05	2,30E-04	2,62E-10	50
H4H12166P2	68	110	9,50E+05	1,23E-03	1,29E-09	9
H4H12166P3	86	147	6,12E+05	1,27E-03	2,07E-09	9
H4H12166P4	63	108	5,05E+05	4,69E-04	9,30E-10	25
H4H12166P5	76	129	4,40E+05	1,22E-03	2,77E-09	9
H4H12166P6	90	157	5,42E+05	4,74E-04	8,75E-10	24
H4H12166P7	64	105	3,49E+05	2,58E-03	7,39E-09	4
H4H12166P8	65	98	6,75E+05	2,09E-03	3,10E-09	6
H4H12166P9	76	122	3,75E+05	6,39E-04	1,70E-09	18
H4H12166P10	64	82	2,27E+05	3,14E-03	1,38E-08	4
So sánh 1	185	246	1,47E+05	5,30E-04	3,61E-09	22
So sánh 2	119	205	2,85E+05	6,57E-04	2,30E-10	18

C5-mmh khi gắn kết với kháng thể kháng C5 ở 25°C và 37°C được thể hiện trong các bảng 5 và 6.

Bảng 5: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng C5 với C5-mmh khi ở 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể đã bão (RU)	100nM C5-mmh khi Gắn kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H11683N	228	403	3,86E+05	2,47E-04	6,40E-10	47
H4H12171P	51	17	4,60E+04	2,26E-04	4,92E-09	51
H4H12161P	38	45	6,33E+04	2,48E-05	3,92E-10	465
H4H12176P2	50	69	1,82E+05	5,88E-05	3,22E-10	196
H4H12163P	50	98	3,11E+05	7,75E-04	2,49E-09	15
H4H12167P	52	111	4,19E+05	1,32E-04	3,15E-10	88
H4H12175P	51	59	6,42E+04	1,65E-03	2,57E-08	7
H4H12159P	53	116	3,54E+05	4,69E-05	1,33E-10	246
H4H12164P	51	66	1,27E+05	1,53E-03	1,20E-08	8
H4H12168P	50	86	1,73E+05	1,14E-04	6,60E-10	101
H4H12169P	51	22	1,64E+05	4,55E-03	2,78E-08	3
H4H11686N	196	247	1,57E+05	4,89E-04	3,11E-09	24
H4H12170P	51	92	2,62E+05	5,21E-05	1,99E-10	222
H4H12177P2	47	32	4,62E+04	9,92E-04	2,15E-08	12
H4H12183P2	47	23	4,88E+04	4,94E-04	1,01E-08	23
H4H12166P	52	90	2,05E+05	1,06E-03	5,15E-09	11
H4H12166P2	53	71	3,00E+05	3,16E-03	1,05E-08	4
H4H12166P3	59	72	1,68E+05	4,47E-03	2,66E-08	3
H4H12166P4	49	69	2,10E+05	1,78E-03	8,50E-09	6
H4H12166P5	59	56	1,44E+05	3,46E-03	2,40E-08	3
H4H12166P6	64	94	2,39E+05	2,66E-03	1,11E-08	4
H4H12166P7	50	36	1,36E+05	6,33E-03	4,65E-08	2
H4H12166P8	50	47	2,31E+05	4,99E-03	2,16E-08	2
H4H12166P9	52	55	1,70E+05	3,18E-03	1,87E-08	4
H4H12166P10	49	15	9,56E+04	6,16E-03	6,44E-08	2
So sánh 1*	228	11	N/A	N/A	3,11E-07	N/A

N/A= Không khả dụng; *SS= phân tích trạng thái không đổi

Bảng 6: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng C5 gắn kết với C5-mmh khi ở 37°C

Kháng thể	Lượng kháng thể đã bão (RU)	100nM C5-mmh khi Gắn kết (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/Ms)	(1/s)	(M)	(phút)
H4H11683N	192	303	5,35E+05	1,15E-03	2,16E-09	10
H4H12171P	59	78	5,56E+05	1,03E-03	1,85E-09	11

H4H12161P	41	53	1,34E+05	7,45E-04	5,56E-09	16
H4H12176P2	36	47	1,35E+05	1,29E-03	9,60E-09	9
H4H12163P	64	129	3,90E+05	1,25E-03	3,20E-09	9
H4H12167P	74	146	5,37E+05	2,89E-04	5,39E-10	40
H4H12175P	74	74	1,77E+05	2,76E-03	1,56E-08	4
H4H12159P	70	137	4,12E+05	5,50E-05	1,33E-10	210
H4H12164P	65	99	1,86E+05	1,17E-03	6,30E-09	10
H4H12168P	34	29	5,33E+04	6,76E-04	1,27E-08	17
H4H12169P	59	64	2,51E+05	3,61E-03	1,43E-08	3
H4H11686N	145	195	2,33E+05	2,07E-03	8,88E-09	6
H4H12170P	34	60	5,21E+05	8,71E-04	1,67E-09	13
H4H12177P2	41	27	1,50E+05	7,17E-03	4,77E-08	2
H4H12183P2	28	13	5,40E+04	6,37E-03	1,18E-07	2
H4H12166P	68	110	2,19E+05	1,87E-03	8,55E-09	6
H4H12166P2	68	83	3,93E+05	2,97E-03	7,56E-09	4
H4H12166P3	85	92	2,23E+05	2,92E-03	1,31E-08	4
H4H12166P4	62	80	2,23E+05	1,83E-03	8,20E-09	6
H4H12166P5	75	70	1,50E+05	3,13E-03	2,09E-08	4
H4H12166P6	90	112	2,53E+05	2,32E-03	9,18E-09	5
H4H12166P7	63	48	1,25E+05	2,41E-03	1,93E-08	5
H4H12166P8	64	53	2,03E+05	2,69E-03	1,33E-08	4
H4H12166P9	75	69	1,81E+05	2,61E-03	1,44E-08	4
H4H12166P10	63	24	6,60E+04	2,79E-03	4,22E-08	4
So sánh 1	132	4	NB	NB	NB	NB

C5 R885H-mmh người và C5 R885C-mmh người gắn kết với kháng thể kháng C5 ở 25°C lần lượt được thể hiện trong các bảng 7 và 8.

Bảng 7: Tham số động học gắn kết kháng thể đơn dòng kháng C5 gắn kết với C5 R885H-mmh người ở 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể đã bắt (RU)	100nM C5 R885H-mmh người Gắn kết (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/Ms)	(1/s)	(M)	(phút)
H4H11683N	183	118	5,26E+05	2,46E-04	4,68E-10	47
H4H12171P	119	51	6,59E+05	1,42E-04	2,16E-10	81
H4H12161P	105	199	8,36E+04	8,32E-05	9,96E-10	139
H4H12176P2	170	65	1,78E+05	2,17E-04	1,22E-09	53
H4H12163P	111	214	6,72E+05	4,34E-04	6,46E-10	27

H4H12167P	93	187	6,89E+05	2,98E-04	4,33E-10	39
H4H12175P	104	207	1,81E+05	1,98E-03	1,09E-08	6
H4H12159P	101	177	7,06E+05	1,76E-04	2,50E-10	66
H4H12164P	143	295	1,58E+05	1,87E-04	1,19E-09	62
H4H12168P	138	197	5,29E+04	2,14E-04	4,05E-09	54
H4H12169P	116	173	4,84E+05	7,09E-05	1,47E-10	163
H4H11686N	145	259	2,16E+05	1,06E-04	4,91E-10	109
H4H12170P	244	442	4,09E+05	1,61E-04	3,94E-10	72
H4H12177P2	137	232	1,48E+05	5,92E-04	4,01E-09	20
H4H12183P2	158	99	3,77E+04	4,37E-05	1,16E-09	264
H4H12166P	188	366	5,28E+05	2,12E-04	4,02E-10	54
So sánh 1	87	11	NB	NB	NB	NB
So sánh 2	118	249	1,08E+06	6,53E-04	6,06E-10	18

Bảng 8: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng C5 gắn kết với C5 R885C-mmh người ở 25°C

Kháng thể	Lượng kháng thể đã bão (RU)	100nM C5 R885C-mmh người Gắn kết (RU)	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
			(1/Ms)	(1/s)	(M)	(phút)
H4H11683N	174	116	4,99E+05	2,39E-04	4,79E-10	48
H4H12171P	109	51	3,79E+05	1,39E-04	3,66E-10	83
H4H12161P	103	147	1,30E+05	8,71E-05	6,72E-10	133
H4H12176P2	164	63	1,07E+05	2,18E-04	2,03E-09	53
H4H12163P	110	211	5,04E+05	4,32E-04	8,58E-10	27
H4H12167P	85	163	7,11E+05	2,94E-04	4,13E-10	39
H4H12175P	99	128	8,18E+04	1,55E-02	1,90E-07	1
H4H12159P	93	168	5,86E+05	1,69E-04	2,89E-10	68
H4H12164P	139	249	1,53E+05	1,82E-04	1,19E-09	63
H4H12168P	128	144	6,09E+04	1,99E-04	3,27E-09	58
H4H12169P	108	168	2,78E+05	6,99E-05	2,51E-10	165
H4H11686N	143	253	1,78E+05	9,49E-05	5,34E-10	122
H4H12170P	244	427	3,57E+05	1,60E-04	4,47E-10	72
H4H12177P2	138	177	1,00E+05	1,32E-03	1,32E-08	9
H4H12183P2	158	80	2,99E+04	2,20E-05	7,37E-10	525
H4H12166P	188	356	4,26E+05	2,07E-04	4,87E-10	56
So sánh 1	87	9	NB	NB	NB	NB
So sánh 2	117	241	1,17E+06	6,19E-04	5,30E-10	19

C5 R885H-mmh người và C5 R885C-mmh người gắn kết với kháng thể kháng C5 ở 37°C lần lượt được thể hiện trong các bảng 9 và 10.

Bảng 9: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng C5 gắn kết với C5 R885H-mmh người ở 37°C

Kháng thể	Lượng kháng thể đã bão (RU)	100nM C5 R885H-mmh người	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
		Gắn kết (RU)	(1/Ms)	(1/s)	(M)	(phút)
H4H11683N	49	81	5,48E+05	1,47E-03	2,69E-09	8
H4H12171P	59	80	5,92E+05	9,63E-04	1,63E-09	12
H4H12161P	41	54	1,18E+05	9,25E-04	7,84E-09	12
H4H12176P2	45	69	2,57E+05	9,58E-04	3,73E-09	12
H4H12163P	60	85	7,24E+05	2,90E-03	4,00E-09	4
H4H12167P	38	65	8,81E+05	2,57E-03	2,91E-09	5
H4H12175P	25	30	1,37E+05	9,50E-03	6,94E-08	1
H4H12159P	51	82	6,38E+05	9,48E-04	1,49E-09	12
H4H12164P	59	68	1,95E+05	1,06E-03	5,46E-09	11
H4H12168P	34	29	2,43E+04	1,23E-03	5,04E-08	9
H4H12169P	61	79	4,29E+05	7,39E-04	1,72E-09	16
H4H11686N	40	74	4,19E+05	8,00E-04	1,91E-09	14
H4H12170P	36	64	5,59E+05	8,39E-04	1,50E-09	14
H4H12177P2	45	51	2,76E+05	2,76E-03	1,00E-08	4
H4H12183P2	33	36	9,58E+04	7,12E-04	7,43E-09	16
H4H12166P	71	58	6,24E+05	1,31E-03	2,09E-09	9
So sánh 1	41	5	NB	NB	NB	NB
So sánh 2	23	47	8,39E+05	1,05E-03	1,25E-09	11

Bảng 10: Tham số động học gắn kết của kháng thể đơn dòng kháng C5 gắn kết với C5 R885C-mmh người ở 37°C

Kháng thể	Lượng kháng thể đã bão (RU)	100nM C5 R885C-mmh người	k_a	k_d	K_D	$t_{1/2}$
		Gắn kết (RU)	(1/Ms)	(1/s)	(M)	(phút)
H4H11683N	48	78	4,38E+05	1,43E-03	3,25E-09	8
H4H12171P	59	78	4,77E+05	9,57E-04	2,01E-09	12
H4H12161P	41	49	1,10E+05	9,01E-04	8,17E-09	13
H4H12176P2	44	55	1,41E+05	1,03E-03	7,32E-09	11

H4H12163P	59	83	5,66E+05	2,81E-03	4,97E-09	4
H4H12167P	38	64	6,84E+05	2,49E-03	3,64E-09	5
H4H12175P	25	4	1,12E+05	1,79E-02	1,59E-07	1
H4H12159P	51	68	5,61E+05	9,75E-04	1,74E-09	12
H4H12164P	59	64	1,77E+05	1,04E-03	5,85E-09	11
H4H12168P	34	21	6,38E+04	5,69E-04	8,90E-09	20
H4H12169P	61	75	3,29E+05	7,37E-04	2,24E-09	16
H4H11686N	39	69	2,84E+05	7,91E-04	2,78E-09	15
H4H12170P	36	61	4,24E+05	8,70E-04	2,05E-09	13
H4H12177P2	43	31	1,07E+05	5,07E-03	4,76E-08	2
H4H12183P2	31	25	5,12E+04	9,97E-04	1,95E-08	12
H4H12166P	72	54	4,91E+05	1,26E-03	2,56E-09	9
So sánh 1	41	2	NB	NB	NB	NB
So sánh 2	23	42	7,34E+05	1,07E-03	1,45E-09	11

Ở 25°C, tất cả 25 kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với C5 người với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 73pM đến 8,4nM như được thể hiện trong Bảng 3. Ở 37°C, kháng thể kháng C5 theo sáng chế gắn kết với C5 người với trị số K_D nằm trong khoảng từ 103pM đến 18,5nM như được thể hiện trong bảng 4. Ở 25°C, 25 trong số 25 kháng thể kháng C5 theo sáng chế được thử nghiệm gắn kết với C5-mmh khi với trị số K_D nằm trong khoảng từ 133pM đến 64nM như được thể hiện trong bảng 5. Ở 37°C, 25 trong số 25 kháng thể kháng C5 theo sáng chế được thử nghiệm gắn kết với C5-mmh khi với trị số K_D nằm trong khoảng từ 133pM đến 118nM như được thể hiện trong bảng 6. Ở 25°C, 16 trong số 16 kháng thể kháng C5 theo sáng chế được thử nghiệm gắn kết với C5 R885H-mmh người với trị số K_D nằm trong khoảng từ 147pM đến 10,9nM như được thể hiện trong bảng 7. Ở 25°C, 16 trong số 16 kháng thể kháng C5 theo sáng chế được thử nghiệm gắn kết với C5 R885C-mmh người với trị số K_D nằm trong khoảng từ 251pM đến 190nM như được thể hiện trong bảng 8. Ở 37°C, 16 trong số 16 kháng thể kháng C5 theo sáng chế được thử nghiệm gắn kết với C5 R885H-mmh người với trị số K_D nằm trong khoảng từ 1,49nM đến 69,4nM như được thể hiện trong bảng 9. Ở 25°C, 16 trong số 16 kháng thể kháng C5 theo sáng chế được thử nghiệm gắn kết với C5 R885C-mmh người với trị số K_D nằm trong khoảng từ 1,74nM đến 159nM như được thể hiện trong bảng 10.

Ví dụ 4: Kháng thể gắn kết với C5 qua độ pH khác

Tác dụng của độ pH đối với tốc độ phân ly của C5 tái tổ hợp của người gắn kết với các kháng thể đơn dòng tinh khiết kháng C5 được xác định bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt theo thời gian thực sử dụng thiết bị Biacore T200. Trước tiên, bề mặt cảm biến Biacore được tạo dẫn xuất bằng cách cho amin ghép cặp với kháng thể đơn dòng chuột kháng Fc người (GE, # BR-1008-39) để bẫy kháng thể đơn dòng kháng C5 được biểu hiện với Fc IgG4 người. Tất cả các nghiên cứu gắn kết Biacore được thực hiện bằng cách sử dụng hai dung dịch đệm chạy PBS-T, độ pH=7,4 (0,01M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,15M NaCl, 0,05% thể tích Tween-20, điều chỉnh đến độ pH=7,4) và PBS-T, pH=6,0 (0,01M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,15M NaCl, 0,05% trọng lượng Tween-20, điều chỉnh đến độ pH=6,0). Các nồng độ khác nhau của C5 người (EMD, Catalog # 204888) hoặc C5.mmh khi (được tạo ra trong PBS-T, dung dịch đệm chạy độ pH=7,4 (nằm trong khoảng từ 100nM đến 11,11nM, pha loãng gấp 3 lần) được phun lên bề mặt bẫy kháng thể đơn dòng kháng C5 trong 3 phút ở tốc độ dòng 50µL/phút và sự phân ly của chúng trong hai dung dịch đệm chạy PBS-T, pH=7,4 và PBS-T, pH=6,0 được kiểm tra trong 6 phút. Tất cả thử nghiệm động học gắn kết được thực hiện ở 25°C và 37°C. Hằng số phân ly động học (k_d) được xác định bằng cách so khớp biểu đồ cảm biến theo thời gian thực với mô hình gắn kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm so khớp đường cong Scrubber 2.0c. Nửa chu kỳ phân rã gắn kết ($t_{1/2}$) được tính toán dựa vào k_d như sau:

$$t_{1/2} \text{ (phút)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Tỷ lệ nửa phân rã đối với C5 người gắn kết với các kháng thể đơn dòng kháng C5 khác nhau ở 25°C và 37°C trong hai dung dịch đệm chạy PBS-T, độ pH=7,4 và PBS-T, độ pH=6,0 được thể hiện trong các bảng 11 và 12.

Bảng 11: Tỷ lệ nửa phân rã của kháng thể kháng C5 được chọn đối với C5 người ở 25°C

mAb bẫy	Tỷ lệ $t_{1/2}$
	Độ pH=7,4 /độ pH=6,0
H4H12169P	IC

H4H12176P2	IC
H4H12161P	IC
H4H12159P	$\leq 0,3$
H4H12170P	$\leq 0,5$
H4H12166P	4,5
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0,6
H4H12164P	0,3
H4H12163P	1,2
H4H12175P	0,9
H4H12177P2	$\leq 0,5$
H4H12171P	0,6
H4H12168P	1,5
H4H12166P2	9,3
H4H12166P3	7,9
H4H12166P4	7,8
H4H12166P5	8,3
H4H12166P6	7,8
H4H12166P7	35
H4H12166P8	47
H4H12166P9	31
H4H12166P10	33
H4H11683N	2
H4H11686N	2

IC = không xác định

Bảng 12: Tỷ lệ nửa phân rã của kháng thể kháng C5 được chọn trên C5 người ở 37°C

mAb bấy	Tỷ lệ t $\frac{1}{2}$
	pH=7,4/pH=6,0
H4H12169P	IC
H4H12176P2	$\leq 0,4$
H4H12161P	$\leq 0,7$
H4H12159P	$\leq 0,2$
H4H12170P	$\leq 0,2$
H4H12166P	3,8
H4H12183P2	IC
H4H12167P	0,2
H4H12164P	$\leq 0,1$
H4H12163P	0,8
H4H12175P	0,9
H4H12177P2	1,3
H4H12171P	3,7
H4H12168P	1
H4H12166P2	7,3
H4H12166P3	6,6
H4H12166P4	7,6
H4H12166P5	7,6
H4H12166P6	8,2
H4H12166P7	21
H4H12166P8	36
H4H12166P9	28
H4H12166P10	19
H4H11683N	1,4
H4H11686N	0,8

IC = không xác định

Tỷ lệ nửa phân rã đối với C5 khi gắn kết với kháng thể đơn dòng kháng C5 khác nhau ở 25°C và 37°C trong hai dung dịch đệm chạy PBS-T, pH=7,4 và PBS-T, pH=6,0 được thể hiện trong bảng 13 và 14.

Bảng 13: Tỷ lệ nửa phân rã của kháng thể kháng C5 được chọn trên C5 khi ở 25°C

mAb bấy	Tỷ lệ $t_{1/2}$
	pH=7,4/ pH=6,0
H4H12169P	3,4
H4H12176P2	$\geq 9,1$
H4H12161P	IC
H4H12159P	1,2
H4H12170P	$\geq 1,7$
H4H12166P	18,5
H4H12183P2	5,8
H4H12167P	9,2
H4H12164P	2,9
H4H12163P	9,7
H4H12175P	3,6
H4H12177P2	3,7
H4H12171P	2,1
H4H12168P	3,8
H4H11683N	0,34
H4H11686N	0,37

IC = không xác định

Bảng 14: Tỷ lệ nửa phân rã của kháng thể kháng C5 được chọn trên C5 khi ở 37°C

mAb bấy	Tỷ lệ $t_{1/2}$
	pH=7,4/pH =6,0
H4H12169P	2
H4H12176P2	2,8
H4H12161P	10,7
H4H12159P	6,3
H4H12170P	4,7
H4H12166P	7,1
H4H12183P2	2,4
H4H12167P	4,4
H4H12164P	1,1
H4H12163P	3,3

H4H12175P	0,4
H4H12177P2	1,5
H4H12171P	4,7
H4H12168P	4
H4H11683N	0,7
H4H11686N	0,5

IC = không xác định

Như được thể hiện trong bảng 11 đến 14, kháng thể kháng C5 được chọn thể hiện sự gắn kết phụ thuộc độ pH, như được quan sát theo tỷ lệ $t\frac{1}{2}$.

Ví dụ 5: Sự cạnh tranh ngang Octet giữa kháng thể kháng C5

Sự cạnh tranh gắn kết giữa kháng thể đơn dòng kháng C5 (mAb) được xác định theo thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không đánh dấu theo thời gian thực trên cảm biến sinh học Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Toàn bộ thử nghiệm được thực hiện ở 25°C trong 0,01M HEPES pH=7,4, 0,15M NaCl, 0,05% trọng lượng Surfactant Tween-20, 0,1mg/mL BSA (dung dịch đệm Octet HBS-P) kèm lắc đĩa ở tốc độ 1000 vòng/phút. Để đánh giá xem liệu 2 kháng thể có khả năng cạnh tranh với nhau gắn kết với các epitop tương ứng của chúng trên C5 người (hC5 được tinh thể từ huyết tương người, EMD) hay không, khoảng 1,5nm mAb kháng C5 người trước tiên được bẫy trên kháng thể kháng hFc phủ đầu cảm biến sinh học Octet (Pall ForteBio Corp., # 18-5060) bằng cách nhúng đầu trong 3 vào trong giếng chứa 50µg/mL dung dịch chứa mAb kháng C5 người (dưới đây được dùng để chỉ mAb1). Tiếp theo, làm trung hoà đầu cảm biến sinh học bẫy kháng thể bằng mAb đối chứng lớp kháng thể H4H khối (dưới đây được dùng để chỉ mAb khối) bằng cách nhúng vào trong giếng chứa 200µg/mL dung dịch mAb khối trong 4 phút. Tiếp theo, đầu cảm biến sinh học được nhúng tiếp vào trong giếng chứa dung dịch đồng phức chứa 50nM hC5 và 1µM mAb kháng C5 người (dưới đây được dùng để chỉ mAb2), mà đã được ủ sơ bộ trong 2 giờ trong 4 phút. Rửa đầu cảm biến sinh học trong dung dịch đệm Octet HBS-P trong giữa mỗi bước thử nghiệm. Đáp ứng gắn kết theo thời gian thực được kiểm tra trong toàn bộ thử nghiệm và ghi đáp ứng gắn kết khi kết thúc mỗi bước. Hiệu chỉnh đáp ứng của mAb2 phức sơ bộ C5 người với mAb1 đối với gắn kết cơ bản, hành vi so sánh và cạnh

tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng C5 khác nhau được xác định.

Bảng 15 xác định rõ mối quan hệ của các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, độc lập theo thứ tự gắn kết.

Bảng 15: Sự cạnh tranh ngang giữa các cặp kháng thể kháng C5 được chọn

mAb thứ nhất (mAb1) bày bằng cách sử dụng cảm biến sinh học AHC Octet	Kháng thể mAb2 thể hiện cạnh tranh với mAb1
H4H12183P2	H4H12167P; H4H12166P; H4H12163P
H4H12167P	H4H12183P2; H4H12166P; H4H12163P
H4H12166P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12163P
H4H12163P	H4H12183P2; H4H12167P; H4H12166P
H4H12159P	H4H12169P; H4H11683N; H4H12170P
H4H12169P	H4H12159P; H4H11683N; H4H12170P
H4H11683N	H4H12159P; H4H12169P; H4H12170P
H4H12170P	H4H12159P; H4H12169P; H4H11683N
H4H12175P	H4H12177P2
H4H12177P2	H4H12175P
H4H12176P2	H4H12164P
H4H12164P	H4H12176P2
H4H12168P	Không xác định
H4H12161P	Không xác định
H4H11686N	Không xác định

Ví dụ 6: Sự ức chế của tính độc tế bào phụ thuộc yếu tố bổ sung qua trung gian C5 trong thử nghiệm sinh học tế bào B

Ví dụ này mô tả thử nghiệm sinh học để thử nghiệm vai trò của C5 bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD20 trong con đường bù cổ điển. Các kháng thể kháng CD20 điều trị kháng CD20 kháng nguyên bề mặt tế bào đặc hiệu tế bào B, đã được thể hiện dẫn đến CDC của tế bào B (Glennie *et al.* 2007, Mol. Immunol. 44: 3823-3837) và thử

thử nghiệm CDC sử dụng dòng tế bào biểu hiện CD20 đã được mô tả trên đây (Flieger *et al.* 2000, *Cell. Immunol.* 204: 55-63). Tế bào Daudi, dòng tế bào B người biểu hiện CD20, huyết thanh bảo tồn yếu tố bổ sung hoặc huyết thanh loại hết C5 với các biến thể C5 ngoại sinh và kháng thể kháng CD20 (kháng thể bao gồm VH/VL của “2F2” từ patent Mỹ số 8,529,902) được sử dụng để đánh giá vai trò của hoạt tính C5 trong CDC.

Đối với thử nghiệm sinh học C5 CDC, tạo hạt tế bào Daudi trên đĩa thử nghiệm 96 giếng ở 10.000 tế bào/giếng trong RPMI chứa 10% FBS, penixilin/streptomycin, L-glutamin, natri pyruvat và các axit amin không thiết yếu (môi trường đầy đủ RPMI) hoặc RPMI chứa 1%BSA, penixilin/streptomycin và L-glutamin (RPMI/BSA). Tất cả thử nghiệm đánh giá kháng thể kháng hC5 đột biến, cùng với việc đánh giá kháng thể không đột biến với C5 chứa huyết thanh người được thử nghiệm trong môi trường RPMI đầy đủ, trong khi các thử nghiệm đánh giá các kháng thể không đột biến với huyết thanh khỉ xanh châu Phi và các biến thể C5 người được thử nghiệm trong môi trường RPMI/BSA. Để đo CDC với huyết thanh người hoặc khỉ, kháng thể kháng CD20 được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 từ 100nM đến 2pM (bao gồm mẫu đối chứng không chứa kháng thể) và ủ với tế bào trong 10 phút ở 25°C tiếp theo bổ sung 1,66% huyết thanh hoặc 1,66% huyết thanh loại hết C5 và 6,6nM protein biến thể C5. Lượng C5 protein cần được bổ sung vào huyết thanh loại hết C5 được dựa vào trị số thông báo về nồng độ C5 trong huyết thanh người chứa 0,37uM (Rawal *et al* 2008, *J. Biol. Chem.* 283: 7853-7863). Để thử nghiệm sự ức chế kháng thể C5 của CDC, pha loãng kháng thể C5 theo tỷ lệ 1:3 từ 100nM đến 2pM (bao gồm mẫu đối chứng không chứa kháng thể) và ủ với 1,66% huyết thanh hoặc 1,66% huyết thanh loại hết C5 và 6,6nM protein biến thể C5 trong 30 phút. Mười phút trước khi bổ sung kháng thể với huyết thanh vào tế bào, kháng thể kháng CD20 được bổ sung vào tế bào ở 1nM, 2nM, 3nM, 3,5nM, 7nM, 10nM, hoặc 30nM. Khi kết thúc quá trình ủ với kháng thể kháng CD20, thêm hỗn hợp kháng thể/huyết thanh vào tế bào. Đo tính độc tế bào sau 3,5 giờ ủ ở 37°C và trong 5% CO₂, tiếp theo ủ 15 phút ở 25°C và thêm thuốc thử CytoTox-Glo™ (Promega, # G9292). CytoTox-Glo™ là thuốc thử dựa vào huỳnh quang mà đo sự giết tế bào sao cho quan sát được huỳnh quang gia tăng với tính độc tế bào gia tăng (đo theo đơn vị sáng tương đối, RLU). Làm tan tế bào không xử lý trong giếng đối chứng

bằng việc xử lý bằng digitonin ngay sau khi bổ sung thuốc thử CytoTox-Glo™ để xác định sự giết tế bào tối đa. Đọc đĩa đối với huỳnh quang bằng thiết bị Victor X (Perkin Elmer) 15 phút tiếp theo bổ sung CytoTox-Glo™. Khi được tính toán, tỷ lệ phần trăm độc tế bào được tính toán theo trị số RLU bằng cách sử dụng phương trình sau:

(Tan tế bào theo thử nghiệm-tan tế bào cơ sở)

% độc tế bào = 100 x -----

(Tan tế bào tối đa-tan tế bào cơ sở)

Trong phương trình này, “sự tan tế bào cơ sở” là huỳnh quang từ tế bào được xử lý bằng môi trường và một mình huyết thanh mà không có kháng thể kháng CD20 bất kỳ và “sự tan tế bào tối đa” là huỳnh quang từ tế bào được xử lý bằng digitonin. Kết quả là, sự biểu diễn theo % độc tế bào hoặc RLU, được phân tích bằng cách sử dụng sự hồi quy không tuyến tính (logistic 4 tham số) với phần mềm Prism 5 (GraphPad) để thu được trị số EC₅₀ và IC₅₀. Tính toán sự ức chế kháng thể sao cho sự ức chế 0 – 100% là khoảng ức chế của nồng độ kháng thể kháng CD20 được sử dụng trong thử nghiệm mà không có chất ức chế đối với 0nM kháng thể kháng CD20.

Kết quả

Tổng số gồm 25 kháng thể kháng C5 người, 16 kháng thể không đột biến và 9 kháng thể đột biến được thử nghiệm đối với khả năng ức chế C5 trong thử nghiệm CDC bằng cách sử dụng tế bào Daudi với kháng thể kháng CD20 và huyết thanh người (với biến thể hC5 hoặc C5 tiêu chuẩn) hoặc huyết thanh khỉ xanh châu Phi. Các gốc khác nhau trong các vùng quyết định phân bù (CDR) của H4H12166P được tạo đột biến thành histidin để tạo ra 9 kháng thể đột biến, H4H12166P2-H4H12166P10. Các đột biến histidin trong CDR đã được thể hiện tạo ra sự phụ thuộc độ pH của gắn kết với kháng nguyên đích dẫn đến được động học được cải thiện (Igawa *et al.* 2010, Nat. Biotechnol.28: 1203-1207).

Bảng 16: Sự ức chế CDC của kháng thể kháng hC5 không đột biến với 1,66% huyết thanh và kháng thể kháng CD20 trong tế bào Daudi

Huyết thanh	Người	Người	Khí xanh châu Phi	Biến thể R885H người loại C5 và 6,6nM biến thể C5	Biến thể R885C người loại hết C5 và 6,6nM biến thể C5
EC50 [M] kháng thể kháng CD20 (với 1,66% huyết thanh)	1,0E-09	1,4E-09	2,4E-09	1,9E-09	2,7E-09
Kháng thể kháng CD20 không đổi (với 1,66% huyết thanh)	1nM		3nM	3,5nM	30nM
Kháng thể	IC50 [M]		IC50 [M] (% ức chế tối đa)*	IC50 [M]	IC50 [M] (% ức chế tối đa)*
H4H11683 N	Không được thử nghiệm	1,2E-09	4,0E-09	1,3E-09	9,0E-10
H4H11686 N	Không được thử nghiệm	1,5E-09	4,4E-09	1,1E-09	4,5E-10
H4H12159 P	3,2E-09	Không được thử nghiệm	3,4E-09	1,4E-09	1,0E-09
H4H12161 P	2,4E-09	Không được thử nghiệm	2,6E-09	1,8E-09	1,0E-09
H4H12163 P	3,4E-09	Không được thử nghiệm	3,7E-09	2,1E-09	1,1E-09
H4H12164 P	2,4E-09	Không được thử nghiệm	5,8E-09	1,8E-09	8,2E-10

H4H12166 P	2,6E-09	Không được thử nghiệm	4,5E-09	1,3E-09	4,6E-10
H4H12167 P	2,5E-09	Không được thử nghiệm	3,5E-09	1,9E-09	1,0E-09
H4H12168 P	1,5E-09	Không được thử nghiệm	2,0E-09	2,3E-09	8,6E-10
H4H12169 P	1,7E-09	Không được thử nghiệm	2,9E-09	1,3E-09	6,7E-10
H4H12170 P	2,0E-09	Không được thử nghiệm	3,7E-09	4,8E-10	4,3E-10
H4H12171 P	1,9E-09	Không được thử nghiệm	3,3E-09	1,6E-09	6,5E-10
H4H12175 P	2,2E-09	Không được thử nghiệm	5,2E-09	4,2E-09	>2,0E-08 (67%)
H4H12176 P2	2,7E-09	Không được thử nghiệm	3,5E-09	2,1E-09	1,3E-09
H4H12177 P2	2,2E-09	Không được thử nghiệm	6,1E-09	2,4E-09	1,6E-09
H4H12183 P2	1,7E-09	Không được thử nghiệm	1,4E-08	1,2E-09	4,5E-10
So sánh 1	2,3E-09	1,8E-09	>9,0E-08 (49%)	Không ức chế	Không ức chế
mAb 1 đối chứng	Không ức chế	Không ức chế	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
mAb 2 đối chứng	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế

*Nếu không có quy định khác, tất cả ức chế là khoảng 100%

Như được thể hiện trong bảng 16 và 17, tất cả 25 kháng thể kháng hC5 thể hiện sự ức chế hoàn toàn CDC qua trung gian bởi C5 có mặt trong 1,66% huyết thanh người. IC50 của kháng thể không đột biến nằm trong khoảng từ 1,2 đến 3,4nM. IC50

của kháng thể đột biến nằm trong khoảng từ 3,0nM đến 12nM. Kháng thể gốc không đột biến H4H12166P tạo ra sự ức chế hoàn toàn với IC50 2,6nM và 2,9nM.

Bảng 17: Sự ức chế CDC của kháng thể kháng hC5 đột biến với 1,66% huyết thanh và kháng thể kháng CD20 trong tế bào Daudi

Huyết thanh	Người	Khí xanh châu Phi	Biến thể R885H người loại hết C5 và 6,6nM	Biến thể R885C người loại hết C5 và 6,6nM
EC50 [M] kháng thể kháng CD20 (với 1,66% huyết thanh)	1,9E-09	2,6E-09	6,3E-09	9,5E-09
Kháng thể kháng CD20 cố định (với 1,66% huyết thanh)	2nM	10nM	7nM	30nM
Kháng thể	IC50 [M]	IC50 [M] (% ức chế tối đa)*	IC50 [M]	IC50 [M]
H4H12166P	2,9E-09	5,6E-09	1,3E-09	7,6E-10
H4H12166P2	3,7E-09	9,7E-09	1,7E-09	1,2E-09
H4H12166P3	7,8E-09	>3,0E-08 (64%)	2,9E-09	1,7E-09
H4H12166P4	3,5E-09	7,9E-09	1,5E-09	9,6E-10
H4H12166P5	4,9E-09	>3,0E-08 (75%)	2,1E-09	1,4E-09
H4H12166P6	3,0E-09	9,9E-09	1,3E-09	7,9E-10
H4H12166P7	7,3E-09	>6,0E-08 (61%)	4,2E-09	2,3E-09
H4H12166P8	4,1E-09	>2,0E-08 (79%)	2,1E-09	1,2E-09
H4H12166P9	3,9E-09	>1,0E-08 (85%)	1,7E-09	7,7E-10
H4H12166P10	1,2E-08	>1,0E-07 (34%)	7,0E-09	3,5E-09
So sánh 1	2,7E-09	>1,0E-07 (35%)	Không ức chế	Không ức chế
mAb 2 đối chứng	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế

*Trừ khi có chỉ định khác, tất cả ức chế là khoảng 100%

Mười sáu kháng thể không đột biến kháng hC5 thể hiện sự ức chế hoàn toàn CDC qua trung gian C5 khi xanh châu Phi với IC50 nằm trong khoảng từ 2,0nM đến 14nM.

Bốn trong số 9 kháng thể đột biến thể hiện sự ức chế hoàn toàn CDC qua trung gian C5 khi xanh châu Phi với IC50 nằm trong khoảng từ 7,1nM đến 9,9nM. Sáu kháng thể đột biến còn lại là các chất phong bế với IC50 lớn hơn 10nM và sự ức chế tối đa (ở 100nM kháng thể) nằm trong khoảng từ 34% đến 85%. Kháng thể gốc không đột biến H4H12166P tạo ra sự ức chế hoàn toàn với IC50 4,5nM và 5,6nM.

Để thử nghiệm xem liệu kháng thể kháng hC5 có ức chế các biến thể C5 người hay không, R885H và R885C, huyết thanh người loại hết C5 được thử nghiệm với 6,6nM mỗi biến thể C5. Tất cả 25 kháng thể kháng hC5 thể hiện sự ức chế hoàn toàn CDC qua trung gian biến thể C5 R885H, với IC50 của kháng thể không đột biến nằm trong khoảng từ 0,48nM đến 4,2nM, trong khi IC50 của kháng thể đột biến nằm trong khoảng từ 1,3nM đến 7,0nM. Kháng thể gốc không đột biến H4H12166P có sự ức chế hoàn toàn với IC50 là 1,3nM và 1,3nM.

Mười lăm trong số 16 kháng thể không đột biến kháng hC5 thể hiện sự ức chế hoàn toàn CDC qua trung gian biến thể C5 R885C với IC50 nằm trong khoảng từ 0,43nM đến 1,6nM. Một kháng thể không đột biến thể hiện sự ức chế CDC yếu với sự ức chế tối đa 67% (ở 100nM kháng thể) và IC50 >20nM. Tất cả chín kháng thể đột biến thể hiện sự ức chế hoàn toàn CDC qua trung gian biến thể C5 R885C với IC50 nằm trong khoảng từ 0,77nM đến 3,5nM. Kháng thể gốc không đột biến H4H12166P tạo ra sự ức chế hoàn toàn với IC50 là 0,46nM và 0,76nM.

Kháng thể kháng CD20 thể hiện CDC của tế bào Daudi với 1,66% huyết thanh với EC50 là 1,0nM, 1,4nM, và 1,9nM đối với huyết thanh người, 2,4nM và 2,6nM đối với huyết thanh khi xanh châu Phi, 1,9nM và 6,3nM đối với huyết thanh loại hC5 với biến thể hC5 R885H, và 2,7nM và 9,5nM đối với huyết thanh loại hC5 với biến thể hC5 R885C. Không có kháng thể nào trong số kháng thể đối chứng IgG, mAb1 đối chứng và mAb2 đối chứng, thể hiện sự ức chế CDC bất kỳ.

Ví dụ 7: Sự ức chế hoạt tính C5a như xác định được bởi thử nghiệm huỳnh quang

Ví dụ này mô tả thử nghiệm để đánh giá hoạt tính của C5a thông qua một trong số các thụ thể của nó, C5aR1. C5aR1 là thụ thể ghép G-protein (GPCR) và có thể khơi

mào con đường truyền tín hiệu ghép GPCR khác nhau (Monk *et al.* 2007, Br. J. Pharmacol. 152: 429-448). Thử nghiệm sinh học được thiết lập bằng cách sử dụng tế bào HEK293 được lây nhiễm ổn định với C5aR1 người (Số truy cập NP_001727.1) và $G\alpha 16$ người (Số truy cập NP_002059.3) cùng với phần tử thông báo luxiferaza [phần tử phản hồi NFAT (4X)-luxiferaza]. $G\alpha 16$ là G protein tương đối pha tạp mà có thể ghép với các loại GPCR khác nhau dẫn đến sự hoạt hoá PLC- β và sự gia tăng tiếp theo Ca^{++} , mà lần lượt hoạt hoá quá trình hoán vị NFAT và sao chép gen thông báo (Kostenis *et al.* 2005, Trends Pharmacol. Sci. 26: 595-602). Dòng tế bào thu được, HEK293/ h $G\alpha 16$ /hC5aR1/NFAT-luc, được phân lập và được duy trì trong 10% DMEM chứa 10% FBS, NEAA, penxilin/streptomycin, 500 μ g/mL G418, 100 μ g/mL hygromycin B, và 7 μ g/mL blastixidin.

Đối với thử nghiệm sinh học C5a luciferaza, tạo hạt tế bào HEK293/h $G\alpha 16$ /hC5aR1/NFAT-luc trong các đĩa thử nghiệm 96 giếng ở 20.000 tế bào/giếng trong OPTIMEM (Invitrogen, #31985-070) được bổ sung 0,5% BSA, penixilin/streptomycin và L-glutamin và sau đó ủ ở 37°C và 5% CO₂ qua đêm. BSA được sử dụng thay thế cho FBS, do huyết thanh đã được thể hiện phân tách và làm bất hoạt hC5a (Klos *et al.*, 2013, Pharmacol. Rev. 65: 500-543). Vào buổi sáng tiếp theo, hC5a được chuẩn độ từ 100nM đến 2pM (bao gồm mẫu đối chứng không chứa hC5a) và bổ sung vào tế bào để xác định đường cong chuẩn độ đáp ứng liều đối với dòng tế bào. Để thử nghiệm sự ức chế kháng thể hC5a của hC5a, 500pM hC5a được bổ sung vào tế bào. Ngay sau đó, các kháng thể được pha loãng theo tỷ lệ 1:3 từ 100nM đến 2pM (bao gồm mẫu đối chứng không chứa kháng thể) được bổ sung vào tế bào. Ủ tế bào trong 5,5 giờ ở 37°C với sự có mặt 5% CO₂. Hoạt tính luxiferaza được phát hiện sau khi ủ với thuốc thử OneGlo™ (Promega, #E6051). OneGlo™ là thuốc thử dựa vào huỳnh quang mà đo lường luxiferaza có mặt trong tế bào. Trong thử nghiệm này, sự hoạt hoá hC5a gia tăng dẫn đến quá trình tạo ra và huỳnh quang luxiferaza gia tăng (đo được theo đơn vị ánh sáng tương đối, RLU). Việc đo huỳnh quang được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị Victor X (Perkin Elmer). Phân tích kết quả bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính (logistic 4 tham số) bằng phần mềm Prism 5 (GraphPad) để thu được các trị số EC₅₀ và IC₅₀. Tính toán sự ức chế của kháng thể sao cho sự ức chế 0 – 100% là khoảng ức chế từ 500pM hC5a mà không có chất ức chế 0nM hC5a.

Bốn kháng thể kháng hC5 được thử nghiệm đối với khả năng của chúng ức chế sự hoạt hoá hC5a của thụ thể của nó, hC5aR1, bằng cách đo mức độ ức chế sự hoạt hoá 500pM hC5a của tế bào HEK293/hGα16/hC5aR1/NFAT-luc.

Bảng 18: Sự ức chế 500pM hC5a của kháng thể kháng hC5 trong tế bào HEK293/Gα16/hC5aR1/ NFAT-luc

EC₅₀[M] hC5a	3,9E-10
mAb PID hoặc REGN #	Sự ức chế của 500pM hC5a
	IC₅₀ [M]
H2aM11682N	4,6E-10
H2aM11684N	3,5E-11
H2aM11694N	1,4E-10
H2aM11695N	4,2E-11
mAb đối chứng	Không ức chế

Như được thể hiện trong bảng 18, tất cả bốn kháng thể của sáng chế, thể hiện sự ức chế hoàn toàn 500pM hC5a với IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,035nM đến 0,46nM. Kháng thể đối chứng IgG không phù hợp, mAb3 đối chứng, không thể hiện sự ức chế bất kỳ hC5a. hC5a hoạt hoá tế bào HEK293/Gα16/hC5aR1/NFAT-luc với EC₅₀ là 0,39nM.

Ví dụ 8: Thử nghiệm sinh học tan huyết

Thử nghiệm tan huyết theo con đường cổ điển (CH) và thử nghiệm tan huyết theo con đường thay thế (AH) được phát triển để thử nghiệm hoạt tính kháng thể.

CH là thử nghiệm sàng lọc đối với hoạt tính của con đường bổ trợ cổ điển, mà dễ bị giảm, không có mặt và/hoặc tính bất hoạt của thành phần bất kỳ của con đường này. CH thử nghiệm khả năng theo chức năng của các thành phần bổ trợ huyết thanh của con đường cổ điển để làm tan tế bào hồng huyết cầu của cừu (SRBC) được phủ trước bằng kháng thể tế bào hồng huyết cầu của thỏ kháng cừu (hemolysin). Khi SRBC được phủ kháng thể được ủ bằng huyết thanh thử nghiệm, con đường bổ trợ cổ điển được hoạt hoá và kết quả là tan huyết. Nếu thành phần bổ trợ không có mặt, hàm lượng CH sẽ bằng 0; nếu một hoặc nhiều thành phần của con đường cổ điển bị giảm, CH sẽ được giảm. (Nilsson *et al* 1984, J. Immunol. Meth. 72: 49-59). Thử nghiệm này được sử dụng để mô tả đặc điểm và sàng lọc kháng thể kháng C5 người ái lực cao.

Phương pháp(A) Thử nghiệm tan huyết hỗ trợ theo con đường cổ điển

Rửa số lượng mong muốn tế bào hồng huyết cầu của cừu (SRBC) trong dung dịch đệm GVB++ và tạo huyền phù lại ở 1×10^9 tế bào/mL. Để làm nhạy SRBC, trộn với thể tích cân bằng hemolysin thử kháng cừu được pha loãng theo tỷ lệ 1:50 (1,5mg/mL) ở 37°C trong 20 phút. Pha loãng tế bào SRBC nhạy đến 2×10^8 tế bào/ml trong GVB++ trước khi sử dụng trong thử nghiệm tan huyết. Huyết thanh người và huyết thanh khỉ xynomolgus thông thường được pha loãng đến 2% hoặc 10% trong dung dịch đệm GVB++. Để thử nghiệm sự ức chế hoạt tính tan huyết qua trung gian C5, kháng thể thử nghiệm được ủ sơ bộ trong 20 phút ở 4°C, ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,6nM đến 800nM trong 2% đến 10% huyết thanh người bình thường hoặc 10% huyết thanh khỉ xynomolgus hoặc huyết thanh khỉ xanh châu Phi. Đĩa 96 giếng đáy tròn được sử dụng để đo hoạt tính tan huyết. Tổng cộng gồm 100ul RBC của cừu (2×10^8 tế bào/ml) được phủ vào trong đĩa 96 giếng tiếp theo bổ sung 100ul mẫu huyết thanh tương ứng mà được ủ sơ bộ với kháng thể thử nghiệm. Trộn kỹ tế bào và ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau thời gian ủ, quay tế bào bằng cách ly tâm ở 1250xg ở 4°C. Tổng cộng gồm có 100uL dịch nổi được chuyển vào đĩa đáy phẳng sạch 96 giếng và đọc ở 412nm trên bộ đọc vi đĩa Spectramax. Tính toán hoạt tính tan huyết ở nồng độ huyết thanh cuối cùng 1-5% để xử lý.

Tỷ lệ phần trăm tan huyết được tính toán như sau:

(Tan tế bào theo thử nghiệm-tan tế bào cơ sở)

% tan huyết = $100 \times \frac{\text{OD ở A412nm từ tế bào được ủ trong dung dịch đệm GVB++ chỉ không chứa huyết thanh}}{\text{OD ở A412nm từ tế bào được xử lý với nước}}$

(Tan tế bào tối đa-tan tế bào cơ sở)

Trong phương trình này, “sự tan tế bào cơ sở” là OD ở A412nm từ tế bào được ủ trong dung dịch đệm GVB++ chỉ không chứa huyết thanh. “Sự tan tế bào tối đa” là OD ở A412nm từ tế bào được xử lý với nước. Các kết quả, được biểu diễn theo % tan huyết được phân tích bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính (logistic 4 tham số) bằng phần mềm Prism 5 (GraphPad) để thu được các trị số IC_{50} . Các dữ liệu được biểu diễn theo sai số tiêu chuẩn trung bình $\pm$

(B) Thử nghiệm bổ sung thay thế

Rửa số lượng mong muốn tế bào hồng huyết cầu của thỏ (RbRBC) trong dung dịch đệm GVB-Mg²⁺/EGTA và tạo huyền phù lại ở 2×10^8 tế bào/ml. Huyết thanh người hoặc huyết thanh khỉ xynomolgus được pha loãng đến 10% trong dung dịch đệm GVB-Mg²⁺/EGTA. Để thử nghiệm sự ức chế hoạt tính tan huyết qua trung gian C5, các kháng thể ở nồng độ nằm trong khoảng từ 3nM đến 800nM được ủ sơ bộ trong 20 phút ở 4°C trong 5-10% huyết thanh người hoặc huyết thanh khỉ xynomolgus. Đĩa 96 giếng đáy tròn được sử dụng để đo hoạt tính tan huyết. Tổng cộng gồm 100ul RbRBC (2×10^8 tế bào/ml) được phủ vào trong đĩa 96 giếng sau khi bổ sung 100ul 10% huyết thanh người hoặc huyết thanh khỉ xynomolgus hoặc huyết thanh khỉ xanh châu Phi mà được ủ sơ bộ bằng kháng thể kháng C5. Trộn kỹ tế bào và ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau thời gian ủ, quay tế bào bằng cách ly tâm ở 1250xg ở 4°C. Tổng cộng gồm 100uL dịch nổi được chuyển vào đĩa đáy phẳng 96 giếng và đọc ở 412nm trên bộ đọc vi đĩa Spectramax. Tính toán hoạt tính tan huyết ở nồng độ huyết thanh cuối cùng 5% huyết thanh.

Tính toán phần trăm tan huyết như sau:

(Tan tế bào theo thử nghiệm-tan tế bào cơ sở)

% tan huyết = $100 \times \frac{\text{(Tan tế bào theo thử nghiệm-tan tế bào cơ sở)}}{\text{(Tan tế bào tối đa-tan tế bào cơ sở)}}$

(Tan tế bào tối đa-tan tế bào cơ sở)

Trong phương trình này, “sự tan tế bào cơ sở” là OD ở A412nm từ tế bào được ủ trong dung dịch đệm GVB-Mg/EGTA chỉ không chứa huyết thanh hoặc không chứa kháng thể kháng C5 bất kỳ. “Sự tan tế bào tối đa” là OD ở A412nm từ tế bào được xử lý với nước. Sự ức chế bởi kháng thể kháng C5, tính toán trị số IC₅₀ bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính (logistic 4 tham số) bằng phần mềm Prism 6 (GraphPad).

Kết quả

(A) Sự ức chế tan huyết C5 người

Tổng cộng gồm có 25 kháng thể kháng C5 người (hC5), 16 kháng thể không đột biến và 9 kháng thể đột biến, được thử nghiệm đối với khả năng ức chế C5 từ huyết thanh người bình thường (NHS) trong thử nghiệm CH50 bằng cách sử dụng tế bào hồng huyết cầu nhạy của cừu (SRBC) và thử nghiệm AH50 sử dụng tế bào hồng huyết cầu của thỏ (RRBC).

Bảng 19: Sự ức chế hoạt tính CP và AP của kháng thể kháng hC5 trong 1% hoặc 5% huyết thanh người bình thường (NHS)

mAb PID	CP người	AP người	CP người	AP người
	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% ức chế tối đa	% ức chế tối đa
H4H12183P2	5,88E-09	1,60E-07	99,9%	78,9%
H4H12176P2	4,58E-09	1,65E-08	94,1%	69,9%
H4H12168P	3,33E-09	2,85E-08	97,5%	66,2%
H4H11686N	3,09E-09	1,30E-08	97,4%	76,2%
H4H12167P	3,68E-09	1,55E-08	99,9%	64,8%
H4H12161P	2,56E-09	2,55E-08	93,7%	56,1%
H4H12163P	2,72E-09	2,05E-08	96,1%	66,0%
H4H12166P	2,80E-09	2,60E-08	95,0%	70,9%
H4H11683N	2,54E-09	3,40E-08	98,1%	73,2%
H4H12159P	2,50E-09	1,75E-08	97,9%	73,4%
H4H12177P2	2,34E-09	1,70E-08	97,5%	71,0%
H4H12170P	2,39E-09	1,80E-08	98,2%	81,1%
H4H12175P	2,36E-09	2,00E-08	98,0%	80,2%
H4H12171P	2,33E-09	1,55E-08	94,9%	42,0%
H4H12164P	2,10E-09	1,45E-08	95,9%	69,7%
H4H12169P	2,36E-09	2,00E-08	98,3%	44,5%
Lớp kháng thể đối chứng	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính

Như được thể hiện trong bảng 19, mười sáu kháng thể kháng hC5 theo sáng chế thể hiện sự ức chế tan huyết lớn hơn 94% trong con đường cổ điển (CP) qua trung gian bởi C5 có mặt trong 1% huyết thanh người. IC₅₀ của kháng thể nằm trong khoảng từ 2,1 đến 5,9nM và phần trăm ức chế nằm trong khoảng từ 95% đến 99%. Tất cả 16 kháng thể kháng C5 thể hiện sự ức chế nhiều hơn 60% (ngoại trừ H4H12169P) trong thử nghiệm tan huyết theo con đường thay thế (AP) qua trung gian C5 có mặt trong 5% NHS. IC₅₀ của kháng thể nằm trong khoảng từ 13 đến 160nM và phần trăm hoạt tính ức chế nằm trong khoảng từ 44% đến 81%.

Bảng 20: Sự ức chế hoạt tính CP và AP của kháng thể kháng hC5 trong 5% huyết thanh người bình thường (NHS)

mAb PID	CP người	AP người	CP người	AP người
	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% ức chế tối đa	% ức chế tối đa
H4H12166P	1,09E-08	2,09E-08	99,4%	86,9%
H4H12166P2	1,59E-08	4,78E-08	98,2%	81,3%

H4H12166P3	1,34E-08	6,00E-08	95,9%	78,3%
H4H12166P4	1,32E-08	3,17E-08	98,6%	77,0%
H4H12166P5	1,49E-08	6,55E-08	97,1%	77,7%
H4H12166P6	1,03E-08	2,84E-08	98,1%	82,4%
H4H12166P7	2,43E-08	1,56E-07	93,7%	83,2%
H4H12166P8	1,41E-08	7,30E-08	95,7%	73,3%
H4H12166P9	1,16E-08	5,35E-08	93,7%	72,2%
H4H12166P10	4,44E-08	Không có hoạt tính	74,0%	Không có hoạt tính
Lớp kháng thể đối chứng	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính

Như được thể hiện trong bảng 20, tất cả 9 kháng thể đột biến kháng hC5 thể hiện sự ức chế hoạt tính tan huyết CP và AP qua trung gian C5 có mặt trong 5% huyết thanh người. Trong thử nghiệm tan huyết CP, kháng thể gốc không đột biến H4H12166P thể hiện sự ức chế nhiều hơn 98% với IC₅₀ là 10,9nM. Tám kháng thể đột biến kháng hC5 thể hiện sự ức chế nhiều hơn 90% với IC₅₀ nằm trong khoảng từ 10,3nM đến 24,3nM. Kháng thể đột biến kháng C5 12166P10 thể hiện sự ức chế riêng phần là 74%. Trong thử nghiệm tan huyết AP, kháng thể gốc không đột biến H4H12166P thể hiện sự ức chế nhiều hơn 85% với IC₅₀ là 20,9nM. Các kháng thể đột biến kháng hC5 thể hiện sự ức chế nằm trong khoảng từ 72 đến 83% và kháng thể IC₅₀ nằm trong khoảng từ 28nM đến 0,15μM.

(B) Sự ức chế tan huyết của C5 khi

Tổng cộng gồm có 25 kháng thể kháng C5 người (hC5), 16 kháng thể không đột biến và 9 kháng thể đột biến, được thử nghiệm đối với khả năng ức chế C5 từ khi xynomolgis và khỉ xanh châu Phi trong thử nghiệm CH50 bằng cách sử dụng tế bào hồng huyết cầu nhạy của cừu (SRBC) và thử nghiệm AH50 sử dụng tế bào hồng huyết cầu của thỏ (RRBC).

Bảng 21: Sự ức chế hoạt tính CP và AP của kháng thể kháng hC5 trong 5% huyết thanh khỉ xanh châu Phi bình thường (AGM)

	CP huyết thanh AGM	AP huyết thanh AGM	AGM CP	AGM AP
mAb PID	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% ức chế tối đa	% ức chế tối đa
H4H12183P2	Không có	Không có	Không có	Không có

	hoạt tính	hoạt tính	hoạt tính	hoạt tính
H4H12176P2	3,04E-08	4,77E-08	91,0%	83,2%
H4H12168P	2,80E-08	2,25E-08	90,8%	88,2%
H4H11686N	4,82E-08	1,63E-07	49,3%	50,4%
H4H12167P	6,95E-08	6,95E-08	90,5%	53,4%
H4H12161P	3,19E-08	4,75E-08	78,9%	35,7%
H4H12163P	6,90E-08	2,16E-07	83,2%	58,5%
H4H12166P	1,30E-07	2,33E-07	81,0%	44,2%
H4H11683N	2,92E-08	4,08E-08	81,1%	88,1%
H4H12159P	2,58E-08	2,70E-08	93,4%	93,5%
H4H12177P2	1,80E-07	1,01E-07	80,6%	8,80%
H4H12170P	2,54E-08	2,69E-08	94,9%	90,9%
H4H12175P	1,18E-07	9,85E-08	84,5%	17,4%
H4H12171P	Không có hoạt tính	2,33E-08	17,8%	69,70%
H4H12164P	2,47E-07	1,78E-07	85,8%	15,60%
H4H12169P	3,44E-08	9,15E-08	43,3%	45,70%

Như được thể hiện trong bảng 21, kháng thể kháng hC5 thể hiện mức độ ức chế khác nhau về hoạt tính tan huyết CP hoặc AP trong 5% huyết thanh khi xanh châu Phi. Trong thử nghiệm CP, hai trong số 16 kháng thể kháng hC5 thể hiện không ức chế hoạt tính tan huyết. Mười bốn kháng thể thể hiện sự ức chế nằm trong khoảng từ 43 đến 94%, với IC₅₀ nằm trong khoảng từ 25nM đến 180nM. Trong thử nghiệm tan huyết AP, mười ba trong số 17 kháng thể thể hiện hoạt tính nằm trong khoảng từ 17% đến 93% với IC₅₀ nằm trong khoảng từ 22,5nM đến 233nM.

Bảng 22: Sự ức chế hoạt tính CP và AP của kháng thể kháng hC5 trong 5% huyết thanh khỉ cynomolgus (Cyno) bình thường

	CP huyết thanh Cyno	AP huyết thanh Cyno	Cyno CP	Cyno AP
mAb PID	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	% ức chế tối đa	% ức chế tối đa
H4H12183P2	1,42E-07	2,96E-08	64,6%	100,0%
H4H12171P	8,70E-09	7,20E-09	92,9%	98,8%
H4H12170P	8,20E-09	7,00E-09	99,0%	99,2%
H4H12159P	7,75E-09	7,05E-09	99,3%	99,6%
H4H12168P	1,03E-08	5,45E-09	99,0%	99,7%
H4H11683N	9,00E-09	7,15E-09	98,8%	98,9%
H4H12176P2	1,47E-08	7,70E-09	97,5%	99,3%

H4H12161P	2,79E-08	7,80E-09	100,0%	98,4%
H4H12169P	1,99E-08	7,95E-09	92,8%	96,30%
H4H11686N	1,41E-08	9,00E-09	94,5%	98,7%
H4H12163P	1,65E-08	1,02E-08	96,4%	98,5%
H4H12167P	2,13E-08	7,60E-09	100,0%	98,30%
H4H12175P	1,09E-08	8,05E-09	96,7%	98,10%
H4H12166P	2,01E-08	8,85E-09	94,2%	98,60%
H4H12177P2	1,71E-08	8,80E-09	94,90%	98,10%
H4H12164P	1,96E-08	9,10E-09	94,7%	98,70%
Lớp kháng thể đối chứng	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính	Không có hoạt tính

Như được thể hiện trong bảng 22, các kháng thể kháng hC5 (ngoại trừ H4H12183P2, mà thể hiện sự ức chế 64% CP) thể hiện sự ức chế nhiều hơn 90% thử nghiệm tan huyết CP hoặc AP trong 5% huyết thanh khỉ xynomolgus. Trong thử nghiệm tan huyết CP, IC50 của kháng thể nằm trong khoảng từ 7,15nM đến 142nM. Trong thử nghiệm tan huyết AP, IC50 của kháng thể nằm trong khoảng từ 5,4 đến 29,6nM.

(C) Sự ức chế tan huyết của C5 biến thể người

Thử nghiệm kháng thể kháng C5 được chọn đối với khả năng ức chế C5 biến thể người (xem ví dụ 3 trong bản mô tả này) từ huyết thanh người loại hết C5 trong thử nghiệm CH50. Trong huyết thanh người loại hết C5 được bổ sung biến thể C5 ngoại sinh R885H, H4H12166P, và so sánh 2 phong bế tan huyết CP với trị số IC50 lần lượt là 6,0nM và 4,4nM và trị số IC80 lần lượt là 7,6nM và 5,5nM. Đối với biến thể R885C, H4H12166P và so sánh 2 phong bế tan huyết CP trong huyết thanh người loại hết C5 với các biến thể C5 ngoại sinh với IC50 lần lượt là 9,3nM và 6,8nM và trị số IC80 lần lượt là 11nM và 8,2nM. Như được mong đợi, so sánh 1 không phong bế hoạt tính tan huyết của các biến thể C5 người.

(D) Sự ức chế phức hợp C5b-6 người

Thử nghiệm các kháng thể kháng C5 đối với khả năng ức chế phức hợp C5b-6 người từ huyết thanh người loại hết C5 trong thử nghiệm CH50. H4H12166P có khả năng phong bế sự tan huyết CP trong huyết thanh người loại hết C5 được bổ sung phức hợp ngoại sinh huC5b-6 với trị số IC50 là 3,8nM và IC80 là 5,8nM. Trái lại, So sánh 1 phong bế sự tan huyết qua trung gian phức hệ C5b-6 với hiệu quả thấp, với lần

lượt các trị số IC₅₀ là 5,0nM và IC₈₀ là 46nM. So sánh 1 chỉ ức chế 70% tổng tan huyết ở các nồng độ cao nhất được thử nghiệm. So sánh 2 không phong bế hoạt tính tan huyết của phức hợp C5b-6 người.

Ví dụ 9: Kháng thể kháng C5 phong bế sự tạo ra C5a trong thử nghiệm tan huyết CP

Để đánh giá xem liệu các kháng thể kháng C5 có ức chế quá trình tạo ra C5a hay không, các dịch nổi từ thử nghiệm đối với sự tan huyết theo con đường cổ điển (CP) được phân tích đối với hàm lượng C5a bởi ELISA.

C5a, được tạo ra là kết quả của việc phân tách C5, là mảnh protein gồm 74 axit amin. C5a được chuyển hoá nhanh chóng bởi carboxypeptidaza huyết thanh thành dạng 73 axit amin ổn định hơn, ít hoạt tính hơn, C5a des-Arg, nhờ loại bỏ arginin đầu C. Do đó, việc định lượng C5a des-Arg tạo ra phép đo tin cậy để kiểm tra sự tạo ra C5a in vivo và in vitro. Kit MicroVue C5a ELISA trong bản mô tả này phát hiện C5a des-Arg theo sáng chế được cung cấp bởi nhà sản xuất. Các thử nghiệm sơ bộ (dữ liệu không được thể hiện) cho biết rằng dạng 74 axit amin đầu tiên của C5a cũng được phát hiện. Đối với mục đích của ví dụ này, cả hai dạng sẽ được gọi chung là "C5a".

Nồng độ C5a protein được xác định trong dịch nổi từ thử nghiệm tan huyết CP bằng cách sử dụng huyết thanh người bình thường (NHS) được bảo tồn bổ sung được ủ sơ bộ bằng H4H12166P hoặc kháng thể đối chứng của lớp kháng thể như được mô tả trong ví dụ 8. Nồng độ C5a protein đo được bằng cách sử dụng kit MicroVue C5a ELISA theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, các mẫu được pha loãng và ủ trên các đĩa phủ sơ bộ với kháng thể bẫy (kháng thể chuột đặc hiệu kháng C5a đối với neo-epitop trên C5a người). C5a protein người được cung cấp bởi nhà sản xuất được sử dụng làm tiêu chuẩn để hiệu chỉnh. C5a trong dịch nổi được phát hiện bởi kháng thể phát hiện tiếp hợp HRP (kháng thể đơn dòng chuột kháng vùng C5a của C5). Nền HRP sinh màu, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB), được bổ sung để phát hiện hoạt tính của HRP. Dung dịch chứa 1N axit clohydric được sử dụng để làm ngừng phản ứng và mật độ quang học ở 450nm (OD₄₅₀) được đo trên bộ đọc đĩa SpectraMax. Phân tích dữ liệu bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính (logistic 4 tham số) trong GraphPad Prism. Nồng độ C5a được biểu diễn theo ng/mL dịch nổi.

Trong thử nghiệm sử dụng 5% NHS, H4H12166P có thể phong bế sự gia tăng về nồng độ C5a protein theo cách phụ thuộc liều với IC50 là 8,5nM. Trong khi kháng thể đối chứng thuộc lớp kháng thể không ảnh hưởng đến nồng độ C5a (Fig.1). Sự phong bế tối đa ở nồng độ H4H12166P thử nghiệm cao nhất (267nM) dẫn đến giảm gấp 10 lần về nồng độ C5a đến 3,8ng/mL (0,3nM), so với 34ng/mL (2,8nM) quan sát được ở nồng độ H4H12166P thử nghiệm thấp nhất (1nM) trong 5% huyết thanh. Nồng độ C5a quan sát được đối với sự phong bế tối đa gần bằng nồng độ C5a cơ sở là 2,3ng/mL (0,2nM) trong 5% NHS không xử lý.

Ví dụ 10: Đặc điểm dược động học và dược lực học của kháng thể kháng C5 ở khỉ xynomolgus

Ví dụ này mô tả đặc điểm của dược động học (PK) và dược lực học (PD) của kháng thể được chọn kháng C5 được thực hiện ở khỉ đực xynomolgus. Nồng độ C5 nội sinh được xác định trước khi dùng liều kháng thể kháng C5 và được sử dụng để phân tầng nhóm liều động vật

Tổng nồng độ C5 tuần hoàn ở khỉ xynomolgus được xác định bằng cách sử dụng C5 ELISA người bổ sung (Abcam, loại ab125963), mà được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Nồng độ trung bình của C5 protein ở khỉ được xác định là $90,85\mu\text{g/mL} \pm 19,17\mu\text{g/mL}$.

Đối với mỗi kháng thể kháng C5, mỗi khỉ trong số 4 khỉ xynomolgus được dùng qua đường tiêm tĩnh mạch đơn (IV) ở liều 15mg/kg. Gồm các mẫu máu từ mỗi khỉ từ liều sơ bộ đến 1680 giờ (70 ngày), được xử lý thành huyết thanh và tạo đông lạnh ở -80°C cho đến khi phân tích đối với PK và PD.

Phân tích tổng nồng độ kháng thể IgG bằng thử nghiệm miễn dịch ELISA

Tổng nồng độ kháng thể trong mẫu huyết thanh khỉ được đo bằng cách sử dụng ELISA trực tiếp không hiệu lực. Quy trình ELISA dùng đĩa vi chuẩn được phủ kháng thể đơn dòng IgG1/IgG4 Fc chuột kháng người. Các kháng thể khác nhau kháng C5 được bổ sung vào đĩa và kháng thể kháng C5 bày trên đĩa này được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng chuột được biotinyl hoá kháng IgG4 Fc người, tiếp theo NeutrAvidin được tiếp hợp với Peroxidaza cá ngựa (NeutrAvidin HRP). Tiếp

theo, nền dựa vào luminol đặc hiệu đối với peroxidaza được bổ sung vào để đạt được cường độ tín hiệu mà tỷ lệ với nồng độ của tổng kháng thể kháng C5 đã bắt. Các phép đo đơn vị sáng tương đối (RLU) của các tiêu chuẩn hiệu chỉnh và các nồng độ theo danh nghĩa tương ứng của chúng được so khớp bằng cách sử dụng phương trình logistic 4 tham số theo trọng số để tạo ra phương trình hiệu chỉnh mà mô tả nồng độ của kháng thể kháng C5 và mối quan hệ đáp ứng của thử nghiệm. Giới hạn dưới của định lượng (LLOQ) là 1,56ng/mL trong thử nghiệm (2% huyết thanh khi) và 78ng/mL trong huyết thanh nguyên chất của khi.

Xác định các tham số PK

Các tham số PK được xác định bằng phép phân tích không chia ô (NCA) sử dụng phần mềm Phoenix[®]WinNonlin[®] (Version 6.4, Certara, L.P.) và mô hình dùng liều cao qua IV.

Tất cả các tham số PK thu được từ các trị số nồng độ trung bình tương ứng, bao gồm nồng độ tối đa quan sát trong huyết thanh (C_{max}), thời gian nồng độ đỉnh quan sát, t_{max} , và nửa chu kỳ phân rã ước tính tối đa ($T_{1/2}$). Đối với mỗi kháng thể, diện tích dưới nồng độ đối lại đường cong theo thời gian lên đến nồng độ đo được sau cùng (AUC_{last}) và được ngoại suy từ thời điểm gốc đến vô cực (AUC_{inf}) được xác định bằng cách sử dụng quy tắc hình thang tuyến tính với phép nội suy tuyến tính và lấy trọng số duy nhất.

Phân tích PD bằng thử nghiệm tan huyết ex vivo

Dược lực học của các kháng thể kháng C5 được chọn được phân tích bằng cách sử dụng các thử nghiệm tan huyết theo con đường cổ điển ex vivo và con đường thay thế.

Thử nghiệm tan huyết theo con đường cổ điển: Rửa tế bào hồng huyết cầu của cừu (SRBC) trong dung dịch đệm GVB++ (Gelatin Veronal Buffer với $CaCl_2$ và $MgCl_2$) (Boston BioProducts) và tạo huyền phù lại ở 1×10^9 tế bào/mL. Để làm nhạy SRBC, tổng cộng gồm có 1×10^9 /mL SRBC được trộn với thể tích cân bằng hemolysin thử kháng cừu được pha loãng theo tỷ lệ 1:50 (1,5mg/mL) ở 37°C trong 20 phút. Pha loãng các SRBC đã làm nhạy đến 2×10^8 tế bào/mL trong dung dịch đệm GVB++ trước

khi sử dụng trong thử nghiệm tan huyết. Gom máu từ khỉ xynomolgus trước khi cho dùng liều và ở 5 phút, 4 và 8 giờ và 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 và 70 ngày sau dùng liều để phân tích PD. Chuẩn bị huyết thanh và tạo đông lạnh cho đến khi sử dụng tiếp. Vào ngày thử nghiệm, huyết thanh khỉ xynomolgus từ các thời điểm tương ứng được pha loãng đến 10% trong dung dịch đệm GVB++. Các đĩa 96 giếng đáy tròn được sử dụng để đo hoạt tính tan huyết. Tổng cộng gồm 100µl SRBC đã làm nhạy (2×10^8 tế bào/mL) được phủ vào trong đĩa 96 giếng ở 37°C tiếp theo bổ sung 100ul 10% huyết thanh khỉ xynomolgus từ các thời điểm tương ứng. Trộn kỹ SRBC và ủ ở 37°C trong 10 phút. Sau thời gian ủ, ly tâm tế bào ở 1250xg ở 4°C. Tổng cộng gồm có 100µL dịch nổi được chuyển vào đĩa đáy phẳng sạch 96 giếng và đọc ở 412nm trên bộ đọc vi đĩa Spectramax. Tính toán hoạt tính tan huyết ở nồng độ huyết thanh cuối cùng 5%. Tính toán phần trăm tan huyết theo các trị số hấp thụ bằng cách sử dụng phương trình sau:

(Tan tế bào theo thử nghiệm-tan tế bào cơ sở)

% tan huyết = $100 \times \frac{\text{OD ở A412nm từ SRBC ủ trong dung dịch đệm GVB++ không chứa huyết thanh}}{\text{OD ở A412nm từ SRBC được xử lý với nước}}$

(Tan tế bào tối đa-tan tế bào cơ sở)

Trong phương trình này, “sự tan tế bào cơ sở” là OD ở A412nm từ SRBC ủ trong dung dịch đệm GVB++ không chứa huyết thanh. “Sự tan tế bào tối đa” là OD ở A412nm từ SRBC được xử lý với nước. Kết quả, được biểu diễn theo % tan huyết được phân tích bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính (logistic 4 tham số) với phần mềm Prism 5 (GraphPad) để thu được các trị số IC_{50} . Dữ liệu được biểu diễn theo sai số tiêu chuẩn trung bình $\pm$.

Thử nghiệm tan huyết theo con đường thay thế: Rửa số lượng mong muốn tế bào hồng huyết cầu của thỏ (RbRBC) trong dung dịch đệm GVB- Mg^{2+} /EGTA và tạo huyền phù lại ở 2×10^8 tế bào/mL. Gom máu từ khỉ xynomolgus trước khi dùng liều và ở 5 phút, 4 và 8 giờ và 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35, 42 và 49 ngày sau dùng liều để phân tích PD. Chuẩn bị huyết thanh và làm đông lạnh cho để sử dụng tiếp. Các đĩa 96 giếng đáy tròn được sử dụng để đo hoạt tính tan huyết. Tổng cộng gồm có 100µl RbRBC (2×10^8 tế bào/mL) được phủ vào trong đĩa 96 giếng ở 37°C tiếp theo bổ sung 100µl 10% huyết thanh khỉ xynomolgus từ các thời điểm tương ứng được liệt kê trên đây. Trộn kỹ các RbRBC và ủ ở 37°C trong 60 phút. Sau thời gian ủ, ly tâm tế bào ở

1250xg ở 4°C. Tổng cộng gồm có 100µL dịch nổi được chuyển vào đĩa đáy phẳng sạch 96 giếng mà được đọc ở 412nm trên bộ đọc vi đĩa Spectramax. Tính toán hoạt tính tan huyết đối với nồng độ huyết thanh cuối cùng 5% và được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm tổng tan huyết của các RBC bởi nước. Tính toán tỷ lệ phần trăm tan huyết như được mô tả trên đây.

Kết quả

Thử nghiệm các kháng thể kháng C5 được chọn (được liệt kê trong bảng 1) trong các thử nghiệm ban đầu trong profin được lực học kéo dài ở khỉ xynomolgus và chuột được làm giống người C5 (được mô tả trong ví dụ 10). H4H12166P và H4H12161P được chọn có ái lực cao ghép nối với PK kéo dài và được sử dụng trong các thử nghiệm tiếp theo trong bản mô tả này với So sánh 1 và So sánh 2.

Khỉ xynomolgus được cho dùng một liều cao 15mg/kg IV của H4H12166P, H4H12161P, hoặc so sánh 2. Nồng độ huyết thanh của tổng kháng thể và tỷ lệ phần trăm hoạt tính tan huyết theo con đường cổ điển (CP) được xác định ở 19 thời điểm trong khoảng thời gian 70 ngày trong đời sống. Sự tan huyết theo con đường thay thế (AP) được xác định ở 17 thời điểm trong khoảng thời gian 50 ngày trong đời sống. Bảng 23 tổng kết nồng độ kháng thể trung bình đối với tất cả 3 kháng thể. Tổng nồng độ kháng thể trung bình đối lại profin thời gian được thể hiện trên Fig.2. Các tham số PK trung bình được mô tả trong bảng 24.

Bảng 23: Nồng độ trung bình của tổng IgG trong huyết thanh sau khi dùng một liều tiêm trong tĩnh mạch 15mg/kg của kháng thể kháng C5 đã chọn cho khỉ đực xynomolgus

Thời gian (giờ sau dùng liều)	#	Nồng độ huyết thanh của Ab (µg/mL) Trung bình ±SD		
		H4H12166P	H4H12161P	So sánh 2
0	4	BLQ	BLQ	BLQ
0,083	4	445 ±30	456 ±26,2	459 ±55,2
4	4	328 ±27	360 ±28,2	363 ±43,8
8	4	353 ±29,9	316 ±21,5	357 ±16,1
24	4	282 ±43,6	276 ±32,4	248 ±19,6
48	4	225 ±15,2	221 ±21,5	212 ±19,3
72	4	180 ±15,0	181 ±17,2	196 ±36,2
120	4	194 ±20,9	162 ±10,7	179 ±23,3
168	4	171 ±29,9	132 ±17,0	157 ±18,4

240	4	157 ±12,7	96,1 ±17,3	114 ±13,0
336	4	120 ±10,2	49,3 ±18,7	67,9 ±25,8
432	4	105 ±13,9	24,6 ±11,8	42,6 ±15,9
504	4	92,2 ±10,6	13,8 ±9,95	28,6 ±13,1
672	4	75,1 ±15,8	6,16 ±2,40	10,9 ±6,25
840	3	59,6 ±4,79	2,44 ±0,85	4,45 ±2,63
1008	3	43,3 ±2,89	1,16 ±0,52	2,17 ±1,58
1176	3	30,6 ±1,42	0,57 ±0,25	1,29 ±1,16
1344	3	25,9 ±3,74	0,315 ±0,16	0,492 ±0,49
1512	3	18,2 ±2,41	0,17 ±0,08	0,270 ±0,27
1680	3	11,5 ±1,51	0,079±0,07	0,123 ±0,15

Thời gian = Thời gian theo giờ sau khi tiêm một liều;

SD = Độ lệch chuẩn; BLQ = Giới hạn định lượng dưới

Sau khi dùng liều cao IV, tổng profin thời gian-nồng độ IgG của H4H12166P, H4H12161P, và So sánh 2 được đặc trưng bởi pha phân phối ngắn ban đầu theo các pha loại trừ đơn trong thời gian sống. Nồng độ cao nhất H4H12166P, H4H12161P và So sánh 2 có thể so sánh cao nhất, như các trị số C_{max} /liều tương ứng giữa các kháng thể lần lượt nằm trong 1,1 lần (29,7, 30,4, và 30,6 [($\mu\text{g/mL}$)/(mg/kg)]) (bảng 24).

Bảng 24: Các tham số dược lực học trung bình của tổng nồng độ IgG trong huyết thanh sau khi dùng một liều tiêm trong tĩnh mạch 15mg/kg các kháng thể kháng C5 đã chọn cho khỉ đực cynomolgus

Tham số	H4H12166P		H4H12161P		So sánh 2	
	15 mg/kg IV (n = 4)					
	Trung bình	SD	Trung bình	SD	Trung bình	SD
C _{max} (µg/mL)	445	30,0	456	26,2	459	55,2
C _{max} /Liều (µg/mL)/(mg/kg)	29,7	2,00	30,4	1,75	30,6	3,68
C ₀ (µg/mL)	448	30,5	458	26,6	461	55,6
t _{max} (giờ)	0,083	0	0,083	0	0,083	0
AUC _{last} ngày•(µg/mL)	5080	1040	2350	357	2810	470
AUC _{last} / Liều day• (µg/mL)/(mg/kg)	339	69.3	157	23,8	187	31,3
AUC _{inf} ngày•(µg/mL)	5550	671	2350	356	2810	470
AUC _{inf} / Liều day• (µg/mL)/(mg/kg)	370	44,7	157	23,7	188	31,4
CL (mL/h/kg)	0,114	0,0143	0,270	0,0411	0,228	0,0425
V _{ss} (mL/kg)	60,4	4,85	44,0	4,34	45,3	3,06
t _{1/2} (ngày)	15,6	1,43	5,50	2,45	5,91	1,13

IV = tĩnh mạch; n = số lượng động vật; $C_{\max}$ = nồng độ cao nhất; C_0 = nồng độ ban đầu được xác định bằng ngoại suy; $t_{\max}$ = thời gian đến $C_{\max}$; AUC = diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian; AUC_{last} = AUC tính toán từ thời điểm gốc của nồng độ dương tính sau cùng; AUC_{inf} = AUC từ thời điểm gốc được ngoại suy đến vô cực; CL = tổng hệ số cơ thể; V_{ss} = thể tích phân phối ở trạng thái ổn định; $t_{1/2}$ = nửa chu kỳ phân rã; SD = độ lệch chuẩn.

Lưu ý: $t_{\max}$ được biểu diễn theo giờ danh nghĩa

Việc đánh giá profin nồng độ-thời gian cho biết rằng H4H12166P đã chứng minh sự loại trừ chậm nhất với nồng độ kháng thể cuối cùng $\geq 10\mu\text{g/mL}$ qua ngày nghiên cứu 71. Động học của H4H12161P và của So sánh 2 là tương tự; cả hai chứng minh sự loại trừ nhanh hơn nhiều so với H4H12166P, với nồng độ mAb $\geq 10\mu\text{g/mL}$ lần lượt qua ngày 22 và 29.

Do đó, các tiếp xúc theo tiêu chuẩn liều ($AUC_{\text{last}}/\text{Liều}$) thể hiện rằng H4H12166P có sự tiếp xúc cao nhất ở $339 \text{ ngày} \cdot (\mu\text{g/mL})/(\text{mg/kg})$, trong khi H4H12161P và So sánh 2 có sự tiếp xúc thấp hơn khoảng 2 lần, lần lượt 157 và 187 $\text{ngày} \cdot (\mu\text{g/mL})/(\text{mg/kg})$ so với của H4H12166P.

Nửa chu kỳ phân rã kháng thể ($t_{1/2}$) được tính toán trong giai đoạn loại trừ nằm trong khoảng từ 5,5 đến 15,6 ngày qua toàn bộ các nhóm liều và cũng được hiệu chỉnh với sự tiếp xúc, do H4H12166P có $t_{1/2}$ tương ứng cao nhất của 15,6 ngày, trong khi H4H12161P và so sánh 2 có trị số $t_{1/2}$ lần lượt là 5,5 và 5,9 ngày.

Tác dụng được lý của kháng thể kháng C5 từ các mẫu huyết thanh khi xynomoligus được xác định ex vivo bằng thử nghiệm tan huyết theo con đường cổ điển bổ sung (CP) của tế bào hồng huyết cầu nhạy của cừu (SRBC) và thử nghiệm tan huyết theo con đường thay thế (AP) của tế bào hồng huyết cầu của thỏ (RbRBC). Sự ức chế hoạt tính tan huyết được tính toán ôđi với nồng độ huyết thanh cuối cùng 5% và được biểu diễn theo tỷ lệ phần trăm của tổng tan huyết RBC bằng nước. Bảng 25 tổng kết hoạt tính ex vivo của 3 kháng thể như xác định được bởi phần trăm tan huyết trung bình.

Bảng 25: Tỷ lệ phần trăm hoạt tính tan huyết theo con đường cổ điển và thay thế Ex Vivo của kháng thể kháng C5 được chọn

Thời gian (giờ)	#	% tan huyết theo con đường cổ điển trong huyết thanh khi xynomoligus, 10 phút, trung bình	% tan huyết theo con đường thay thế trong huyết thanh khi xynomoligus, 60 phút, trung bình
-----------------	---	---	--

sau khi dùng liều)		±SEM			±SEM		
		H4H1216 6P	H4H12 161P	So sánh 2	H4H1216 6P	H4H1216 1P	So sánh 2
0	4	91,34 ±7,6	Không được thử nghiệm	84,36 ±20,28	73,44 ±17,26	64,90 ±19,51	55,77 ±10,82
0,08 3	4	3,5 ±1,4	Không được thử nghiệm	6,6 ±6,5	5,53 ±1,98	5,90 ±3,92	3,83 ±3,93
4	4	2,35 ±1,06	Không được thử nghiệm	3,16 ±2,2	7,43 ±2,54	6,53 ±2,7	5,30 ±2,80
8	4	1,55 ±0,21	Không được thử nghiệm	1,25 ±0,21	3,53 ±0,91	4,70 ±2,77	1,98 ±0,83
24	4	7,7 ±6,08	Không được thử nghiệm	4,55 ±2,05	13,40 ±2,77	4,68 ±1,89	4,65 ±2,35
48	4	2,85 ±2,19	Không được thử nghiệm	2,6 ±0,7	5,53 ±2,40	7,68 ±5,22	2,28 ±0,67
72	4	0,9 ±0,42	Không được thử nghiệm	1,3 ±0,28	7,95 ±3,36	5,95 ±2,23	1,45 ±0,33
120	4	1,75 ±0,07	Không được thử nghiệm	1,3 ±0,14	16,38 ±6,91	7,60 ±1,94	1,68 ±0,22
168	4	1,6 ±1,13	Không được thử nghiệm	1,4 ±0,56	21,28 ±8,24	10,75 ±2,27	2,15 ±0,19
240	4	1 ±0,14	Không được thử nghiệm	3,7 ±2,83	19,18 ±10,20	13,53 ±7,17	14,20 ±16,73
336	4	2,55 ±2,05	Không được	37,85 ±5,3	21,10 ±7,55	50,58 ±12,91	65,60 ±26,04

			thử nghiệm				
432	4	1,35 ±0,91	Không được thử nghiệm	105,25 ±3,3	15,20 ±10,86	59,75 ±12,65	54,55 ±19,11
504	4	3,55 ±2,05	Không được thử nghiệm	107,1 ±4,38	33,15 ±8,80	88,55 ±24,63	85,63 ±27,48
672	4	2,2 ±0,56	Không được thử nghiệm	88,9 ±23,05	75,25 ±18,30	88,55 ±8,53	91,58 ±18,55
840	3	3,075 ±2,70	Không được thử nghiệm	105,37 ±53,4	46,65 ±5,30	92,33 ±5,16	91,85 ±2,33
1008	3	15,5 ±26,6	Không được thử nghiệm	108,85 ±2,35	58,60 ±9,48	92,45 ±6,27	92,30 ±2,69
1176	3	58,33 ±39,55	Không được thử nghiệm	113,85 ±2,62	72,95 ±5,87	104,90 ±3,5	101,90 ±0,42
1344	3	71,55 ±43,02	Không được thử nghiệm	110,3±1,9 8	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
1512	3	91,375 ±29,7	Không được thử nghiệm	110,6±0,8 5	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm
1680	3	112,22 ±4,06	Không được thử nghiệm	112,15±0,5	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm	Không được thử nghiệm

Thời gian = Thời gian theo các giờ sau khi tiêm một liều; SEM = Sai số tiêu chuẩn trung bình; BLQ = Giới hạn định lượng dưới; NC = không được tính toán

Như được thể hiện trong bảng 25 và Fig.2, tác dụng PD được đo theo CP bổ sung (ủ 10 phút) đến ngày 70. H4H12166P phong bế nhiều hơn 95% hoạt tính tan huyết CP cho đến ngày 35. Hoạt tính trở lại mức tan huyết tối đa trước nghiên cứu vào ngày 70.

So sánh 2 phong bế khoảng 95% hoạt tính tan huyết CP qua ngày 10 và hoạt tính nhanh chóng trở lại mức tan huyết tối đa trước nghiên cứu vào ngày 18.

Tác dụng PD cũng được đo bằng thử nghiệm tan huyết theo con đường AP bổ sung (ủ 60 phút) đến ngày 49. Như được thể hiện trong bảng 25 và Fig.3, H4H12166P phong bế 80% tổng hoạt tính tan huyết AP cho đến ngày 18 và hoạt tính này trở lại mức tan huyết tối đa trước nghiên cứu ở ngày 50. H4H12166P và so sánh 2 phong bế 90% hoạt tính tan huyết AP qua ngày 7 và hoạt tính trở lại mức tan huyết tối đa trước nghiên cứu vào ngày 21.

Ví dụ 11: Đặc điểm của PK/PD về kháng thể kháng C5 ở chuột được làm giống người C5

Trong thử nghiệm nghiên cứu này, dược động học và dược lực học của kháng thể kháng C5 được chọn được đánh giá ở chuột làm giống người để biểu hiện C5 protein người bằng cách sử dụng kỹ thuật Velocigene® (Valenzuela *et al* 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Thao tác miễn dịch chuột làm giống người để thay thế exon 2 đến exon 41 của gen C5 chuột bằng exon 2 đến 42 của gen C5 người (được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2015/0313194, nội dung của công bố này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Tổng nồng độ C5 tuần hoàn của người được xác định bằng cách sử dụng C5 ELISA bổ sung của người (Abcam, loại ab125963), mà được thực hiện theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

Xác định tổng nồng độ được chất trong huyết thanh bằng ELISA

Các nồng độ kháng thể kháng C5 tuần hoàn, cả C5 gắn kết và không gắn kết, được xác định bằng phân tích tổng kháng thể của người bằng cách sử dụng ELISA. Tóm lại, kháng thể đa dòng dê kháng IgG người ở 1µg/mL trong PBS được gây bất động trên các đĩa 96 giếng qua đêm; rửa đĩa để loại bỏ IgG không gắn kết và tiếp theo phong bế bằng 5% BSA. Dây pha loãng kháng thể kháng C5 chứa các mẫu huyết thanh (6 điểm) và các tiêu chuẩn tham chiếu (12 điểm) của kháng thể tương ứng được chuyển vào đĩa phủ kháng thể kháng IgG người và ủ trong một giờ. Tiếp theo, kháng thể kháng C5 gắn kết đĩa được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng dê kháng IgG người được tiếp hợp với peroxidaza cá ngựa. Tạo màu đĩa với nền TMB theo khuyến cáo của nhà sản xuất và các tín hiệu mật độ quang (OD) ở 450nm được

ghi chép bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa đa phương thức Perkin Elmer Victor X4. Nồng độ kháng thể kháng C5 trong huyết thanh được tính toán dựa vào đường cong hiệu chuẩn tiêu chuẩn tham chiếu bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism.

Xác định tham số PK

Tham số PK được xác định bằng phân tích không ngăn (NCA) sử dụng phần mềm Phoenix®WinNonlin® (Version 6.3, Certara, L.P.) và mô hình dùng liều ngoài mạch. Bằng cách sử dụng các trị số nồng độ trung bình tương ứng đối với mỗi kháng thể, tất cả tham số PK, bao gồm nửa chu kỳ phân rã ước tính quan sát được ($t_{1/2}$) và diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian đến nồng độ đo được cuối cùng (AUC_{last}) được xác định bằng cách sử dụng quy tắc hình thang tuyến tính và trọng số duy nhất.

Phân tích PD theo thử nghiệm tan huyết

Dược lực học của kháng thể kháng C5 đã chọn được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm tan huyết bổ sung theo con đường cổ điển. Tế bào hồng huyết cầu (SRBC) (Sheep blood in Alsevers solution) được rửa trong dung dịch đệm GVB++ (Gelatin Veronal Buffer with $CaCl_2$ và $MgCl_2$) (Boston BioProducts) và tạo huyền phù lại ở 1×10^9 tế bào/mL. Để làm nhạy, 1×10^9 /mL SRBC được trộn với thể tích cân bằng hemolysin thổ kháng cừu pha loãng 1:50 (1,5mg/mL) ở 37°C trong 20 phút. Pha loãng SRBC nhạy đến 2×10^8 tế bào/mL trong GVB++ trước khi sử dụng trong thử nghiệm tan huyết. Các mẫu huyết thanh từ động vật trước dùng liều hoặc chuột C5 giống người dùng liều với kháng thể kháng C5 gom vào các ngày 10, 20, 30, 40 và 50 được pha loãng đến 20% trong dung dịch đệm GVB++. Tổng cộng gồm 100µl SRBC nhạy (2×10^8 tế bào/mL) được phủ vào đĩa đáy tròn 96 giếng ở 37°C tiếp theo bổ sung 100µl 20% huyết thanh mà được bổ sung 160-180µg/mL protein bổ sung 3 người (huC3). Trộn kỹ tế bào và ủ ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi ủ, ly tâm tế bào ở 1250xg ở 4°C. Chuyển tổng 100µL dịch nổi vào đĩa đáy phẳng 96 giếng và đọc ở 412nm trên thiết bị đọc vi đĩa Spectramax. Tính toán phần trăm tan huyết với trị số tuyệt đối bằng cách sử dụng phương trình sau:

(Tan tế bào theo thử nghiệm-tan tế bào cơ sở)

% tan huyết = $100 \times \frac{\text{(Tan tế bào theo thử nghiệm-tan tế bào cơ sở)}}{\text{(Tan tế bào tối đa-tan tế bào cơ sở)}}$

(Tan tế bào tối đa-tan tế bào cơ sở)

Trong phương trình này “tan tế bào cơ sở” là OD ở A412nm từ SRBC ủ trong dung dịch đệm GVB++ không chứa huyết thanh. “Tan tế bào tối đa” là OD ở A412nm từ SRBC xử lý bằng nước. Kết quả được biểu diễn theo % tan huyết, được phân tích bằng cách sử dụng hồi quy không tuyến tính (logistic 4 tham số) bằng phần mềm Prism 6 (GraphPad) để thu trị số IC₅₀. Dữ liệu được biểu diễn theo sai số tiêu chuẩn trung bình $\pm$).

Thử nghiệm 1

Trong thử nghiệm này, được động học và được lực học của kháng thể làm ví dụ H4H12166P được đánh giá khi so với so sánh 1 và so sánh 2 ở chuột C5 nhân hóa. Tổng mức độ C5 của con người lưu hành được xác định bằng ELISA bổ sung cho con người (Abcam, cat # ab125963), được thực hiện theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Nồng độ trung bình của con người C5 ở chuột được xác định là $39.73\mu\text{g/mL} \pm 17.82\mu\text{g/mL}$. Có sự khác nhau giữa chuột đực ($55.4 \pm 1.7\mu\text{g/ml}$, n=47) và chuột cái ($24.7 \pm 0.6\mu\text{g/ml}$, n=49).

Trước khi dùng liều kháng thể, chuột C5 được nhân hóa và được phân tầng theo mức độ trung bình của con người $40\mu\text{g/mL}$. Đối với mỗi kháng thể kháng C5, đoàn hệ của hai mươi hai con chuột đã nhận được một liều H4H12166P 15mg / kg duy nhất, So sánh 1 so sánh 2 bằng cách tiêm dưới da (s.c.). Tất cả chuột được tiêm trước và sau một ngày tiêm để phân tích PK. Ngoài ra, vào lúc 10, 20, 30, 40 và 50 ngày sau khi tiêm, các nhóm 4 chuột 5 từ mỗi đoàn hệ đã được tiêu hóa và chảy máu đầu cuối được thu thập để phân tích PK và PD. Mẫu huyết thanh ngày 1 là giá trị trung bình của toàn bộ đoàn 22 con chuột. Máu được xử lý thành huyết thanh và đông lạnh ở -80°C cho đến khi phân tích.

Tổng nồng độ kháng thể được xác định tại 7 điểm thời gian và phân trăm hoạt tính tan huyết được xác định tại 6 điểm thời gian trong vòng 50 ngày trong vòng đời. Tổng nồng độ kháng thể kháng C5 được tóm tắt trong Bảng 26. Tổng nồng độ kháng thể trung bình so với hồ sơ thời gian được thể hiện trong Hình 4. Các thông số PK trung bình được mô tả trong Bảng 27.

Bảng 26: Nồng độ trung bình của tổng IgG trong huyết thanh sau khi tiêm một liều 15 mg / kg tiêm dưới da vào kháng thể kháng C5 ở chuột

Thời gian (Ngày)	#	Nồng độ huyết thanh của Ab ($\mu\text{g/mL}$) Trung bình $\pm$ SD		
		H4H12166P	So sánh 1	So sánh 2
1	22	178 $\pm$ 22,7	229 $\pm$ 40,7	164 $\pm$ 24,1
10	4	83,7 $\pm$ 22,2	102 $\pm$ 22,9	44 $\pm$ 24,1
20	5	57,1 $\pm$ 26,8	29 $\pm$ 31,3	11,4 $\pm$ 10,3
30	5	38,1 $\pm$ 7,6	30,1 $\pm$ 34,2	3,6 $\pm$ 3,2
40	4	11,9 $\pm$ 5,0	0,4 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,4
50	4*	9,3 $\pm$ 12,2	0,3 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2

Thời gian = Thời gian tính theo giờ sau khi tiêm một liều; Ngày = Ngày học; SD = Độ lệch chuẩn; SEM = Sai số chuẩn của giá trị trung bình; ND = Không được phát hiện; NS = Không có mẫu. * Đối với Bộ so sánh 2, ngày 50, n = ba do không thể phân tích một mẫu do các vấn đề kỹ thuật..

Bảng 27: Tham số PK

Tham số	Đơn vị	H4H12166P	So sánh 1	So sánh 2
Nồng độ mAb ngày 1	$\mu\text{g/mL}$	178	229	164
AUC _{last}	day $\cdot\mu\text{g/mL}$	2801	2708	1418
t _{1/2}	d	11,3	4,7	7,6

C_{max} = Nồng độ đỉnh; AUC = Vùng dưới đường cong thời gian tập trung; AUC_{last} = AUC được tính từ thời điểm 0 đến thời điểm nồng độ dương cuối cùng; T_{1/2} = nửa chu kỳ phân rã

Nồng độ trung bình so với hồ sơ thời gian ở ngày 1 cho thấy ba kháng thể H4H12166P, So sánh 1 và So sánh 2 có nồng độ trong huyết thanh tương đương lần lượt là 178, 229 và 164 $\mu\text{g/mL}$. So sánh 1 có hồ sơ loại bỏ tương tự H4H12166P cho đến ngày 30, nhưng vào những ngày 40 và 50 thể hiện sự gia tăng nhanh chóng về độ thanh thải so với H4H12166P. Vào ngày thứ 50, H4H12166P có nồng độ huyết thanh kháng thể trung bình khoảng 9 $\mu\text{g/mL}$, trong khi So sánh 1 và So sánh 2 đều có nồng độ huyết thanh kháng thể trung bình thấp hơn 30 lần là 0,3 $\mu\text{g/mL}$. So sánh 2 cho thấy mức độ phơi nhiễm thấp nhất trong ba kháng thể được thử nghiệm, với AUC_{last} thấp hơn khoảng 2 lần (1408 ngày $\cdot\mu\text{g/mL}$) so với H4H12166P (2801 ngày $\cdot\mu\text{g/mL}$) và So sánh 1 (2708 ngày $\cdot\mu\text{g/mL}$).

Tác dụng dược lý của kháng thể kháng C5 H4H12166P, So sánh 1 và So sánh 2 từ các mẫu huyết thanh chuột nhân tạo được bổ sung với C3 của người được đo đến ngày 50 và được xác định bằng ex vivo bằng phương pháp tan huyết SRBC nhạy. Tỷ lệ tan máu trung bình trung bình cho mỗi kháng thể kháng C5 được tóm tắt trong Bảng 28 và tỷ lệ tan huyết phần trăm trung bình so với hồ sơ thời gian được thể hiện trên Fig.5.

Bảng 28: Hoạt tính tan huyết theo tỷ lệ phần trăm của con đường cổ điển Ex Vivo của kháng thể kháng C5

Thời gian (ngày)	#	% tan huyết theo con đường cổ điển trong huyết thanh chuột 10%, 60 phút, trung bình $\pm$ SEM		
		H4H12166P	So sánh 1	So sánh 2
1	22	NS	NS	NS
10	4	12,6 $\pm$ 7,79	10,39 $\pm$ 2,88	12,06 $\pm$ 9,12
20	5	18,8 $\pm$ 8,1	21,59 $\pm$ 17,53	65,08 $\pm$ 52,87
30	5	13,76 $\pm$ 10,9	78,98 $\pm$ 40,3	91,67 $\pm$ 16,74
40	4	41,71 $\pm$ 40,7	101,09 $\pm$ 4,01	68,99 $\pm$ 42,47
50	4*	62,2 $\pm$ 56,6	88,99 $\pm$ 17,51	105,14 $\pm$ 4,07

Thời gian = Thời gian tính theo giờ sau khi tiêm một liều; Ngày = Ngày học; SEM = Sai số chuẩn của giá trị trung bình; ND = Không được phát hiện; NS = Không có mẫu. * Đối với Công cụ so sánh 2, ngày 50, n = ba do không thể phân tích một mẫu do vấn đề kỹ thuật

H4H12166P, So sánh 1 và So sánh 2 đã ức chế hoạt động tan huyết bổ sung cuối cùng có vẻ tương quan với phơi nhiễm kháng thể. H4H12166P đã chặn hơn 85% hoạt động tan huyết cho đến ngày 30 với hoạt động trở lại mức cơ bản trước ngày 50. So sánh 1 và So sánh 2 đã chặn khoảng 80% hoạt động tan huyết cho đến ngày 20 và ngày 10 với hoạt động trở về mức cơ bản ngày 30 cho cả hai

Thử nghiệm 2

Trong thử nghiệm này, dược động học và dược lực học của kháng thể kháng C5 H4H12166P, H4H12161P, So sánh 1, và lớp kháng thể đối chứng được đánh giá ở chuột C5 nhân hóa (chuột đồng hợp tử cho biểu hiện của con người C5). Tổng mức độ lưu hành của C5 được xác định bằng ELISA bổ sung cho con người (Abcam, loại

ab125963), được thực hiện theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Nồng độ trung bình của con người C5 ở chuột được xác định là $48,98\mu\text{g/mL} \pm 15,1\mu\text{g/mL}$.

Trước khi dùng liều kháng thể, chuột đực và chuột cái được nhân hóa đã được phân tầng theo mức độ con người trung bình là $50\mu\text{g} / \text{mL}$. Đối với mỗi mSA kháng C5, đoàn hệ của năm con chuột đã được tiêm một liều tiêm dưới da $15\text{mg} / \text{kg}$ (s.c.) H4H12166P, H4H12161P, So sánh 1 hoặc lớp kháng thể đối chứng. Tất cả các con chuột đã được tiêm trước, 6 giờ, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 21, 30 và 45 ngày sau khi tiêm để phân tích PK. Ngoài ra, vào ngày 59, tất cả chuột từ mỗi nhóm đã được phú dưỡng và chảy máu đầu cuối được thu thập để phân tích PK và PD. Máu được xử lý thành huyết thanh và đông lạnh ở -80°C cho đến khi phân tích.

Tổng nồng độ kháng thể được xác định tại 12 điểm thời gian và phần trăm hoạt tính tán huyết được xác định tại 1 thời điểm trong thời gian 59 ngày trong vòng đời. Tổng nồng độ kháng thể trong huyết thanh cho mỗi kháng thể kháng C5 được tóm tắt trong Bảng 29. Tổng nồng độ kháng thể trung bình theo hồ sơ thời gian được thể hiện trong Hình 6. Các thông số PK trung bình được mô tả trong Bảng 30.

Bảng 29: Nồng độ trung bình của IgG toàn phần trong huyết thanh sau khi tiêm dưới da $15\text{ mg} / \text{kg}$ tiêm kháng thể được chọn lọc ở chuột C5 giống người

Thời gian (ngày)	Nồng độ huyết thanh của Ab ($\mu\text{g/mL}$) trung bình $\pm$ SD			
	H4H12166P	H4H12161P	So sánh 1	Lớp kháng thể đối chứng
0	ND	ND	ND	ND
0,25	$31,2\pm 4,2$	$43,5\pm 16,3$	$59,2\pm 24,1$	$61,5\pm 29,4$
1	$149,9\pm 16,1$	$193,8\pm 24,1$	$179,0\pm 9,8$	$213,1\pm 17$
2	$160,8\pm 20$	$221\pm 26,5$	$166,6\pm 22,3$	$188,8\pm 25,8$
3	$166,2\pm 12,4$	$210\pm 31,2$	$159,2\pm 33,2$	$177,9\pm 26,2$
7	$158,6\pm 8,5$	$162,5\pm 34,8$	$136,1\pm 38,1$	$184,9\pm 33,9$
10	$123,5\pm 28,7$	$133,2\pm 20,2$	$107,2\pm 45,7$	$159,5\pm 28,8$
13	$93,7\pm 23,6$	$97,2\pm 24,6$	$70,6\pm 38$	$117,2\pm 24,1$
21	$60,4\pm 14,9$	$42,4\pm 30,3$	$29,5\pm 20,6$	$80,0\pm 17,5$
30	$37,8\pm 10,8$	$15,3\pm 19,7$	$4,2\pm 3,5$	$42,1\pm 6,7$
45	$20,7\pm 5,2$	$3,5\pm 5,2$	$0,4\pm 0,3$	$16,5\pm 13,9$
59	$4,1\pm 1,9$	$0,6\pm 1,0$	$0,08\pm 0,04$	$4,6\pm 4,5$

Thời gian = Thời gian tính theo giờ sau khi tiêm một liều; Ngày = Ngày học; SD = Độ lệch chuẩn; SEM = Sai số chuẩn của giá trị trung bình $\therefore$ ND = Không được phát hiện; NS = Không có mẫu.

Bảng 30: Tham số PK

Tham số	Đơn vị	Kháng thể thử nghiệm (trung bình $\pm$ SD)			
		H4H12166P	H4H12161P	So sánh 1	Lớp kháng thể đối chứng
$C_{\max}$	$\mu\text{g/mL}$	178 ± 10	225 ± 22	183 ± 18	221 ± 19
AUC_{last}	$\text{d.}\mu\text{g/mL}$	3490 ± 590	3040 ± 900	2240 ± 780	4080 ± 480
$t_{1/2}$	D	11 ± 1	$5,8 \pm 2$	$4,2 \pm 1$	$9,9 \pm 4$

$C_{\max}$ = Nồng độ đỉnh; AUC = Vùng dưới đường cong thời gian tập trung; AUC_{last} = AUC được tính từ thời điểm 0 đến thời điểm nồng độ dương cuối cùng; $T_1 / 2$ = nửa chu kỳ phân rã.

Nồng độ trung bình so với hồ sơ thời gian cho thấy H4H12166P, H4H12161P, So sánh 1 và kiểm soát kiểu mẫu đạt nồng độ tối đa trong huyết thanh ($C_{\max}$) trong khoảng từ 1 đến 3, với các giá trị $C_{\max}$ tương đương trong vòng 1,3 lần (178, 225, 183 và 221) $\mu\text{g} / \text{mL}$. H4H12166P và lớp kháng thể đối chứng có profile loại trừ tương tự, với nồng độ thuốc còn lại khoảng $4\mu\text{g} / \text{mL}$ vào ngày 59. H4H12161P thể hiện độ thanh thải nhanh hơn H4H12166P và kiểm soát isotype nhưng bị xóa chậm hơn so với So sánh 1. Vào ngày 59, H4H12161P có nồng độ thuốc trong huyết thanh là $0,6\mu\text{g} / \text{mL}$ trong khi So sánh 1 mức độ thuốc gần như không thể phát hiện là $0,08\mu\text{g} / \text{mL}$.

Lớp kháng thể đối chứng, H4H12166P và H4H12161P thể hiện các giá trị phơi nhiễm tương đương (AUC_{last}) trong vòng 1,3 lần (4080, 3490 và 3040 ngày $\cdot \mu\text{g} / \text{mL}$, tương ứng) trong khi Bộ so sánh 1 thể hiện mức phơi nhiễm thấp hơn 1,6 lần (2240 ngày $\cdot \mu\text{g} / \text{mL}$) so với H4H12166P.

Ví dụ 12: Xét nghiệm dựa trên LC-MRM-MS để xác định nồng độ của tổng C5 người

Trong ví dụ này, nồng độ trong huyết thanh của tổng số người ở người được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng kết hợp với phương pháp quang phổ khối theo dõi phản ứng (LC-MRM-MS) trong nghiên cứu dược động học / dược lực học của kháng thể kháng H4H12166P.

Nồng độ trong huyết thanh của tổng số C5 người được xác định bằng cách đo nồng độ của một peptide 10 axit amin có trong chuỗi LQGTLPVEAR của C5 (aa

1129-1138 của SEQ ID NO: 359) làm đại diện cho C5. Về mặt lý thuyết, phương pháp này cũng có thể phát hiện ra sản phẩm tách C5, C5b. Tuy nhiên, do tính không ổn định của C5b tự do, nồng độ C5b trong huyết thanh thường thấp với phần lớn C5b được liên kết với bề mặt tế bào dưới dạng phức hợp MAC (Cooper & Muller-Eberhard 1970, J. Exp. Med. 132: 775-93; Hadders et al 2012, Cell Rep. 1: 200-7). Do đó, các mẫu huyết thanh đã xử lý được phân tích ở đây có khả năng chỉ chứa một lượng không đáng kể sản phẩm C5b, nếu có.

Phương pháp

Đối với nghiên cứu PK / PD, chuột nhận được một liều H4H12166P 15mg / kg duy nhất bằng cách tiêm dưới da (s.c.). Tất cả những con chuột được tiêm trước và sau một ngày tiêm để phân tích PK. Ngoài ra, vào lúc 10, 20, 30, 40, 50 và 60 ngày sau tiêm, chuột đã được tiêu hóa và chảy máu đầu cuối được thu thập để phân tích PK và PD.

C5 người được sử dụng làm tiêu chuẩn tham chiếu để hiệu chuẩn; và peptit C5 người được sản xuất với dư lượng arginin có nhãn đồng vị ổn định ở đầu C được sử dụng làm tiêu chuẩn nội tại (LQGTLPVEAR-¹³C₆¹⁵N₄). Tiêu chuẩn tham chiếu đã được sử dụng ở nồng độ từ 3,9 đến 250 g / mL (pha loãng nối tiếp 1: 2) trong huyết thanh từ những con chuột bị loại ra khỏi nhà C5, trong đó gen C5 của chuột đã bị xóa (C5 - / -). Huyết thanh từ C5 - / - chuột cũng được sử dụng làm đối chứng âm (trống). Tiêu chuẩn hiệu chuẩn, mẫu trắng và mẫu huyết thanh nghiên cứu (mỗi mẫu 10 L) được sấy khô và sau đó được biến tính trong 100µL urê 8M/20mM Tris (2-carboxyetyl) phosphin (TCEP) ở 37°C trong 1 giờ. Tiếp theo, 10 µL tiêu chuẩn nội tại 25nM đã được thêm vào tất cả các mẫu. Các mẫu được kiềm hóa bằng 10mM 2-iodoacetamid ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và được pha loãng bằng cách sử dụng amoni bicarbonat 50mM đến thể tích cuối cùng là 500µL. Các mẫu sau đó được phân hủy bằng trypsin (1:20 trọng lượng) qua đêm ở 37°C. LQGTLPVEAR tryptic có nguồn gốc từ C5 được phát hiện và định lượng bằng LC-MRM-MS sử dụng Waters Xevo TQ-S với hệ ACQUITY UPLC. Mỗi mẫu được xử lý (10 µL) được bơm vào Cột ACQUITY UPLC BEH C18 đã được cân bằng trước. Tốc độ dòng chảy là 0,6mL / phút (Pha động A: nước: axit formic / 100: 0,1 [thể tích] và Pha động B: axetonitril: axit formic / 100: 0,1 [thể tích]). Thời gian lưu và diện tích cực đại được xác định bằng

sử dụng phần mềm Masslynx Analyst Data (Waters). Nồng độ của chất phân tích C5 được tính toán từ đường chuẩn được xây dựng bằng cách vẽ tỷ lệ diện tích đỉnh của chuẩn đối chiếu C5 (C5 peptit không đánh dấu LQGTLPVEAR- $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$ được tạo ra bằng tiêu hoá tryptic hC5) đến tiêu chuẩn nội tại (C5 peptit đánh dấu phóng xạ ổn định) đổi lại nồng độ danh nghĩa của tiêu chuẩn tham chiếu C5. Nồng độ được tính toán bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Nồng độ thấp nhất của tiêu chuẩn tham chiếu C5 (3,9 $\mu\text{g/mL}$) nằm trong phạm vi động của xét nghiệm và được xác định là thử nghiệm LLOQ.

Kết quả

Nồng độ của tổng số C5 người trong huyết thanh đã được đánh giá cho các mẫu được thu thập và thông qua chảy máu đuôi trước khi dùng thuốc (trước) và qua thiết bị đầu cuối chảy máu vào các ngày 10, 30 và 35, từ các động vật tương ứng. Tổng nồng độ hC5 sau khi dùng liều H4H12166P tương tự nhau (trong khoảng 1 đến 0,9 lần) để dự đoán mức độ vào các ngày 10, 30 và 35 sau khi dùng thuốc. Sự khác biệt nhỏ quan sát được không có ý nghĩa thống kê như được đánh giá bằng thử nghiệm MannTHER Whitney bằng phần mềm GraphPad Prism. Phân tích tỷ lệ mol của C5 / H4H12166P đã chứng minh rằng H4H12166P vẫn ở mức vượt quá số mol của C5 qua liều 35 sau ngày (Bảng 31).

Bảng 31: Tổng kết đặc điểm PD của H4H12166P

Ngày sau dùng liều	% tan huyết CP trung bình±SD	% ức chế	C5 (μg/mL)			H4H12166P (μg/mL) Trung bình±SD	Tỷ lệ mol cuối cùng C5: H4H12166P
			Trước dùng liều	Kết thúc	Lần thay đổi		
0	77,2	0	n/d			n/a	n/a
10	5,2	93	34,2	30,0	1,0	78,8	0,3
30	7,4	90	31,9	28,4	0,9	30,4	0,8
35	6,0	92	36,1	32,7	1,0	29,6	0,9
40	37,1	52	n/d			20,9	n/d
50	Tất cả động vật trong nhóm được loại trừ do độ chuẩn MAHA > 1000						
60	73,57	5	n/d			5,9	n/d

^a% ức chế hoạt động tán huyết CP được tính từ giá trị tán huyết % CP trung bình vào liều sau ngày chỉ định so với giá trị tán huyết % CP trung bình vào ngày 0. Thay đổi
^bLần = thiết bị đầu cuối (chỉ định liều sau ngày) SD = độ lệch chuẩn; MAHA = kháng thể chống chuột; n / d = không xác định

Động vật có dữ liệu bị ảnh hưởng MAHA hoàn toàn bị loại trừ khỏi các tính toán (2x ngày 30, 1x ngày 35, 2x ngày 40 và cả 4 con chuột vào ngày 50)

Ví dụ 13: Lập bản đồ epitop của H4H12166P gắn kết với C5 nhờ sự trao đổi hydro/doteri

Việc lập bản đồ epitop trao đổi H / D với phép đo phổ khối đã được thực hiện để xác định dư lượng axit amin của hC5 [(axit amin M1 - C1676 của SEQ ID No: 359) với H4H12166P tương tác. Một 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 và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Các thử nghiệm HDX-MS được thực hiện trên nền tảng Waters HDX / MS tích hợp, bao gồm hệ thống Leaptac HDX PAL để dán nhãn doteri, M-Class Waters Acquity (Trình quản lý dung môi phụ) để tiêu hóa mẫu và nạp, M-Class Waters Waters (dung môi nhĩ phân người quản lý) cho độ dốc cột phân tích, và máy quang phổ khối lượng Synapt G2-Si để đo khối lượng peptit peptic.

Dung dịch đánh dấu được chuẩn bị trong dung dịch đệm PBS 10mM trong D₂O ở pD 7,0 (tương đương với độ pH=6,6). Để đánh dấu dơ te ri, 3,8μL C5 (6pmol / μL), C5 được trộn sẵn với kháng thể theo tỷ lệ mol 1: 1 đã được ủ với dung dịch ghi nhãn D₂O 56,2 μL cho các thời điểm khác nhau (ví dụ, kiểm soát không khử trùng = 0 giây, trong 1 phút và 20 phút). Việc khử màu được làm nguội bằng cách chuyển mẫu 50 μL sang dung dịch đệm đã được làm lạnh trước 50 μL (TCEP 0,2 M, guanidin clorua 6 M trong dung dịch đệm 100 mM phosphat, pH=2,5) và mẫu hỗn hợp được ủ ở 1,0°C trong hai phút. Mẫu đã được làm nguội sau đó được đưa vào Trình quản lý Waters HDX để tiêu hóa pepsin / proteaza XIII. Các peptit được tiêu hóa đã bị giữ lại trên cột trước ACQUITY UPLC BEH C18 1,7-1,7m, 2,1 × 5mm ở 0°C và rửa giải cho cột phân tích ACQUITY UPLC BEH C18 1,7μm, 1,0 × 50mm tách gradient 5% -40% B (pha động A: axit formic 0,1% trong nước, pha động B: axit formic 0,1% trong axetonitril). Máy quang phổ khối được đặt ở điện áp hình nón 37 V, thời gian quét 0,5 giây, và phạm vi khối lượng / diện tích của 50-1700 đơn vị Thomson (Th).

Để xác định các peptit từ C5 người, dữ liệu LC-MSE từ mẫu không bị biến dạng đã được xử lý và tìm kiếm dựa trên cơ sở dữ liệu bao gồm C5 người, pepsin và trình tự ngẫu nhiên của chúng thông qua phần mềm Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Các peptit đã xác định được nhập vào phần mềm DynamX và được lọc theo hai tiêu chí: (1) sản phẩm tối thiểu trên mỗi axit amin = 0,3 và (2) ngưỡng sao chép tệp

= 3. Phần mềm DynamX sau đó tự động xác định mức độ hấp thụ dơ te ri của mỗi peptit dựa trên thời gian lưu và cao độ chính xác khối lượng (<10ppm) trên nhiều điểm thời gian với 3 lần lặp lại mỗi lần.

Sử dụng cột pepsin / proteaza XIII trực tuyến kết hợp với thu thập dữ liệu MSE, tổng số 189 peptide từ người C5 đã được xác định trong trường hợp không có sự hiện diện của kháng thể, chiếm tỷ lệ bao phủ 62%. Năm peptit đã làm giảm đáng kể sự hấp thụ khử cực (giá trị delta trung tâm > 0,9 dalton với giá trị p < 0,05) khi liên kết với H4H12166P và được minh họa trong Bảng 32.

Bảng 32: Dơ te ri hoá C5 peptit người khi gắn kết với H4H12166P

Gốc	1 phút đơteri hoá			20 phút đơteri hoá		
	C5 Centroid H ⁺	C5+H4H12166 P Centroid MH ⁺	Δ	C5 Centroid MH ⁺	C5+H4H12166 P Centroid MH ⁺	Δ
591- 599	1015,38±0,09	1014,44±0,16	- 0,9 3	1015,64±0,0 4	1014,60±0,08	- 1,04
593- 599	769,41±0,11	768,33±0,05	- 1,0 8	769,65±0,01	768,30±0,004	- 1,35
775- 787	1693,81±0,1 1	1692,85±0,07	- 0,9 6	1694,06±0,0 4	1692,96±0,02	- 1,10
775- 794	2439,62±0,2 9	2438,42±0,20	- 1,2 0	2440,16±0,0 6	2439,17±0,21	- 0,99
779- 787	1141,14±0,0 4	1140,21±0,05	- 0,9 3	1141,23±0,0 3	1140,21±0,02	- 1,02

Khối lượng peptit được ghi lại tương ứng với giá trị trung bình của khối lượng MH + trung tâm từ ba lần lặp. Các peptit này, tương ứng với các axit amin 591-599 và 775-794, có tốc độ khử màu chậm hơn khi liên kết với H4H12166P. Các dư lượng được xác định này cũng tương ứng với các dư lượng 591-599 và 775-794 của con người C5 như được xác định bởi mục nhập Uniprot P01031 (CO5_HUMAN; SEQ ID NO: 359).

Ví dụ 14: Tác dụng của kháng thể kháng C5 đối với chứng viêm mắt trong bệnh viêm màng mạch nhô tự miễn dịch ở chuột

Nghiên cứu hiện tại được thực hiện để đánh giá vai trò của C5 trong viêm màng bồ đào tự miễn (EAU). Cả hai phương pháp di truyền [loại bỏ C5 (KO), chuột đôi KO/C3], và phương pháp dược lý (kháng thể kháng kháng thể) đã được sử dụng.

Phương pháp

Chuột trưởng thành C57BL/6J (n=25, Jackson labs), C5 KO (n=13) và chuột C3/C5 KO (n=8) (Regeneron Pharmaceuticals Inc.) được sử dụng. EAU được cảm ứng bằng cách tiêm dưới da peptit protein liên kết với retinoit ở người (IRBP, New England Peptide) trong tá dược Freund và thuốc tiêm ho gà trong màng bụng. mAb kháng C5 chuột và mAb lớp kháng thể đối chứng được dùng dưới da cứ sau 3 ngày kể từ ngày 5 đến 28. Kháng thể kháng C5 chuột được sử dụng trong nghiên cứu này (M1M17628N) bao gồm HCVR/LCVR của SEQ ID NO: 362/363. SPECTRALIS® HRA+OCT (Heidelberg Engineering, Inc.) được sử dụng để đánh giá mức độ viêm trong các ngày -1, 7, 14, 21 và 28. Tất cả các động vật đều được tiêu hóa vào ngày 28 để lấy máu và mắt. Xét nghiệm tan huyết có / không có C3 người được thực hiện để xác nhận sự ức chế bổ sung. Dữ liệu được phân tích bởi ANOVA.

Kết quả

So với chuột hoang dã, tỷ lệ xuất hiện viêm (30-50%) và số lượng tế bào thủy tinh thể đã giảm đáng kể ở chuột C5 KO ($p < 0,01$). Điểm chụp cắt lớp kết hợp quang học (OCT) ở chuột C5 KO cũng giảm đáng kể 50% ở tuần thứ 3 ($p < 0,0001$). Điều thú vị là ở chuột KO đôi C3 / C5, có các cụm tế bào thủy tinh thể đáng kể hơn và điểm số bệnh cao hơn vào ngày 28 so với chuột hoang dã ($p < 0,05$). Ở động vật được dùng thuốc chống mAb kháng C5 (50mg /kg), tỷ lệ viêm và cụm tế bào thủy tinh thể thấp hơn đáng kể so với nhóm không kiểm soát isotype điều trị vào ngày 21 ($p < 0,01$). Ở tuần thứ 3 và 4, điểm số OCT ở nhóm được điều trị bằng kháng thể kháng C5 thấp hơn đáng kể so với không điều trị bằng lớp kháng thể đối chứng ($p < 0,0001$). (Fig.7) Các xét nghiệm tan huyết có / không có C3 người đã xác nhận tác dụng ức chế của kháng thể kháng C5 ở tuần thứ 4 (Fig.8).

Kết luận

Viêm mắt do EAU đã được giảm nhẹ bằng cách ức chế hoạt động của C5, bằng cách xóa gen ức chế được lý ức chế với một kháng thể kháng C5 cụ thể. Suy giảm C5 chậm xuất hiện EAU và giảm điểm bệnh OCT. Những kết quả này chỉ ra rằng C5 là một mục tiêu điều trị tiềm năng cho viêm màng bồ đào tự miễn. Kháng thể kháng C5 có tác dụng bảo vệ bệnh EAU ở chuột hoang dã. Những phát hiện của chúng tôi cũng cho thấy rằng C3 có thể có lợi cho bệnh EAU ở chuột.

Ví dụ 15: Tác dụng của kháng thể kháng C5 người đối với viêm màng mạch nhô tự miễn dịch

Ví dụ này mô tả tác dụng của kháng thể kháng C5 đối với C5 người trong mô hình chuột của viêm màng bồ đào tự miễn (EAU). Những con chuột được sử dụng cho nghiên cứu này đã được nhân hóa để biểu thị protein C5 của con người bằng công nghệ Velocigene® (Valenzuela et al 2003, Nat. Biotechnol. 21: 652-659). Chuột được nhân hóa đã được thiết kế để thay thế exon 2 thông qua exon 41 của gen C5 chuột bằng exon 2 - 42 của gen C5 ở người.

Phương pháp

Chuột trưởng thành, chuột đực được tiêm dưới da ở mỗi đùi với 150µg peptit 1-20 gắn kết với protein retinoit gắn kết người (IRBP) (GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) (SEQ ID NO: 364) (Avichezer et al 2000, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41:127–131) trong 0,2ml nhũ tương CFA, được bổ sung chủng *Mycobacterium tuberculosis* H37RA đến 2,5mg/ml. Tiếp theo, lây nhiễm chuột trong mắt với 1,0µg độc tố ho gà (PTX) để cảm ứng tính tự miễn dịch qua trung gian tế bào bằng cách thúc đẩy sự phân cực Th1 của đáp ứng miễn dịch (Thurau et al 1997, Clin. Exp. Immunol. 109: 370-376; Silver et al 1999, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 2898–2905). Kiểm tra trọng lượng cơ thể động vật hai lần một tuần.

Kiểm tra nhãn khoa được thực hiện vào ngày -1, trước khi gây ra EAU và vào các ngày 7, 14, 21 và 28. Chuột được gây mê bằng ketamin (120mg/kg, IP) và xylazin (5mg/kg, IP). Làm giãn đồng tử bằng dung dịch thuốc giảm đau mắt 0,5% Tropicamide và đáy mắt được kiểm tra bằng kính áp tròng với máy ảnh đáy mắt trong một nền tảng chụp mạch võng mạc Spectralis Heidelberg (HRA) + hệ thống OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA).

Một dãy gồm 61 phần quang học bên đã thu được cho mỗi mắt bằng chức năng OCT trên hệ thống Spectralis HRA + OCT (Heidelberg Engineering, Carlsbad, CA, USA)). Vùng hình ảnh OCT tập trung vào đĩa quang cho phép chụp ảnh bằng nhau ở trên và dưới đầu dây thần kinh thị giác. Độ dày võng mạc được đo bằng khoảng cách giữa đáy của lớp RPE đến màng giới hạn bên trong của mắt. Các phép đo được lấy 1500µm từ đĩa quang, và các giá trị từ 4 góc phần tư võng mạc khác nhau (ví dụ, cao cấp, kém hơn, tạm thời và mũi) được lấy trung bình cho độ dày trung bình của mắt.

Mức độ nghiêm trọng của thâm nhiễm tế bào viêm vào thủy tinh thể cũng được phân loại bằng hình ảnh OCT, bằng cách đánh giá số lượng trung bình của các cụm tế bào viêm trong thủy tinh thể, trong bốn lần quét OCT bên ngang qua dây thần kinh thị giác, trên mỗi mắt.

Thang đo 4 điểm được phát triển để đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh trong hình ảnh OCT (Điểm OCT) (Bảng 33).

Bảng 33: Ghi điểm số EAU in vivo sử dụng chụp cắt lớp quang học (OCT)

Loại	Tiêu chuẩn
0	Không thay đổi
0,5 (Dấu)	Xâm nhập tế bào viêm nhỏ trong thủy tinh thể, chủ yếu ở gần đầu dây thần kinh thị giác (<15 cụm)
1	Xâm nhập tế bào viêm nhỏ trong thủy tinh thể, chủ yếu ở gần đầu dây thần kinh thị giác (<25 cụm); tổn thương tiểu khu trú (đốm xám) ở ngoại vi; nếp gấp võng mạc nhỏ ở ngoại vi; giãn mạch máu võng mạc; viêm màng ngoài tim và viêm mạch
2	Xâm nhập tế bào viêm vừa phải trong thủy tinh thể khuếch tán nhiều hơn nhưng không ở ngoại vi xa (<50 cụm); phá vỡ lớp võng mạc; hình thành u hạt nhỏ đến trung bình với nếp gấp võng mạc chủ yếu ở ngoại vi; giãn nở tảo; tiểu não màng đệm khu trú nhỏ; viêm màng ngoài tim và viêm mạch; phù võng mạc nhỏ (<10 µm)
3	Xâm nhập tế bào viêm lan tỏa từ trung bình đến nặng trong thủy tinh thể (> 50 cụm); sự phá vỡ lớp võng mạc khuếch tán và các mạch giãn trong lớp hạt nhân bên trong; hình thành từ trung bình đến lớn - u hạt với nếp gấp võng mạc trong suốt võng mạc; giãn mạch máu võng mạc nghiêm trọng; viêm màng ngoài tim và viêm mạch; trung gian lan tỏa màng đệm lan tỏa vừa phải; phù trung bình đến nặng- võng mạc (10-40µm); bong

	võng mạc nhỏ
4	Xâm nhập tế bào viêm lan tỏa nghiêm trọng trong thủy tinh thể (> 70 cụm); sự gián đoạn lớp khuếch tán và các mạch giãn trong lớp hạt nhân bên trong; hình thành u hạt lan tỏa nghiêm trọng với nếp gấp võng mạc; rối loạn tân mạch màng đệm lan tỏa nặng; viêm màng ngoài tim và viêm mạch; Thoái hóa võng mạc, phù võng mạc nghiêm trọng (mắt 20 hoặc cm, tăng > 40 mm tương ứng); bong võng mạc lớn

Phân tích thống kê

Các phân tích thống kê cho dữ liệu tham số (trọng lượng cơ thể, cụm tế bào viêm trong thủy tinh thể và độ dày võng mạc) được thực hiện bằng xét nghiệm ANOVA một chiều và thử nghiệm so sánh nhiều lần của Tukey. Đối với các phân tích dữ liệu không theo tỷ lệ (điểm OCT và điểm mô học) được thực hiện bằng thử nghiệm Kruskal-Wallis và thử nghiệm Dunn, với phần mềm GraphPad Prism phiên bản 5.0d so với các nhóm không điều trị lớp kháng thể đối chứng. Dữ liệu hiển thị giá trị trung bình $\pm$ SEM. Giá trị p nhỏ hơn 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Trong một nghiên cứu đầu tiên (Nghiên cứu A), chuột được điều trị tiêm dưới da cứ sau 3 ngày kể từ ngày thứ 5 với kháng thể đối chứng (50mg/kg), 10mg /kg, 50mg/kg H4H12170P. Điều trị bằng 10mg/kg H4H12170P dẫn đến giảm viêm và tổn thương võng mạc (Fig.9). Chuột được điều trị bằng 1 mg/kg H4H12170P cũng cho thấy sự giảm đáng kể về mặt thống kê về điểm số OCT vào ngày 21 và ngày 28 (Fig.10).

Trong một nghiên cứu thứ hai (nghiên cứu B), chuột được điều trị tiêm dưới da cứ sau 3 ngày kể từ ngày thứ 6 với kháng thể đối chứng (10mg/kg), 3mg/kg, 10mg /kg H4H12166P, so với 2 (xem ví dụ 2; Cấu trúc điều khiển có thể được sử dụng trong các ví dụ sau đây. Điều trị bằng H4H12166P ở mức 3mg/kg hoặc 10mg/kg tạo ra sự giảm liên quan đến điểm số OCT có ý nghĩa thống kê trong các ngày từ 14 đến 28 (Fig.11). Điều trị bằng 10mg/kg H4H12166P ở chuột nhân tạo C5 bắt đầu 6 ngày sau khi gây cảm ứng EAU dẫn đến giảm viêm liên quan đến liều và tổn thương võng mạc như một ký hiệu OCT thu được vào ngày 14 đến 28 (Fig. 12).

Đối với cả hai nghiên cứu, đánh giá không xâm lấn, trong cuộc sống của OCT cho thấy sự phát triển tiến triển của viêm, tăng độ dày võng mạc và bất thường hình thái ở động vật đối chứng sau khi chúng ngừng bằng IRBP.

Kết luận

Các thử nghiệm này tạo ra thêm bằng chứng được lý rằng C5 đóng vai trò trong sinh bệnh học của viêm màng bồ đào tự miễn. Sự suy giảm được lý của con người C5 do kháng thể kháng kháng thể hoàn toàn ở người C5 đã trì hoãn tỷ lệ mắc EAU và giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh, thiết lập hiệu quả của các kháng thể này trong nhược cơ tự miễn.

Ví dụ 16: Tác dụng của kháng thể kháng C5 đối với thương tổn tái tưới máu do thiếu máu thận

Nghiên cứu hiện tại được thực hiện để đánh giá vai trò của C5 trong tổn thương tái tưới máu do thiếu máu cục bộ thận. Cả hai phương pháp di truyền (sử dụng chuột đột quy C3 và chuột đột quy C5) và phương pháp được lý (sử dụng kháng thể kháng C5) đã được sử dụng. Mô hình tái tưới máu thiếu máu cục bộ được gây ra bằng cách kẹp hai bên thận trong 45 phút sau 48 giờ tái tưới máu. Sham mổ nội soi làm đối chứng. Kháng thể kháng C5 được tiêm tĩnh mạch với liều 50mg/kg dưới dạng liều duy nhất ngay sau khi thiếu máu cục bộ (thuốc chữa bệnh); Tiêm dưới da hai liều, ngày -1 và ngày 1 phẫu thuật (ngăn ngừa). Kháng thể kháng C5 được sử dụng cho nghiên cứu này là M1M17628N bao gồm HCVR / LCVR của SEQ ID NO: 362/383. Nito urê máu (BUN) và chất đánh dấu creatinin huyết thanh đã được sử dụng để đánh giá mức độ bệnh và bảo vệ ở chuột.

Bảng 34: Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng ure nito huyết ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng C5 (M1M17628N) trong mô hình ngăn ngừa và điều trị

BUN, % thay đổi	RIRI + tá dược	RIRI + kháng thể đối chứng
	Ngày 2	Ngày 2
RIRI + M1M17628N (Prev)	-37,19	-34,68
RIRI + M1M17628N	- 53,70	-51,85

(Cur)		
-------	--	--

Bảng 35: Tỷ lệ phần trăm thay đổi về hàm lượng creatinin huyết thanh ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng C5 (M1M17628N) trong mô hình ngăn ngừa và điều trị

SCr, % thay đổi	RIRI + tá dược	RIRI + kháng thể đối chứng
	Ngày 2	Ngày 2
RIRI + M1M17628N (ngăn ngừa)	-53,09	-49,34
RIRI + M1M17628N (điều trị)	-59,40	-56,16

So với chuột hoang dã, chuột đột quỵ C3 và C5 cho thấy sự bảo vệ chức năng đáng kể trong mô hình RIRI của chấn thương thận cấp tính, bằng chứng là giảm nồng độ nitơ urê trong máu và nồng độ creatinin trong huyết thanh. Kháng thể kháng C5 cho thấy sự bảo vệ chức năng trong mô hình RIRI ở cả hai chế độ điều trị và phòng ngừa (Bảng 34-35).

Ví dụ 17: Tác dụng của kháng thể kháng C5 đối với viêm thận luput

Ví dụ này mô tả hiệu quả của kháng thể kháng C5 trong điều trị viêm thận luput trên mô hình chuột.

Luput ban đỏ hệ thống (SLE) là một rối loạn tự miễn dịch gây ra do mất khả năng tự kháng nguyên, sản xuất các kháng thể tự động và lắng đọng các phức hợp miễn dịch cố định bổ sung (IC) trong các mô bị tổn thương. SLE được đặc trưng bởi một loạt các biểu hiện lâm sàng và các cơ quan đích, với viêm thận lupus là một trong những biến chứng nghiêm trọng nhất. Bổ sung kích hoạt ở thận của bệnh nhân viêm thận lupus góp phần gây viêm và tổn thương mô. Hiệu quả của kháng thể kháng C5 trong điều trị viêm thận lupus đã được nghiên cứu ở chuột NZB WFl, mô hình chuột tự phát của viêm thận lupus (Yang et al 1996, PNAS). Chuột phát triển bệnh tự miễn giống như SLE người, tự kháng thể với kháng nguyên hạt nhân và protein màng tế

bào, giảm gama globulin, albumin niệu, protein niệu, khởi phát viêm cầu thận phức tạp miễn dịch và chết vì suy thận ở giai đoạn 35 đến 50 tuần tuổi.

Trong nghiên cứu này, chuột New Zealand 25 tuần tuổi được điều trị tiêm dưới da với 30 mg/kg kháng thể đối chứng, kháng thể kháng C5 hai lần một tuần trong 8 tuần sau đó ba lần một tuần trong 10 tuần. Các kháng thể chống chuột C5 được sử dụng cho nghiên cứu này lần lượt là M1M17628N và M1M17627N, HCVR / LCVR của SEQ ID NO: 362/343 và 365/366.

Việc điều trị bằng kháng thể kháng C5 cải thiện đáng kể tỷ lệ sống sót ở chuột (Fig.13). Cả hai kháng thể đều cải thiện albumin niệu sau 8-14 tuần điều trị (Fig.14), và nồng độ nitơ urê máu trong 12-16 tuần điều trị (Fig.15).

Ví dụ 18: Hiệu quả của kháng thể kháng C5 kháng sự chết tế bào hình sao

Viêm dây thần kinh thị giác (NMO) là bệnh tự miễn dịch của hệ thần kinh trung ương (CNS) mà chủ yếu ảnh hưởng đến thần kinh thị giác và tủy sống. Trong NMO, tự kháng thể kháng aquaporin-4 (AQP4-Ab) gây tổn hại cho tế bào hình sao bằng cách hoạt hoá tính độc tế bào phụ thuộc bổ sung (CDC). Mục tiêu của nghiên cứu này là để đánh giá vai trò của hệ bổ sung trong tiến trình NMO và sử dụng kháng thể kháng protein bổ trợ dưới dạng điều trị bệnh hiệu lực đối với NMO.

Tế bào hình sao của vỏ não chuột sơ cấp thu được từ vỏ não của chuột con sau khi sinh và được nuôi cấy với AQP4-Ab (kháng thể “rAb-53” từ công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2014/0170140; Bennett et al 2009, Ann. Neurol. 66: 617-629) và protein bổ sung chứng minh độc tế bào qua trung gian tế bào. Tiếp theo, các thử nghiệm được lặp lại với việc bổ sung kháng thể kháng C5 để chứng minh sự phong bế phá huỷ tế bào hình sao.

Để định lượng sự chết tế bào, thử nghiệm độc tế bào huỳnh quang CytoTox-Glo™ được thực hiện. Thử nghiệm này sử dụng các nồng độ khác nhau của kháng thể kháng C5 (0,001µg/ml, 0,01µg/ml, 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml, hoặc 1000µg/ml) hoặc kháng thể đối chứng thuộc lớp kháng thể.

Để xác định xem liệu kháng thể kháng C5 có phong bế CDC cảm ứng AQP4-Ab hay không, phủ tế bào hình sao và thử nghiệm độc tế bào CytoTox-Glo™ được lặp lại để xác định liều tối ưu của AQP4-Ab cho việc phủ đó. Nồng độ tối ưu của AQP4-Ab được tìm thấy là 50µg/mL và trong thử nghiệm tiếp theo, liều cố định của AQP4-

Ab (50µg/mL) được sử dụng, trong khi liều kháng thể kháng C5 được thay đổi. Như được thể hiện trên Fig.16, việc giảm RLU được nhìn thấy (trung bình 300k đến trung bình 100k) với sự gia tăng lượng kháng thể kháng C5 chứng minh rằng kháng thể kháng C5 phong bế sự chết của tế bào hình sao. Đối với cả hai thử nghiệm, RLU không làm thay đổi kháng thể đối chứng thuộc lớp kháng thể. Như được thể hiện trên Fig.16, kháng thể kháng C5 ức chế độc tế bào cảm ứng AQP4 Ab trên tế bào hình sao của vỏ não với IC50 từ 15 đến 17nM.

Trong nghiên cứu tiếp theo, kháng thể kháng AQP4 và kháng thể kháng C5 sẽ được tiêm vào trong não chuột để đánh giá hiệu quả điều trị chống độc tế bào qua trung gian bổ sung của tế bào hình sao trong CNS.

Ví dụ 19: Thử nghiệm biểu mô

Ví dụ này mô tả thử nghiệm biểu mô thận in vitro để thử nghiệm nếu kháng thể kháng C5 phong bế sự loại hết C5b-9 và C3.

Các phương pháp tái tạo để đánh giá tác dụng ức của dược chất đối với sự hoạt hoá bổ sung là cần thiết để phát triển cận lâm sàng. Do tính phức tạp của con đường hoạt hoá bổ sung, thử nghiệm sẽ sử dụng tế bào thích hợp và các điểm cuối đối với chỉ định điều trị đã nêu. Trong bản mô tả này, bằng cách sử dụng dòng tế bào biểu mô thận được làm bất hoạt của người (HGECs), mô hình loại hết C3 & C5 bổ sung sẵn có để sử dụng việc đánh giá hoạt tính phong bế của các mAb kháng C3 hoặc C5.

Phương pháp

Tế bào biểu mô thận người (HGEC; Cell Biologics) được phủ qua đêm trong môi trường đầy đủ vào trong đĩa 96 giếng đáy trong màu đen được phủ collagen I. Xử lý tế bào bằng PBS (đối chứng) hoặc hoạt hoá trong 10 phút bằng 10µM ADP. Sau khi rửa bằng PBS, thêm 50% huyết thanh người (bảo tồn bổ sung, loại hết C3 hoặc loại hết C5) trong 4 giờ. Thêm kháng thể kháng C5 ở 1mg/mL vào huyết thanh trước khi xử lý. Rửa tế bào và cố định và tạo đầu dò bằng kháng thể kháng C3b (ThermoFisher) và/hoặc kháng thể kháng C5b-9 (Abcam), kháng thể thứ hai và nhuộm bằng DAPI. Chụp ảnh trên ImagExpress và việc phân tích hình ảnh hàn lượng cao được sử dụng để

định lượng việc nhuộm huỳnh quang đối với mỗi ảnh và tính trị số trung bình trong mỗi điều kiện.

Kết quả

Sự kết lắng C3 và C5b-9 được quan sát trên HGEC hoạt hoá ADP được tiếp xúc với huyết thanh người bình thường nhưng không phải trên HGEC không hoạt hoá (C3: $1,5 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$; C5: $7,9 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^6$, $P < 0,05$ so với HGEC hoạt hoá không ADP). Sự kết lắng C3 và C5b-9 được giảm đáng kể trên HGEC hoạt hoá ADP tiếp xúc với huyết thanh loại hết C3 hoặc C5 (C3: $3,3 \times 10^5 \pm 4,8 \times 10^4$; C5: $1,5 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^5$, $P < 0,05$). Việc bổ sung mAb kháng C5 phong bế làm giảm đáng kể huyết thanh người bình thường thu dẫn đến sự kết lắng C5b-9 trên HGEC hoạt hoá ADP, sự kết lắng so sánh được với huyết thanh loại hết C5 (C5 mAb: $1,02 \times 10^6 \pm 6,0 \times 10^5$, mAb đối chứng $3,7 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$, $P < 0,05$ so với mAb đối chứng).

Kết luận

Các dữ liệu này chứng minh tính hữu ích của thử nghiệm nội mô thận người *in vitro* đối với sự kết lắng C3 và C5 bổ sung theo mô hình. Ngoài việc sàng lọc *in-vitro*, thử nghiệm này khiến cho mô hình dịch mã có khả năng đánh giá các chiến lược kháng bổ sung ở các bệnh thận sử dụng người bệnh tạo ra các mẫu huyết thanh.

Sáng chế không bị giới hạn ở phạm vi theo các phương án cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Thực vậy, các cải biến khác nhau của sáng chế ngoài các cải biến được mô tả sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa vào phần mô tả trên đây và các hình vẽ kèm theo. Các cải biến như vậy được dự định nằm trong phạm vi bảo hộ của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với protein yếu tố bổ sung 5 (C5), trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm

vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm

HCDR1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100,

HCDR2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102, và

HCDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104,

và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) that bao gồm

LCDR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 108,

LCDR2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 110, và

LCDR3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 112.

2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này có một hoặc nhiều đặc điểm sau:

(a) có nồng độ huyết thanh không nhiều hơn 10 μ g/mL qua ngày 70 khi dùng cho khỉ đầu chó;

(b) phong bế sự tan huyết theo con đường cổ điển (CP) qua ngày 35 khi dùng cho khỉ đầu chó, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*;

(c) phong bế sự tan huyết theo con đường thay thế (AP) qua ngày 35 khi dùng cho khỉ đầu chó, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*;

(d) có nửa chu kỳ phân rã huyết thanh không nhiều hơn 10 ngày trong khỉ đầu chó;

(e) có nồng độ huyết thanh không nhiều hơn 10 μ g/mL qua ngày 40 khi dùng cho chuột được làm giống người C5;

(f) phong bế sự tan huyết CP qua ngày 30 khi dùng cho chuột được làm giống người C5, như đo được trong thử nghiệm tan huyết *ex vivo*; và

(g) có nửa chu kỳ phân rã huyết thanh nhiều hơn 10 ngày ở chuột được làm giống người C5.

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể còn có đặc điểm được chọn từ nhóm gồm có:

- (a) là kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người;
- (b) gắn kết với C5 người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn 0,9nM ở 25°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt;
- (c) gắn kết với C5 người với K_D nhỏ hơn 0,3nM ở 37°C, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt;
- (d) gắn kết với C5 khỉ với K_D nhỏ hơn 65nM, như đo được trong a thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt;
- (e) gắn kết với biến thể R885H (SEQ ID NO: 356) C5 người với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt;
- (f) gắn kết với biến thể R885C (SEQ ID NO: 357) C5 người với K_D nhỏ hơn 0,5nM, như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt;
- (g) phong bế sự tan huyết theo con đường cổ điển (CP) qua trung gian C5 người lớn hơn 95% và với IC_{50} nhỏ hơn 6nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP;
- (h) phong bế sự tan huyết theo con đường thay thế (AP) qua trung gian C5 người nhiều hơn 70% và với IC_{50} nhỏ hơn 165nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết AP;
- (i) ức chế sự tan huyết CP qua trung gian C5 khỉ xanh châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 185nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP;
- (j) ức chế sự tan huyết AP qua trung gian C5 khỉ xanh châu Phi với IC_{50} nhỏ hơn 235nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết AP;
- (k) ức chế sự tan huyết CP qua trung gian C5 khỉ đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 145nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết CP; và
- (l) ức chế sự tan huyết AP qua trung gian C5 khỉ đầu chó với IC_{50} nhỏ hơn 30nM, như đo được trong thử nghiệm tan huyết AP.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98.
5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106.
6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98 và LCVR bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106.
7. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 353.
8. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 354.
9. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 bao gồm một cặp trình tự axit amin chuỗi nặng/chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 353/354.
10. Dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với C5 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.
11. Phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự polynucleotit mà mã hoá HCVR của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
12. Phân tử polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự polynucleotit mà mã hoá LCVR của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.
13. Véc tơ bao gồm trình tự polynucleotit theo điểm 11 hoặc 12.
14. Tế bào biểu hiện véc tơ theo điểm 13.

FIG. 1

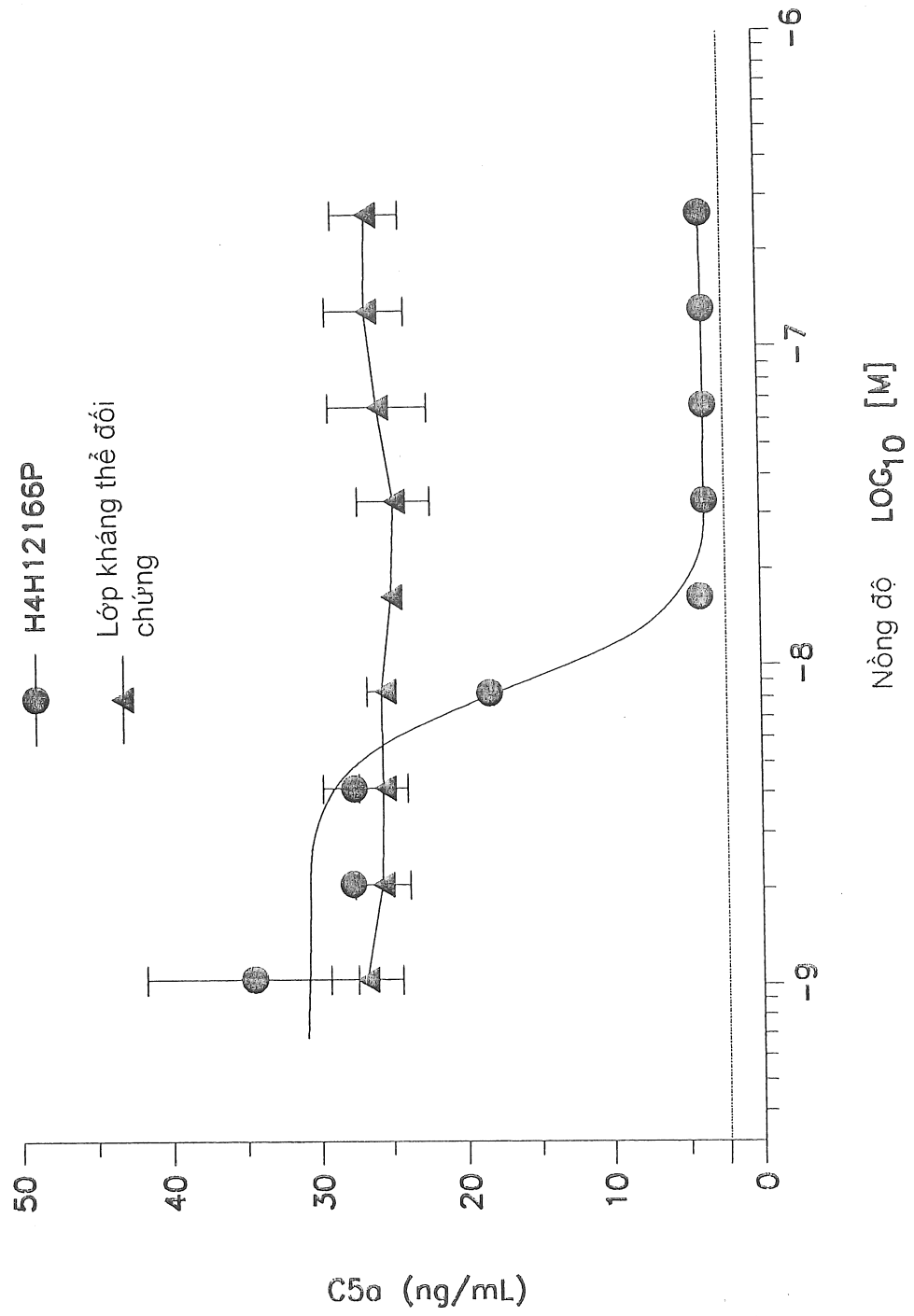


FIG. 2

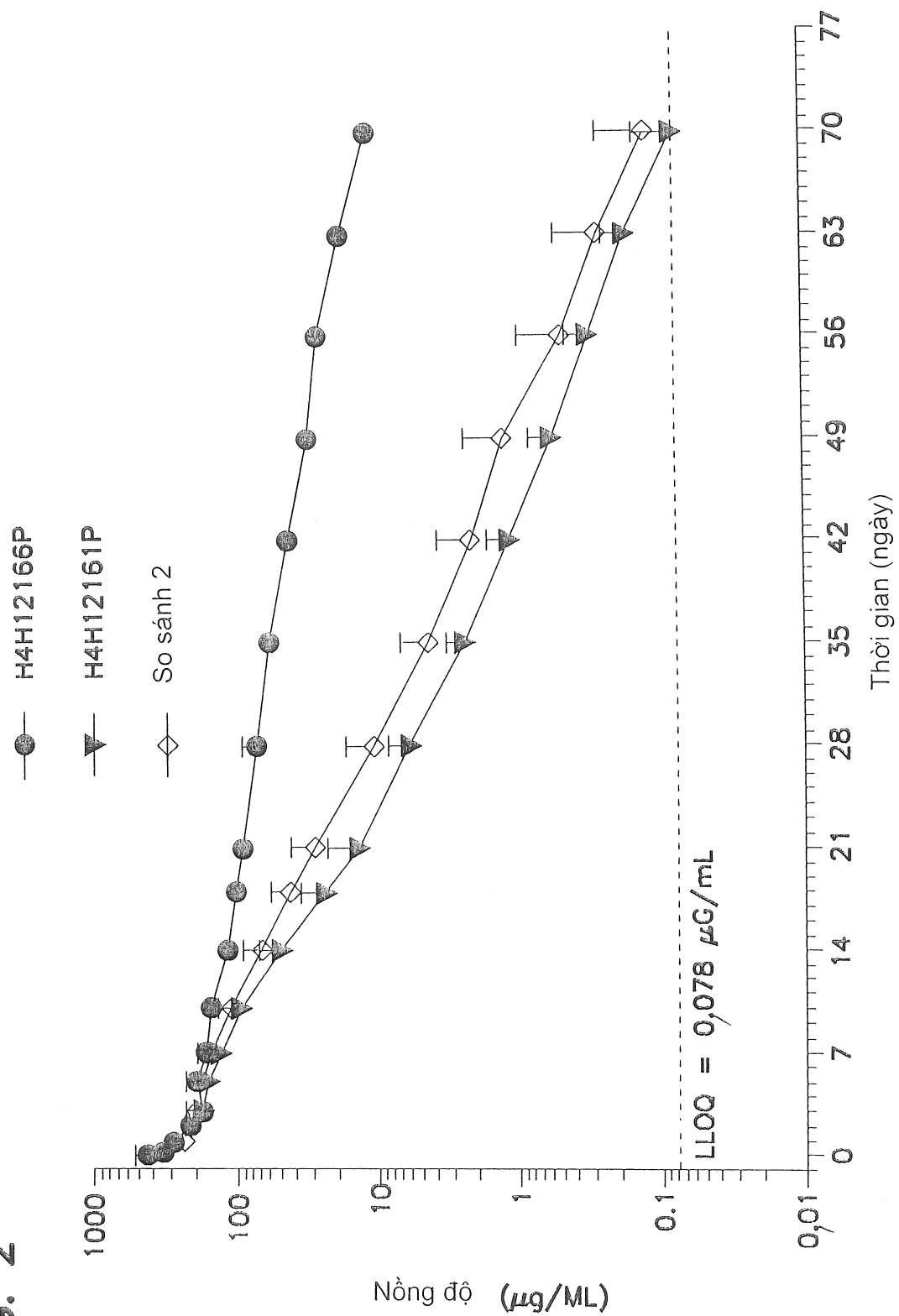


FIG. 3A

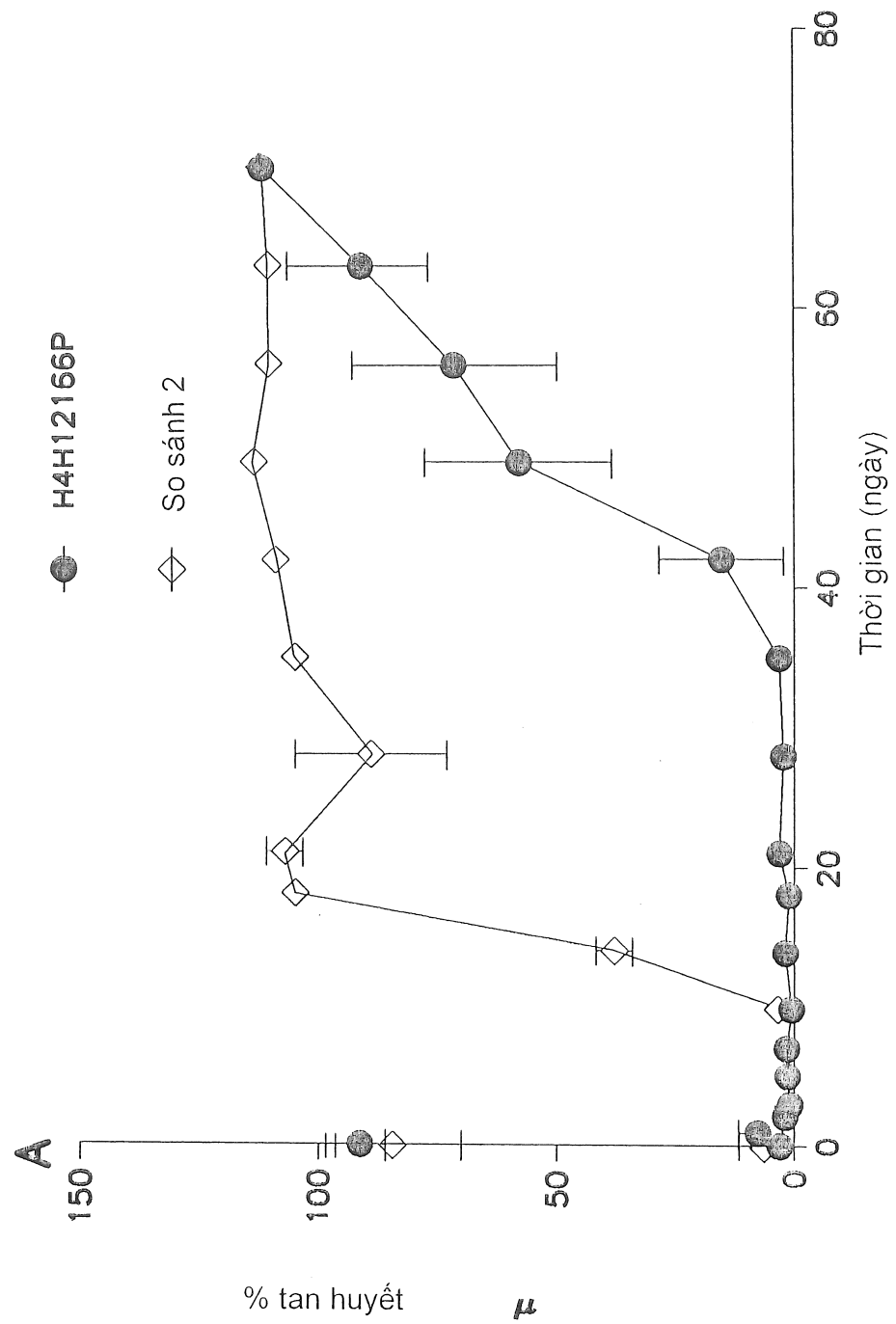


FIG. 3B

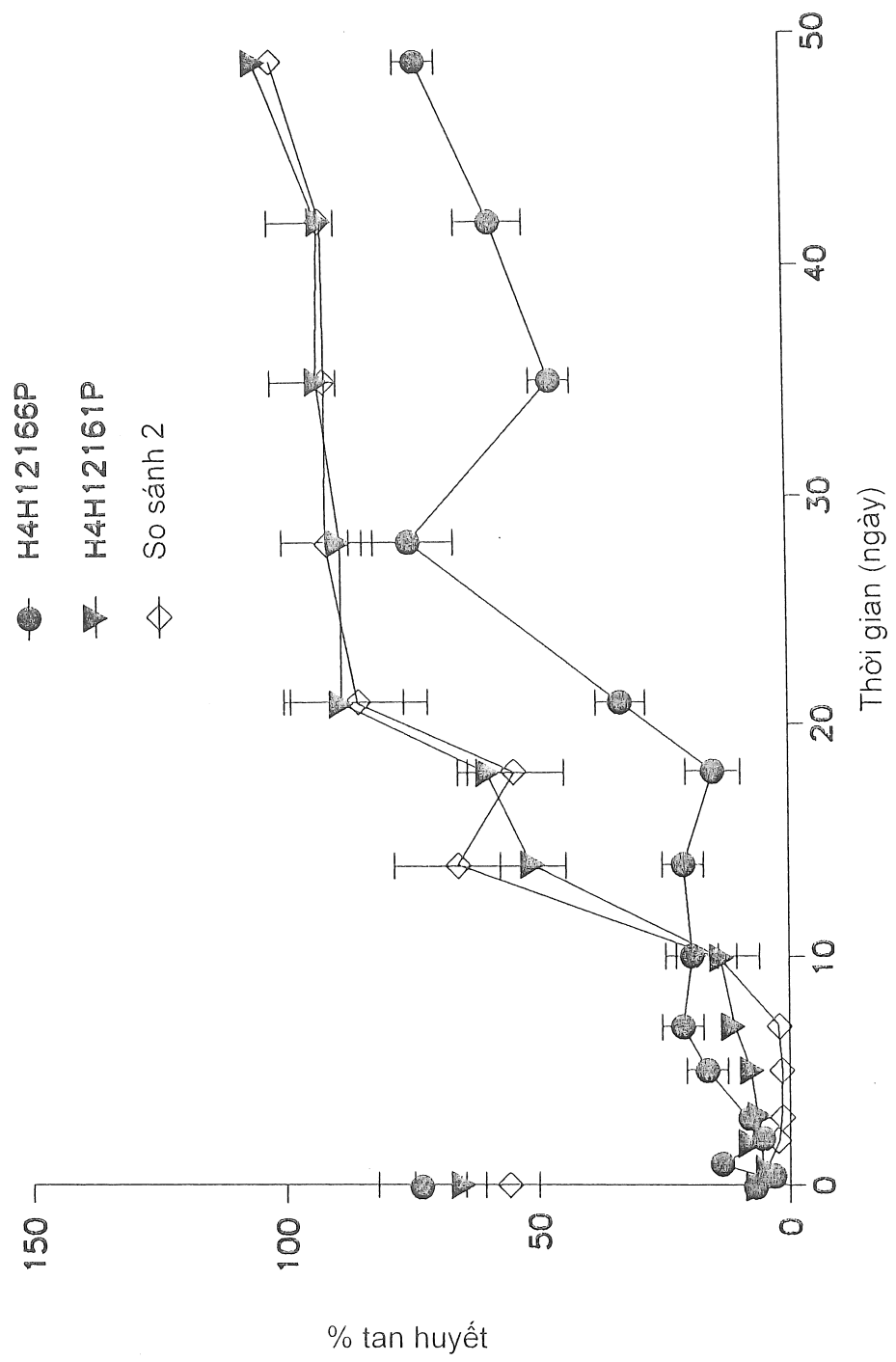


FIG. 4

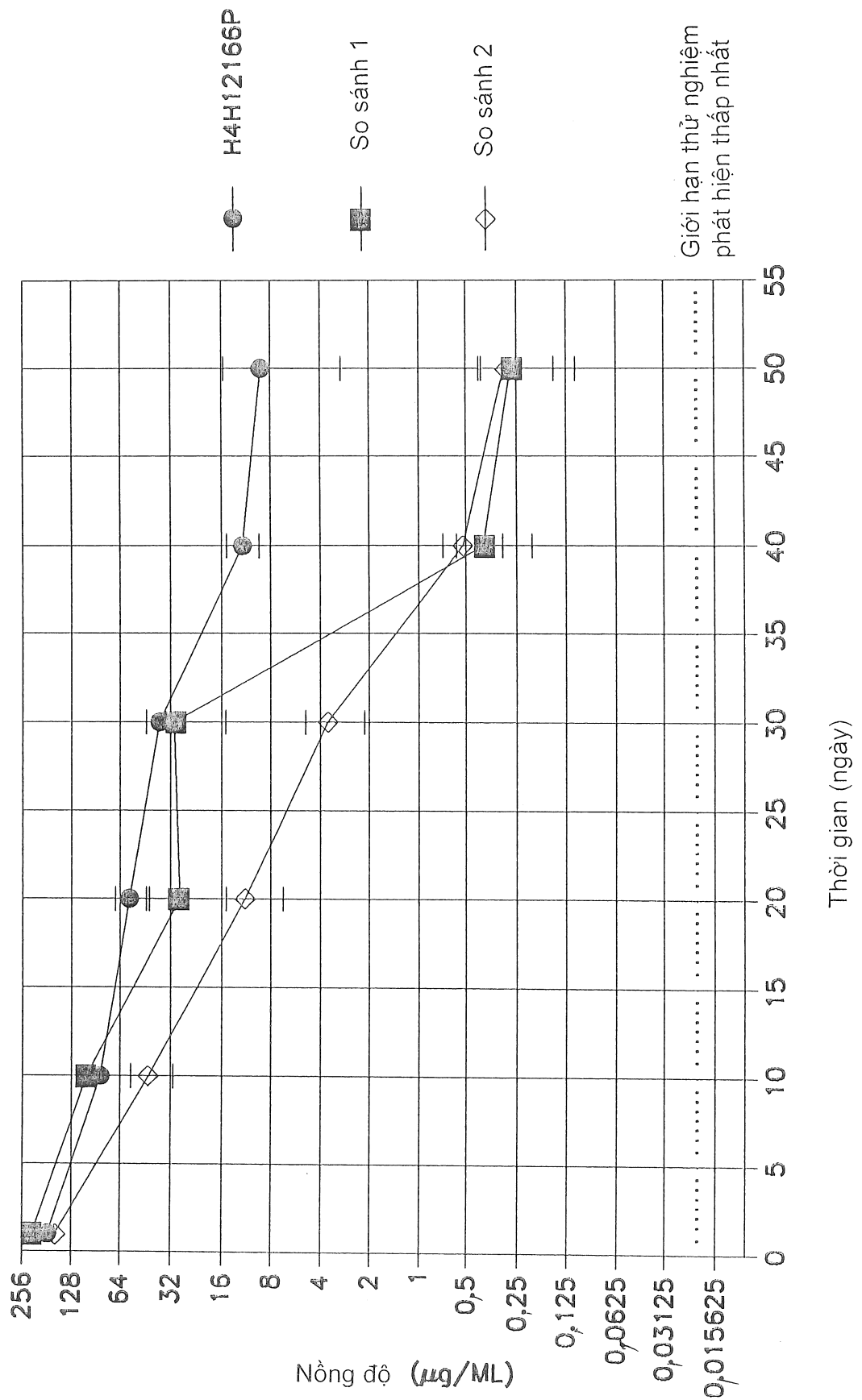


FIG. 5

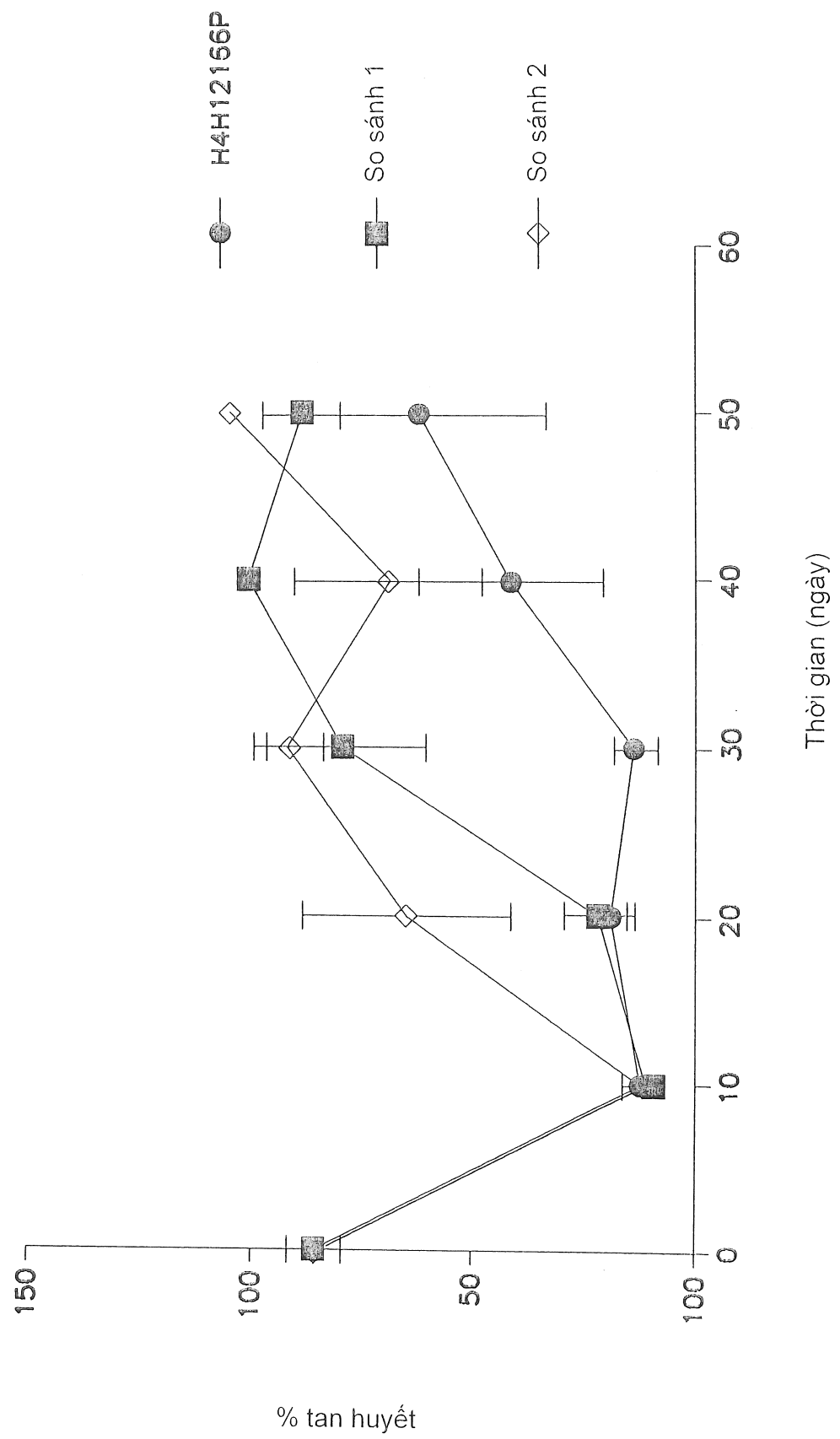


FIG. 6

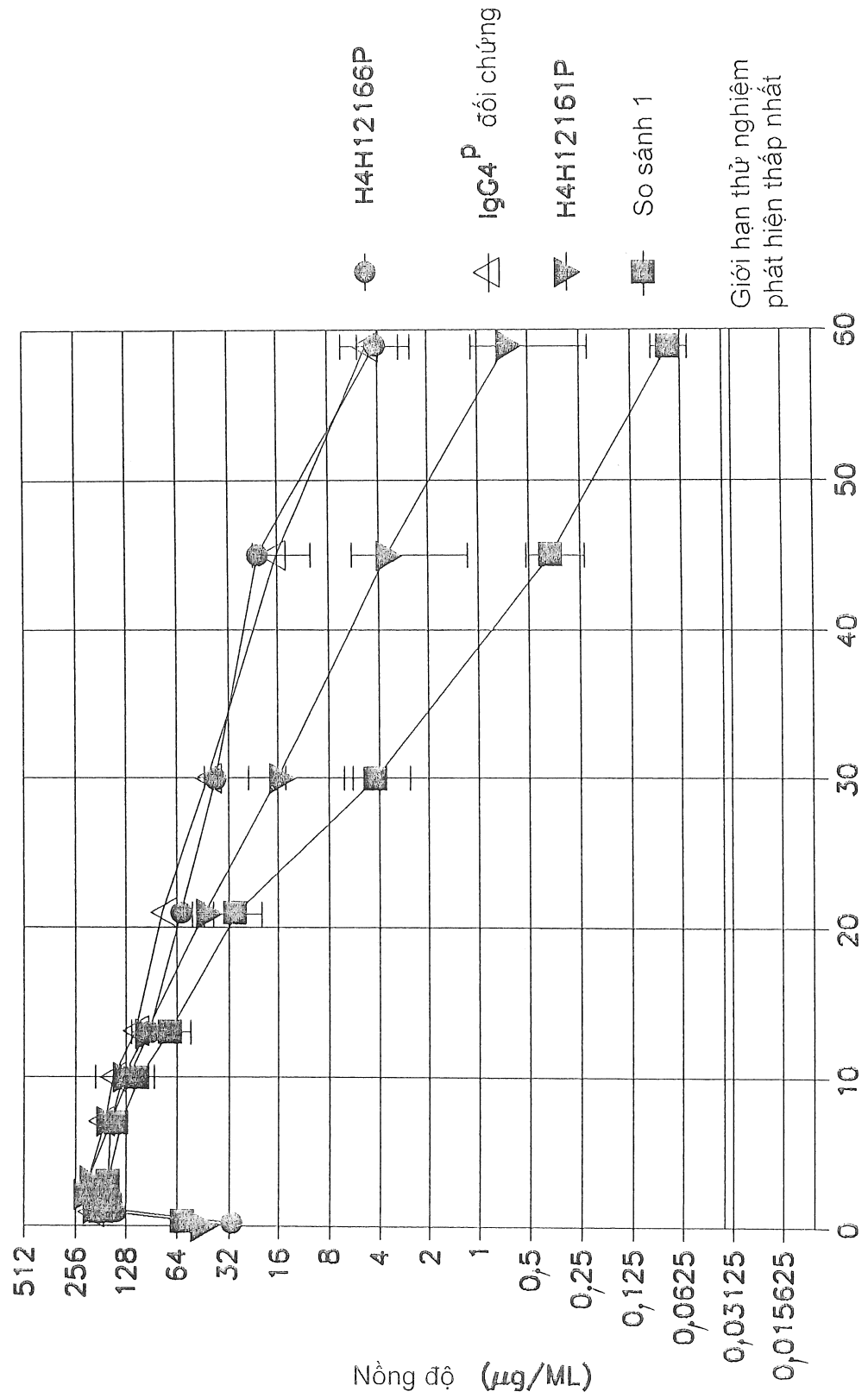


FIG. 7

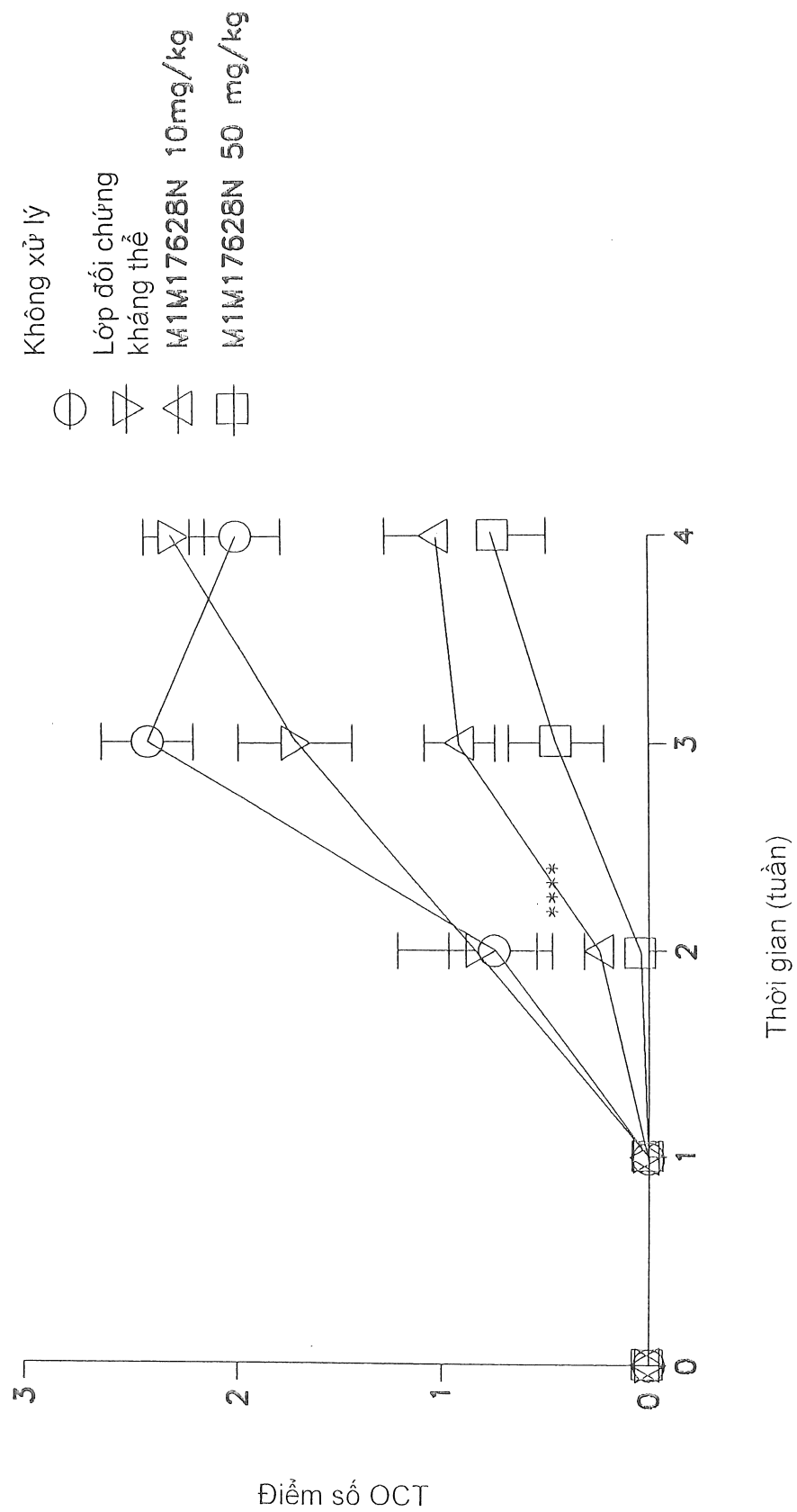


FIG. 8B

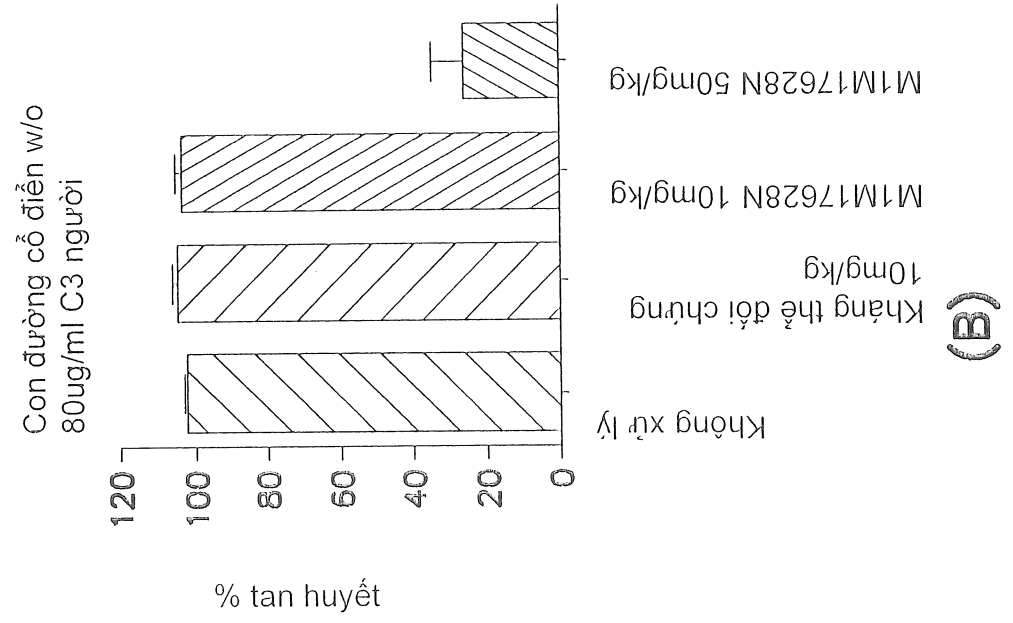


FIG. 8A

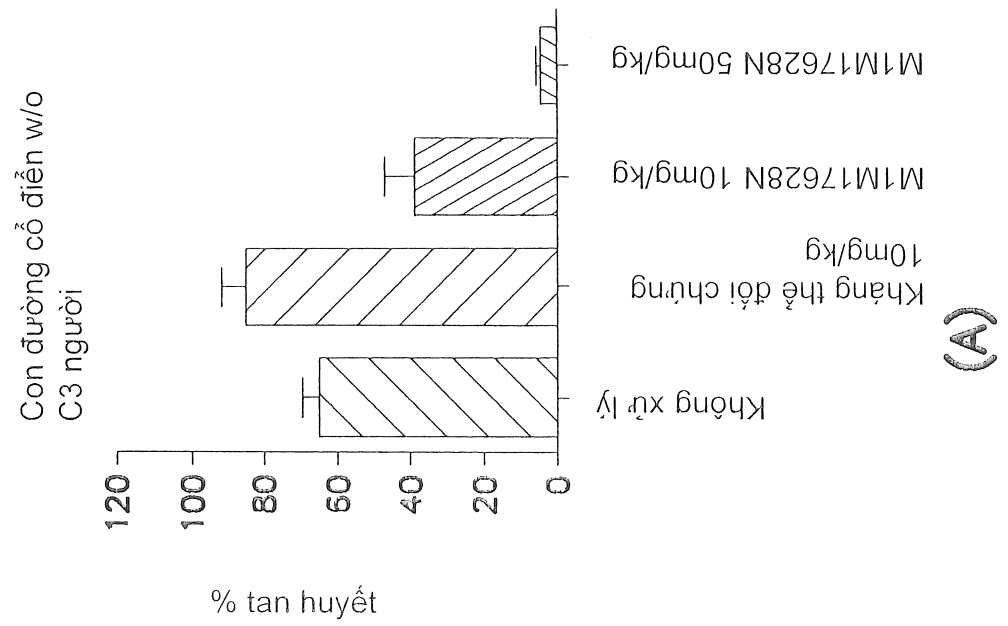


FIG. 9

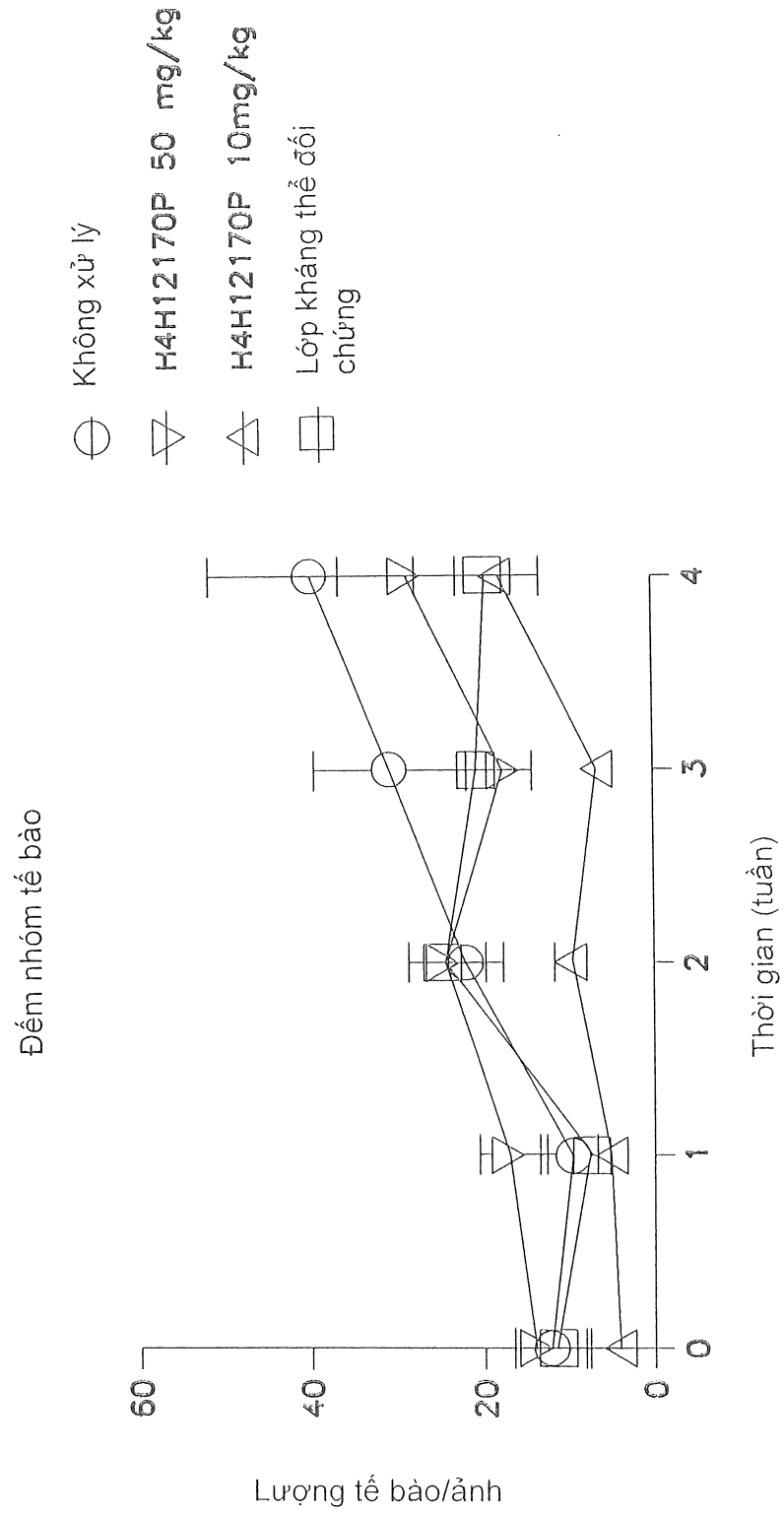


FIG. 10

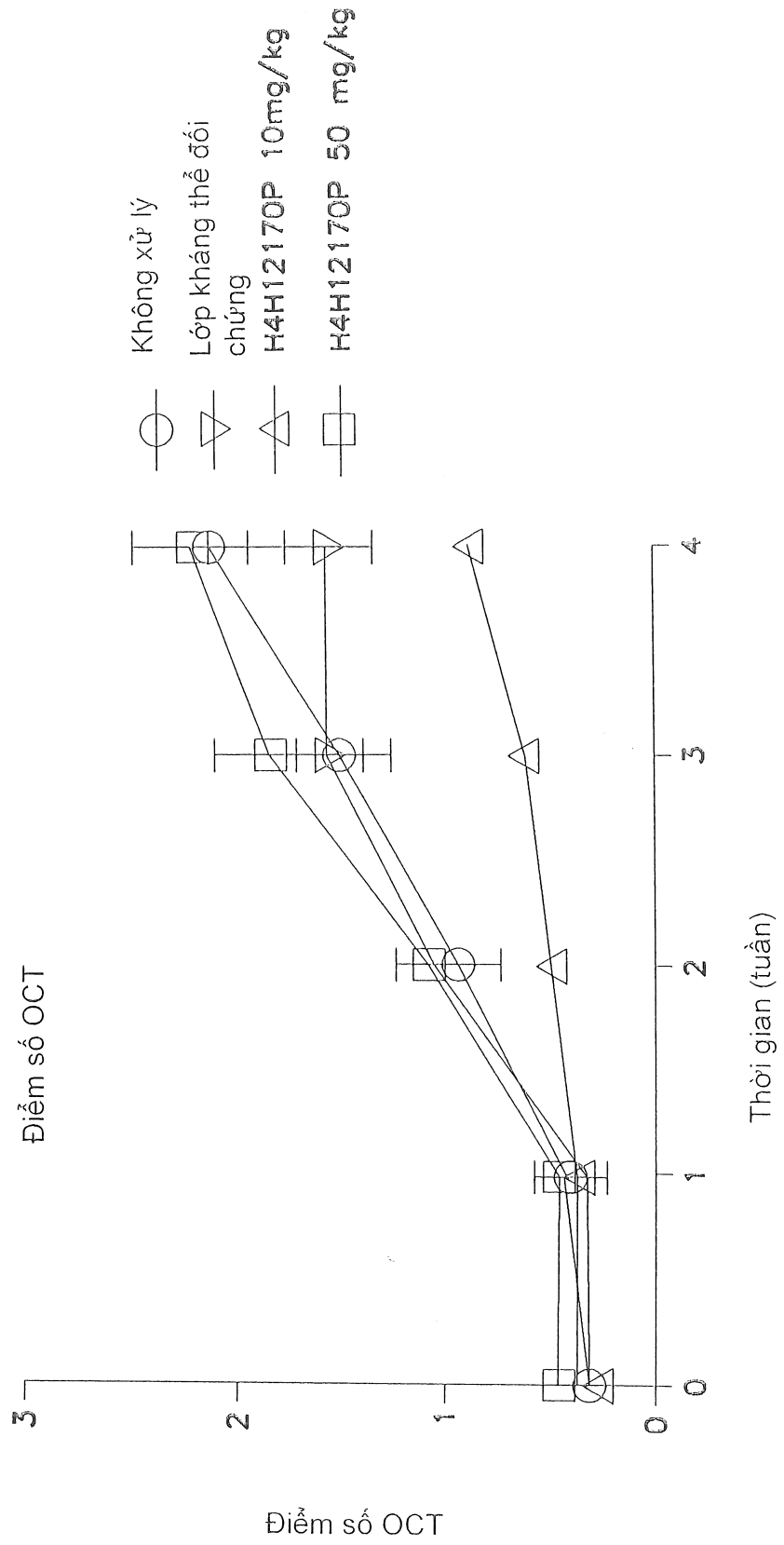


FIG. 11

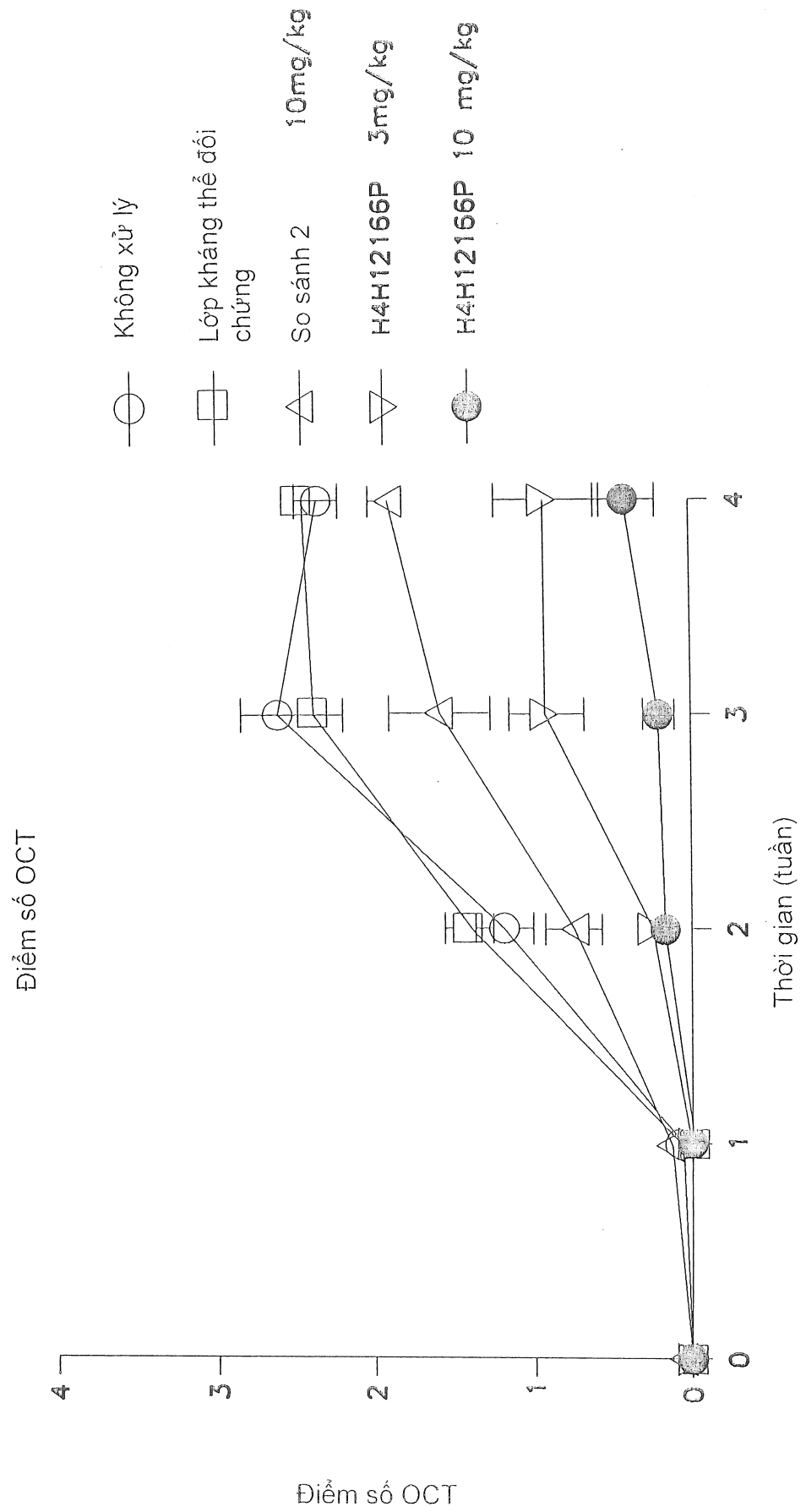


FIG. 12

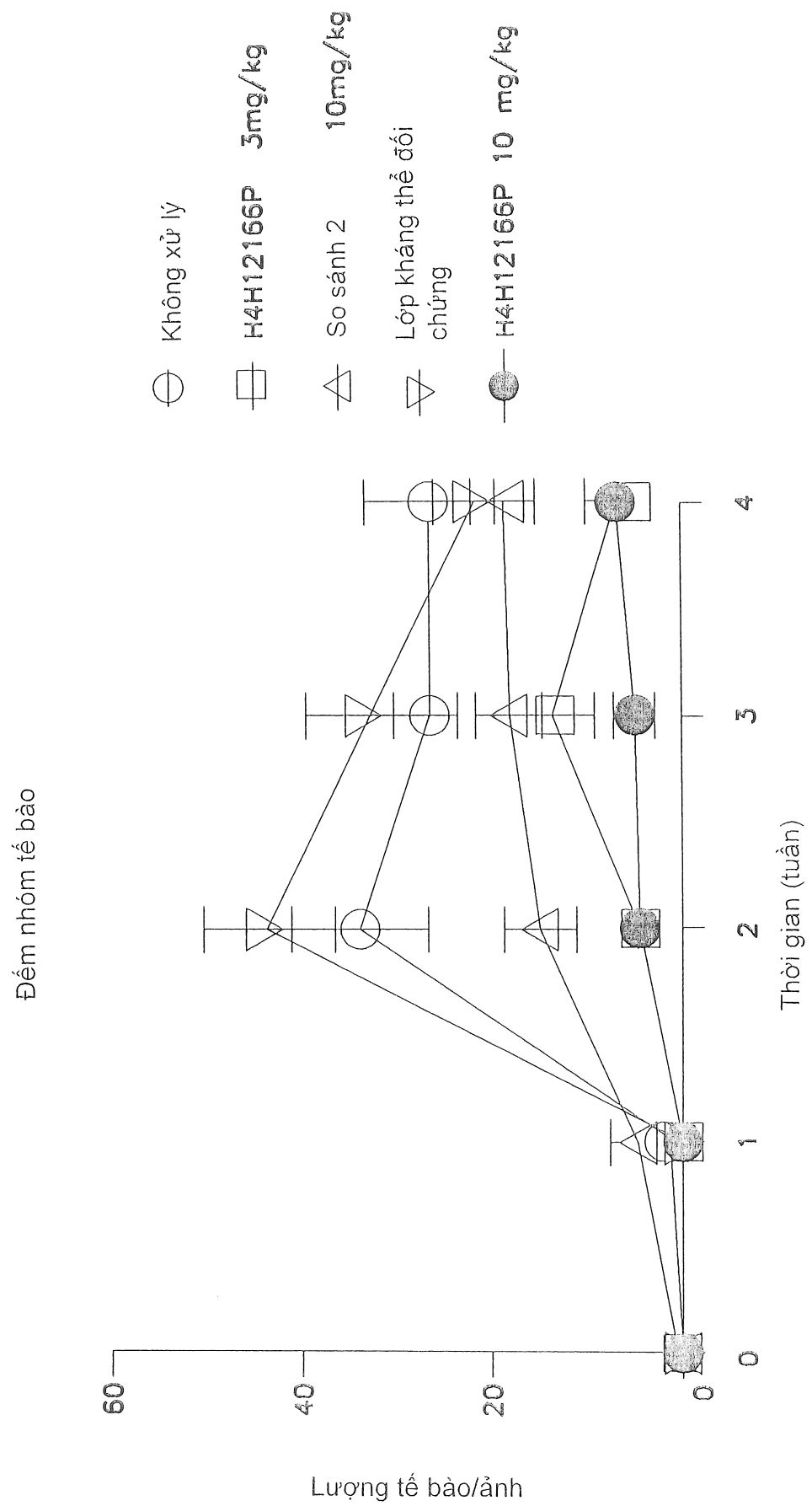


FIG. 13

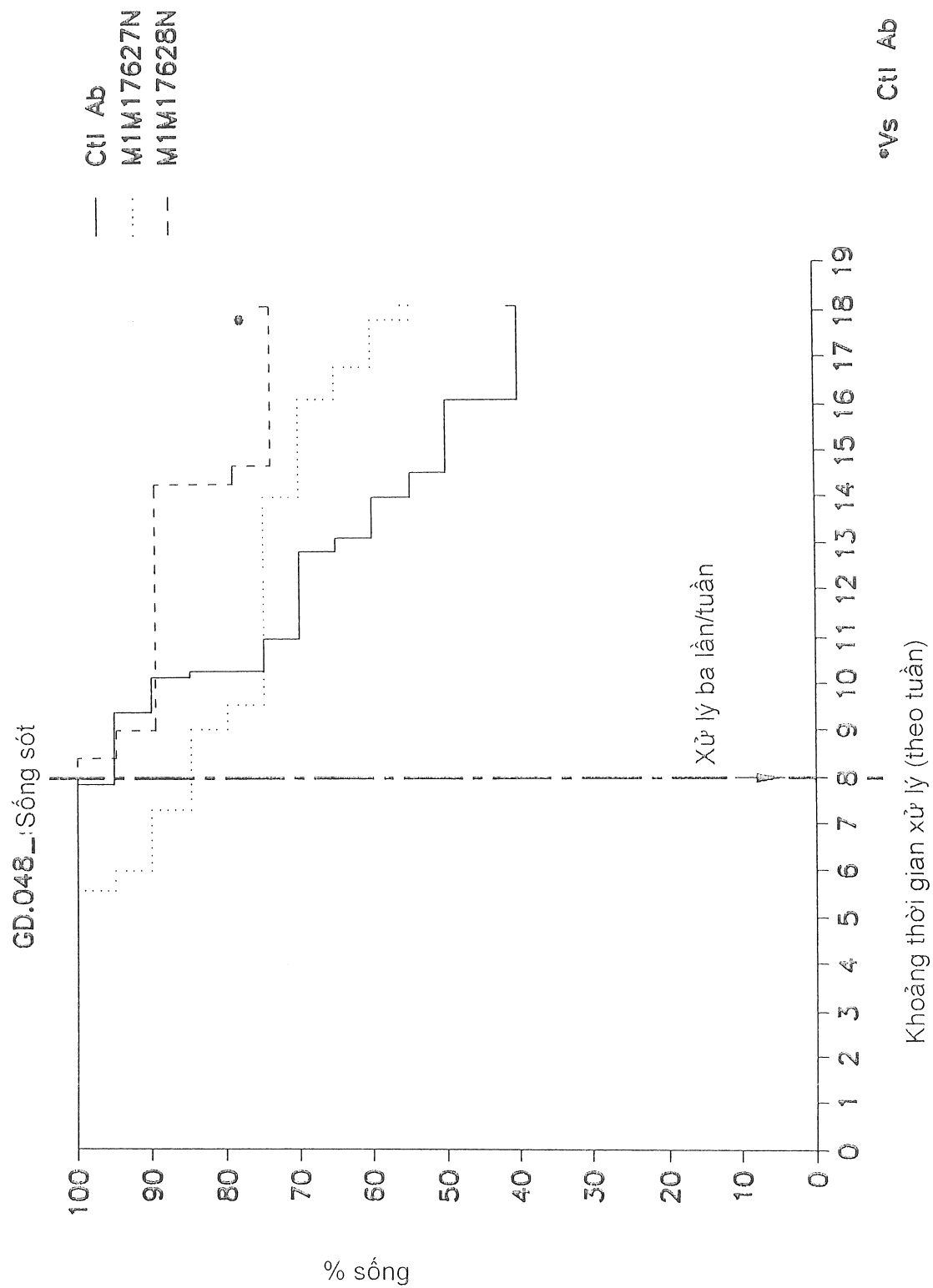


FIG. 14A

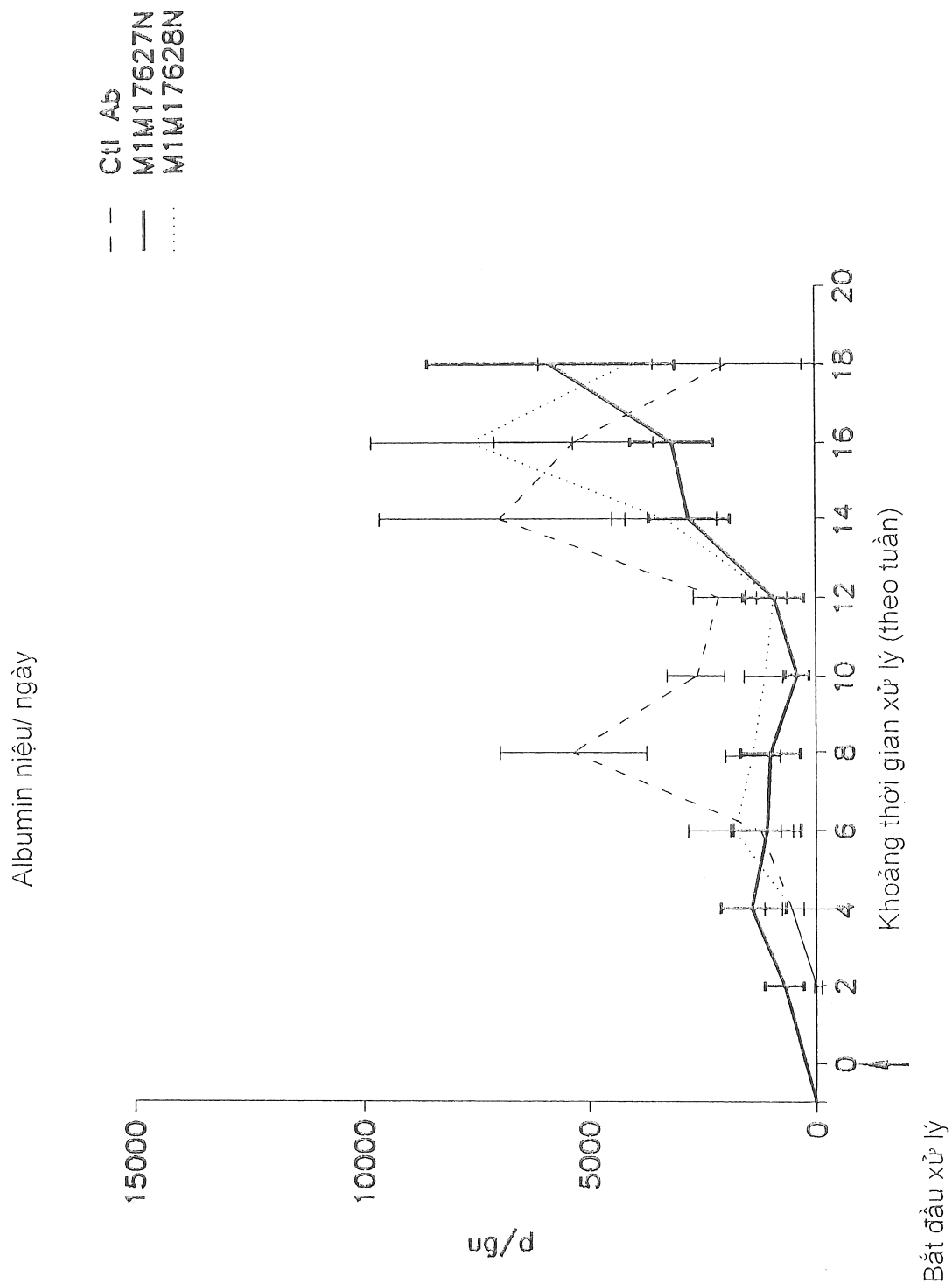
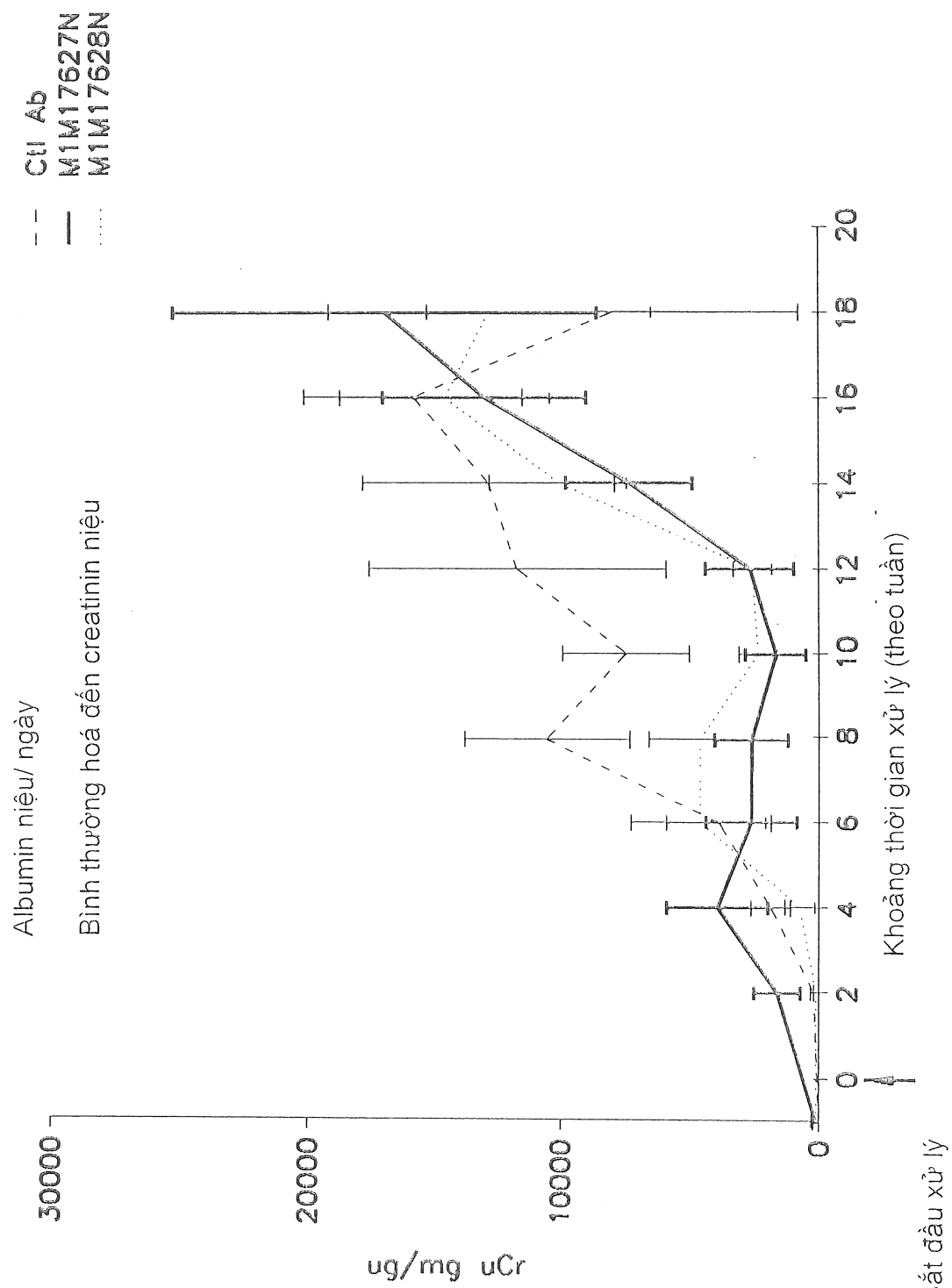


FIG. 14B



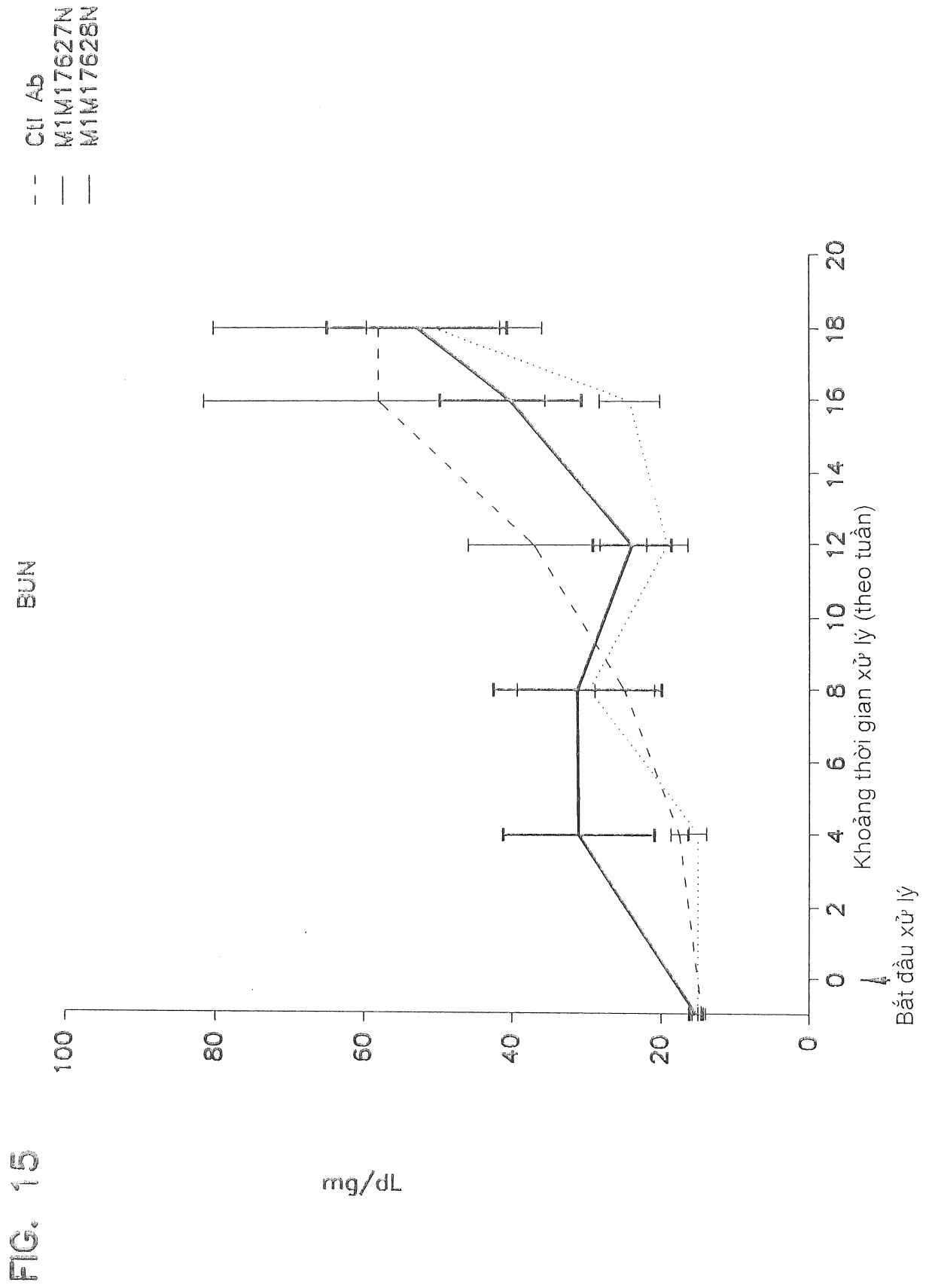
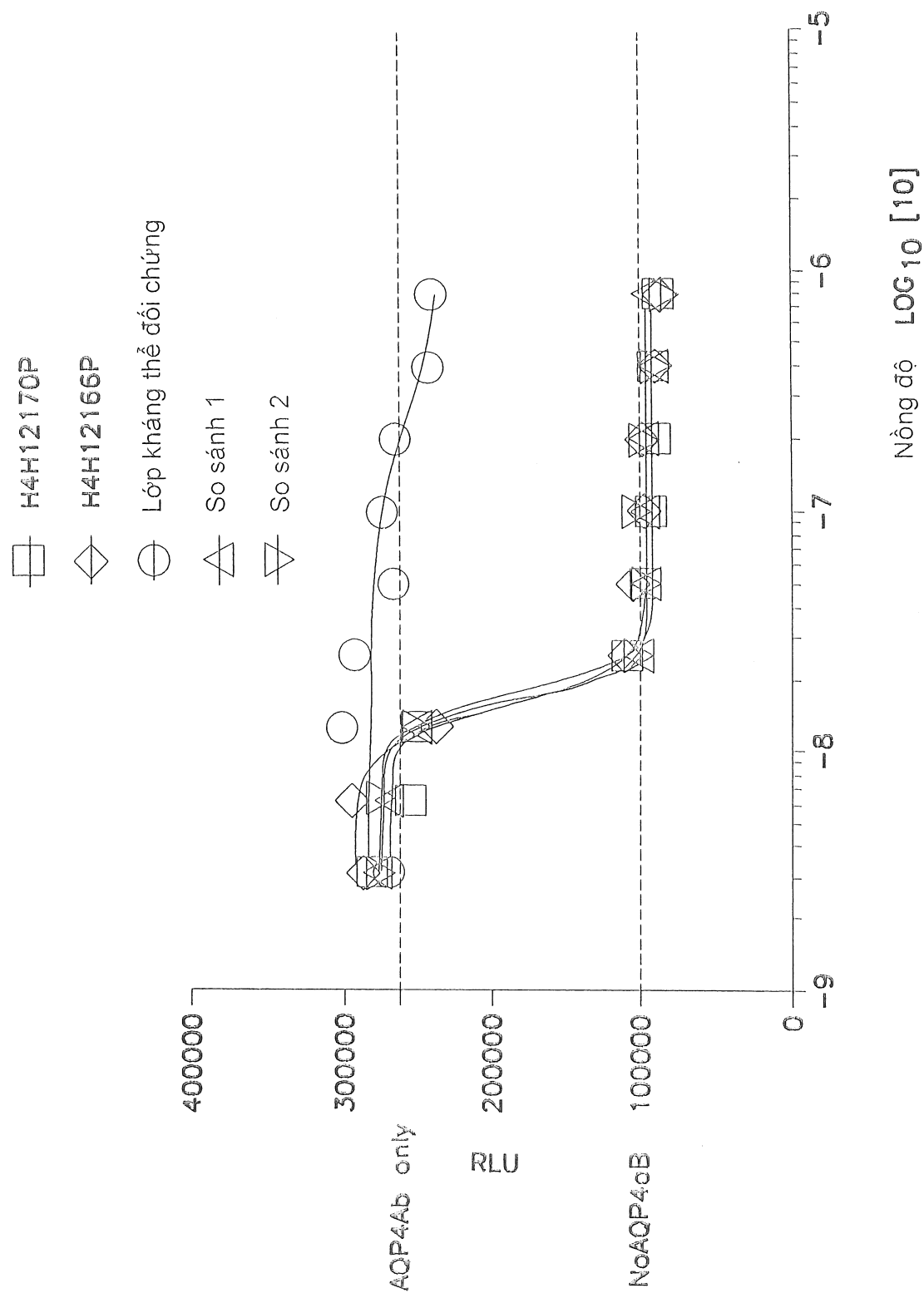


FIG. 16



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN YẾU TỐ BỔ SUNG 5 (C5) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 10168WO01

<150> 62/349,705

<151> 2016-06-14

<150> 62/405,561

<151> 2016-10-07

<150> 62/422,107

<151> 2016-11-15

<160> 366

<170> FastSEQ dùng cho Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

```
cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctggaaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt agttatggca ttcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaaataa tataaactat 180
tcagactccg tgaagggccg attcatcacc tccagagaca attccaggaa gacagtgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag aggcgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatgcc 300
cccatagcac cagtcacctga ctattggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctctca 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 Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20           25           30
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35           40           45
Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Asn Asn Ile Asn Tyr Ser Asp Ser Val
      50           55           60
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Lys Thr Val Tyr
65           70           75           80
```

[illegible]

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

<220>
<223> tổng hợp

24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 4
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

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

<220>
<223> tổng hợp

24

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

<220>
<223> tổng hợp

```
<400> 6
Ile Trp Asp Asp Gly Asn Asn Ile
  1             5
```

$$\begin{aligned} \langle 210 \rangle & 7 \\ \langle 211 \rangle & 36 \end{aligned}$$

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 7

gcgagagatg ccccatagc accagtcctt gactat

36

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 8

Ala	Arg	Asp	Ala	Pro	Ile	Ala	Pro	Val	Pro	Asp	Tyr
1				5						10	

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 9

gacatccaga	tgaccacgtc	tccttcacc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggccagtca	gagtattagt	agttggttg	cctggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctataag	gcgtctagtt	tagacactgg	ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagag	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gatgattttg	caacttatta	ctgccaacag	tataatactt	attcgtacac	ttttggcctg	300
gggaccaaac	tggagatcaa	a				321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 10

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Leu Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 11
 cagagtatta gtagttgg

18

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

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 13
 aaggcgtct

9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 14
 Lys Ala Ser
 1

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 15

caacagtata atacttattc gtacact

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 16

Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Ser Tyr Thr

1

5

<210> 17

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 17

caggtgcaac tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggaggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cttctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatat attagcagta gtggtaatac cataaaaatat 180
 gcagactcta tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa atcactgttt 240
 gtggaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaggtataaa 300
 agttcgtccg actactttga ccactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 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 Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ile Lys Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Val Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Lys Ser Ser Ser Asp Tyr Phe Asp His Trp Gly Gln 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 tcagtgacta ctac

24

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

<220>
<223> tổng hợp

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

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 21
attagcagta gtggtaatac cata

24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 22
Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ile
1 5

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 23

gcgaggtata aaagttcgtc cgactacttt gaccac

36

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 24

Ala Arg Tyr Lys Ser Ser Ser Asp Tyr Phe Asp His
1 5 10

<210> 25

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 25

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagg agttacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgc catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagatttag cagtttatta ctgtcagcag tctggcaact ggccgctcac ttccggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 26

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 27
 cagagtgtta ggagttac

18

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 28
 Gln Ser Val Arg Ser Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 29
 gatgcatcc

9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 30
 Asp Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 31

cagcagctctg gcaactggcc gctcact

27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 32

Gln Gln Ser Gly Asn Trp Pro Leu Thr

1

5

<210> 33

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 33

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cttgagactc 60
 tcctgtggag cgtctggatt caccttcagt acttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atctgggatg atggaaataa taaatattat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attcgaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagattca 300
 gaggtcgccc cagttgggga ctactggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctectca 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 Gly 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
 Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Glu Val Ala Pro Val Gly Asp Tyr Trp Gly Gln 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
 ggattcacct tcagtactta tggc

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

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

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 37
 atctgggatg atggaaataa taaa

24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 38
 Ile Trp Asp Asp Gly Asn Asn Lys
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 39
 gcgagagatt cagaggtcgc cccagttggg gactac

36

<210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 40
 Ala Arg Asp Ser Glu Val Ala Pro Val Gly Asp Tyr
 1 5 10

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 41
 gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcact 60
 atcatttgcc gggccagtc gagtattaac aggtgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaggccc ctaaaactcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatacagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg cagcttatta ctgccaacag tataatgatt attcgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tgagatcaa a 321

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 42
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ile Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Arg Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Tyr Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 43

cagagtatta acaggtgg

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 44

Gln Ser Ile Asn Arg Trp
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 45

aaggcgtct

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 46

Lys Ala Ser
1

<210> 47

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 47

caacagtata atgattattc gtacact

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 48
 Gln Gln Tyr Asn Asp Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 49
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagac ttgggtccagc ctggaggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gaccactata tggactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggactg gattggccgt attagaaaca aagctaacgc ttataacaca 180
 gaatacgccg cgtctgtgag aggcagattc accatctcaa gagatgattc acagaattta 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gatgacacgg ccgtatatta ttgtgttaga 300
 gtctggaact acgcctactt cgctatggac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgctc 360
 tcctca 366

<210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

<210> 51
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 51

ggattcacct tcagtgacca ctat

24

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Asp His Tyr

1

5

<210> 53

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 53

attagaaaca aagctaacgc ttataacaca

30

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 54

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Asn Thr

1

5

10

<210> 55

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 55

gttagagtct ggaactacgc ctacttcgct atggacgctc

39

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 56

Val	Arg	Val	Trp	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Phe	Ala	Met	Asp	Val
1				5						10		

<210> 57

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 57

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctatctgcat	ctgtgggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	ggtcaagtca	gaacattgga	atcttttta	actggtatca	acaaaaacca	120
ggggaagccc	ctaacctcct	gatctcgcgt	gcattccagtt	tacacagtgg	ggtcccttca	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcggcag	tctgcagcct	240
gaagattttg	cgacttacta	ctgtcaacag	acgtacaata	ccatattcac	tttcggccct	300
gggaccaaa	tgatatcaa	a				321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 58

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

<210> 59

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 59

cagaacattg gaatcttt

18

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 60

Gln Asn Ile Gly Ile Phe
1 5

<210> 61

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 61

gctgcatcc

9

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 62

Ala Ala Ser
1

<210> 63

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 63

caacagacgt acaataccat attcact

27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 64

Gln Gln Thr Tyr Asn Thr Ile Phe Thr
1 5

<210> 65

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 65

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagac ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcc a tgaactgggt ccgccaggggt 120
ccaggggaagg gactggagtg ggtctcagct attagtggtc gtgggtgatag tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gctcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgt gaaagagggg 300
gagcaactcg tctactggta ctccgatctc tggggccgtg gcaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 66

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 66

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

<210> 67

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 67

ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 69

attagtggtc gtggtgatag taca

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 70

Ile Ser Gly Arg Gly Asp Ser Thr

1

5

<210> 71

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 71

gtgaaagagg gggagcaact cgtctactgg tacttcgac tc

42

<210> 72

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 72

Val	Lys	Glu	Gly	Glu	Gln	Leu	Val	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu
1				5					10				

<210> 73

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 73

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcaattgcc	gggcaagtca	gaccattagc	aactttttac	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcateccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttt	caacttactt	ctgtcaacag	agttacacta	ccccgctcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	a				321

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 74

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	Thr	Ile	Ser	Asn	Phe
			20					25					30		
Leu	His	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	Ser	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Leu
			85					90						95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 75

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 75

cagaccatta gcaacttt

18

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 76

Gln Thr Ile Ser Asn Phe

1

5

<210> 77

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 77

gctgcatcc

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 78

Ala Ala Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 79

caacagagtt acactacccc gctcact

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 80

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 81

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 81

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtgaggt cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac agatatgcca tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggtctggagt ggtctcagct ataagtggta gtggtagcag cacatactac 180
 acagactccg tgaaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa ttcgggtggat 240
 ctgcaaatgc acagcctgag agtcgaagac acggccatat attattgtgc gagagggact 300
 acagtcacta cgggggtacgg tatggacgtc tgggggccaag ggaccacgggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 82

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 82

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

<210> 83

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 83

ggattcacct ttaacagata tgcc

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala

1

5

<210> 85

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 85

ataagtggta gtggtagcag caca

24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 86

Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr

1

5

<210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 87

gcgagagggga ctacagtcac tacgggggtac ggtatggacg tc

42

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 88

Ala Arg Gly Thr Thr Val Thr Thr Gly Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 89

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 89

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
ttcacttgcc aggcgagtca ggacattacc aattctttaa attggtatca acagaaacct 120
gggagagccc ctaagctcct gatctacgat gcatcgtatt tgaaggcagg ggtcccatca 180
agattcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatattg caacatatta ctgtcaacaa tatgatgatc tcccatacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 90

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 90

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

<210> 91

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 91

caggacatta ccaattct

18

<210> 92

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 92
 Gln Asp Ile Thr Asn Ser
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 93
 gatgcatcg

9

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 94
 Asp Ala Ser
 1

<210> 95
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 95
 caacaatatg atgatctccc atacact

27

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 96
 Gln Gln Tyr Asp Asp Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 97
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 97
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtga ctccgtcagt agttcctact ggacctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattggctat atctattaca gtgggagttc caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagc caccatttca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag agaagggaac 300
 gtggatacaa ctatgatatt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 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 Asp Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Gly Asn Val Asp Thr Thr Met Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 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
 ggtgactccg tcagtagttc ctac

<210> 100

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 100
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 101
 atctattaca gtgggagttc c

21

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 102
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 103
 gcgagagaag ggaacgtgga tacaactatg atatttgact ac

42

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 104
 Ala Arg Glu Gly Asn Val Asp Thr Thr Met Ile Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 105
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 105
 gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctgggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatcg 180
 aggttcgccc gccgtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gattttcaatt acccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 106
 Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ala Gly
 50 55 60
 Arg 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 Leu Gln Asp Phe Asn Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 107
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 107
 cagggcatta gaaatgat

18

<210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 108
Gln Gly Ile Arg Asn Asp
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 109
gctgcatcc

9

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 110
Ala Ala Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 111
ctacaagatt tcaattaccc gtggacg

27

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 112
Leu Gln Asp Phe Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 113

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 113
 gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctgggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatcg 180
 aggttcgcgc gccgtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcatcaa gatttcaatt acccgtggac gttcggtccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 114
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

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

<210> 115
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 115
 cagggcatta gaaatgat

18

<210> 116
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 116
Gln Gly Ile Arg Asn Asp
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 117
gctgcatcc

9

<210> 118
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 118
Ala Ala Ser
1

<210> 119
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 119
catcaagatt tcaattaccc gtggacg

27

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 120
His Gln Asp Phe Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 121
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 121

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtga ctccgtcagt agttcctact ggacctggat cgggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggctat atctattaca gtgggagttc caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagc caccatttca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag agaacataac 300
gtggatacaa ctatgatatt tgactactgg ggccaggga cctgggtcac cgtctcctca 360

```

<210> 122

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 122

```

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

```

<210> 123

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 123

```

ggtgactccg tcagtagttc ctac

```

24

<210> 124

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 124
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 125
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 125
 atctattaca gtgggagttc c

21

<210> 126
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 126
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser
 1 5

<210> 127
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 127
 gcgagagaac ataacgtgga tacaactatg atatttgact ac

42

<210> 128
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 128
 Ala Arg Glu His Asn Val Asp Thr Thr Met Ile Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 129
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 129

```

gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctgggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatcg 180
aggttcgccg gccgtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gatttcaatt acccgtggca cttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa a                                     321

```

<210> 130

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 130

```

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

```

<210> 131

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 131

cagggcatta gaaatgat

18

<210> 132

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 132

Gln Gly Ile Arg Asn Asp

1

5

<210> 133
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 133
 gctgcatcc

9

<210> 134
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 134
 Ala Ala Ser
 1

<210> 135
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 135
 ctacaagatt tcaattaccc gtggcac

27

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 136
 Leu Gln Asp Phe Asn Tyr Pro Trp His
 1 5

<210> 137
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 137

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtga ctccgtcagt agttcctact ggacctggat cgggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gatigggctat atctattaca gtgggagttc caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagc caccatttca gtagacacgt ccaagaacca gttctcctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag agaaggggaa 300
 gtggatacaa ctatgataca tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 138

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 138

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

<210> 139

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 139

ggtgactccg tcagtagttc ctac

24

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 140

Gly Asp Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1

5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 141
 atctattaca gtgggagttc c

21

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 142
 ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser
 1 5

<210> 143
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 143
 gcgagagaag ggaacgtgga tacaactatg atacatgact ac

42

<210> 144
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 144
 Ala Arg Glu Gly Asn Val Asp Thr Thr Met Ile His Asp Tyr
 1 5 10

<210> 145
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 145
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtga ctccgtcagt agttcctact ggacctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattggctat atctattaca gtgggagttc caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagc caccatttca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgcgag agaagggaac 300
 gtggatcaca ctatgatatt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 146
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 146
 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 Asp Ser Val Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Gly Asn Val Asp His Thr Met Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 147
 ggtgactccg tcagtagttc ctac

24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 148
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 149
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 149
 atctattaca gtgggagttc c 21

<210> 150
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 150
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser
 1 5

<210> 151
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 151
 gcgagagaag ggaacgtgga tcacactatg atatttgact ac 42

<210> 152
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 152
 Ala Arg Glu Gly Asn Val Asp His Thr Met Ile Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 153
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 153
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggaggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactcctaca tgccttggat ccgtcaggct 120
 ccagggaagg gactagagtg gatttcatac attggtagta gtggtaatac cttttactac 180
 gcagactctg tgaagggccg gttcaccatt tccagagaca acgccaacaa tttactgtat 240
 ctgcaaataa ccagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaagaa 300
 ggcgattttt ggagtgccgt tgactcctgg gccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 154
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 154
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Asn Thr Phe Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Leu Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Glu Gly Asp Phe Trp Ser Ala Val Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 155
 ggattcacct tcagtgactc ctac 24

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 156
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Tyr

1	5	
<210> 157		
<211> 24		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> tổng hợp		
<400> 157		
atttgtagta gtggtataac cttt		24
<210> 158		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> tổng hợp		
<400> 158		
Ile Gly Ser Ser Gly Asn Thr Phe		
1 5		
<210> 159		
<211> 39		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> tổng hợp		
<400> 159		
gcgagagaag aaggcgattt ttggagtgcc gttgactcc		39
<210> 160		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> tổng hợp		
<400> 160		
Ala Arg Glu Glu Gly Asp Phe Trp Ser Ala Val Asp Ser		
1 5 10		
<210> 161		
<211> 321		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> tổng hợp		

<400> 161

```

gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggccagtca gggcattagc agttatttag cctgggtatca gcaaaaacca 120
ggtaaagccc ctaaactcct gatccatact gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcaa cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag cttaatagtt acccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a                                     321

```

<210> 162

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 162

```

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

```

<210> 163

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 163

cagggcatta gcagttat

18

<210> 164

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 164

```

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 1           5

```

<210> 165
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 165
 actgcatcc

9

<210> 166
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 166
 Thr Ala Ser
 1

<210> 167
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 167
 caacagctta atagttaccc attcact

27

<210> 168
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 168
 Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 169
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 169
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggggggtc cctgagactc 60

```

tctgtgcag cctctggatt caccttcggt ggccatgccatg cgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg gctggcagtt atatcatctg atggcagtaa taaacagtat 180
gcagattctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca atcccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agttggggac acggctatctt attactgtgc gaaagagggtg 300
gcacctcggtt attattatta cggctctggac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc 360
tctca

```

<210> 170

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 170

```

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

```

<210> 171

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 171

ggattcacct tcggtggcca tgcc

24

<210> 172

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 172

```

Gly Phe Thr Phe Gly Gly His Ala
1          5

```

<210> 173
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 173
 atatcatctg atggcagtaa taaa

24

<210> 174
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 174
 Ile Ser Ser Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 175
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 175
 gcgaaagagg tggcacctcg ttattattat tacggctctgg acgtc

45

<210> 176
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 176
 Ala Lys Glu Val Ala Pro Arg Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 177
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 177
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60

```

atcacttgcc gggcgagtca ggacattagc aatttttttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaagggttc ctaaactcct gatctatact gcatccactt tacaatcagg ggtcccatct 180
cgggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccgtcagcag cctacagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaaag tatgccggcg cctcacttt cggccctggg 300
accaaagtgg atatcaaa 318

```

<210> 178
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 178

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

<210> 179
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 179
 caggacatta gcaatttt

18

<210> 180
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 180
 Gln Asp Ile Ser Asn Phe
 1 5

<210> 181
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 181

actgcatcc

9

<210> 182

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 182

Thr Ala Ser

1

<210> 183

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 183

caaaagtatg ccggcgccct cact

24

<210> 184

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 184

Gln Lys Tyr Ala Gly Ala Leu Thr

1

5

<210> 185

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 185

gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggcacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacgtttaga agctatgcc a tgagctgggt cagccagget 120
ccagggaagg ggccggagtg ggtctcaggt atagggtggt atgggtgttac cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240

ctgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgt gcaggggggt 300
ttaggtgggt attttacagg ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 186
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 186
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Gly Gly Asn Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Gln Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Phe Thr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 187
ggattcacgt ttagaagcta tgcc

24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 188
Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
1 5

<210> 189
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 189
ataggtggta atggtgttac caca

24

<210> 190
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 190
Ile Gly Gly Asn Gly Val Thr Thr
1 5

<210> 191
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 191
gtgcaggggg gtttaggtgg ttattttaca ggctac

36

<210> 192
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 192
Val Gln Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Phe Thr Gly Tyr
1 5 10

<210> 193
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 193
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagtattagt acctatttaa attggtatca gcagaatcca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctttgat gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagagg tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a

321

<210> 194
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 194
 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 Thr Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asp 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 Arg Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 195
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 195
 cagagtatta gtacctat

18

<210> 196
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 196
 Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 197
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 197
gatgcatcc

9

<210> 198
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 198
Asp Ala Ser
1

<210> 199
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 199
caacagagtt acagtgtccc gctcact

27

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 200
Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 201
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 201
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggct cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt ggttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatggcttg atggaagtaa tgactactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttatat 240
ctgcaaatga acagactgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggc 300
ccggttgctg ctataccga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 202

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 202
 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 Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Leu Ile Trp Leu Asp Gly Ser Asn Asp 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 Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Pro Val Ala Ala Ile Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 203
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 203
 ggattcacct tcagtggtta tggc

24

<210> 204
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 204
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
 1 5

<210> 205
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 205
atatggcttg atggaagtaa tgac

24

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

<220>
<223> tổng hợp

<400> 206
Ile Trp Leu Asp Gly Ser Asn Asp
1 5

<210> 207
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 207
gcgagagatg gcccggttgc tgctataccc gactac

36

<210> 208
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 208
Ala Arg Asp Gly Pro Val Ala Ala Ile Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 209
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 209
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtattagt aggtgggttg cctggtatca gctgaaacca 120
gggaaagccc ctaagctect gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 240
gatgatTTTT caacttatta ctgccaaacag tataatactt attcgtacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 210
<211> 107

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 210
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu 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
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 211
 cagagtatta gtaggtgg

18

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 212
 Gln Ser Ile Ser Arg Trp
 1 5

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 213
 aaggcgtct

9

<210> 214
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 214
 Lys Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 215
 caacagtata atacttattc gtacact

27

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 216
 Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 217
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 217
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggt gtggtacggc ctggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gaatatggca tgacttgggt ccgccaagtt 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctctggt attacttggga atgggtggttt cacagattat 180
 acagactctg tgaagggccg attcaccagc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaataga acagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagagatgga 300
 tatagcagct cgtggggggc ttatgatata tggggccaag ggacaatggc caccgtctct 360
 tca 363

<210> 218
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 218

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

<210> 219

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 219

ggattcacct ttgatgaata tggc

24

<210> 220

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 220

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Glu	Tyr	Gly
1				5			

<210> 221

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 221

attacttgga atggtggttt caca

24

<210> 222
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 222
 Ile Thr Trp Asn Gly Gly Phe Thr
 1 5

<210> 223
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 223
 gcgagagatg gatatagcag ctcgtagggg gcttatgata ta 42

<210> 224
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 224
 Ala Arg Asp Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Gly Ala Tyr Asp Ile
 1 5 10

<210> 225
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 225
 gacatccaga tgacccagtc tccatcatcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcatttagc acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtccatta 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggactgat ttcaactctca ccatacagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caagttattt ctgtcaacag agttacagta ccccgtaac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 226
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 226

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

<210> 227

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 227

cagagcatta gcacctat

18

<210> 228

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 228

Gln	Ser	Ile	Ser	Thr	Tyr
1				5	

<210> 229

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 229

gctgcatcc

9

<210> 230

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 230

Ala Ala Ser

1

<210> 231

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 231

caacagagtt acagtacccc gtacact

27

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 232

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 233

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 233

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tctctgtgcag cctctggatt cacctttaat gattatgcc a tgcactgggt ccgtcaagct 120
ccaggggaagg gtctggagtg ggtctctctt attagtggag atgggtggtaa cacatactat 180
gcagactctg tgaagggccg actcaccatc tccagagaca acagcaaaaa ctccctgtat 240
ctgcaaataga acagtctgag aacagaggac accgccttat attactgtgc aaaagataag 300
ggctggaact tcggttactt cgatctcttg ggccgtggca ccctgggtcac tgtctcctca 360

<210> 234

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 234
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Leu Ile Ser Gly Asp Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Lys Gly Trp Asn Phe Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 235
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 235
 ggattcacct ttaatgatta tgcc

24

<210> 236
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 236
 Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 237
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 237
 attagtggag atggtggtaa caca

24

<210> 238
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 238

Ile Ser Gly Asp Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 239

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 239

gcaaaagata agggctggaa cttcgggttac ttcgatctc

39

<210> 240

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 240

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

<210> 241

<211> 327

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 241

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctacat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaacattgac acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgat gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
cggttcagtg gcagcggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccag tctgcaacct 240
gaagattttg ccacttacta ctgtcaacag aatgacaata ttcttcaccc tctcactttc 300
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 242

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 242

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

<210> 243

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 243

cagaacattg acacctat

18

<210> 244

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 244

Gln Asn Ile Asp Thr Tyr
 1 5

<210> 245

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 245

gatgcatcc

9

<210> 246

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 246

Asp Ala Ser

1

<210> 247

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 247

caacagaatg acaatattct tcaccctctc act

33

<210> 248

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 248

Gln Gln Asn Asp Asn Ile Leu His Pro Leu Thr

1

5

10

<210> 249

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 249

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccaac cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ccactctaata agatatttga tggactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga ggaaaactat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctacttttat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcga 300
 agcacctcgt gggtcctta ctggttcttc gatctctggg gccgtggcac cctgggtcact 360
 gtctcctca 369

<210> 250

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 250

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

```

<210> 251
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 251
 ggattccact ctaatagata ttgg

24

<210> 252
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 252
 Gly Phe His Ser Asn Arg Tyr Trp
 1 5

<210> 253
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 253
 ataaagcaag atggaagtga ggaa

24

<210> 254
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 254

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Glu
1 5

<210> 255

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 255

gcgagagatc gaagcacctc gtgggtccct tactggttct tcgatctc 48

<210> 256

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 256

Ala Arg Asp Arg Ser Thr Ser Trp Val Pro Tyr Trp Phe Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 257

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 257

gacatccaga tgacccagtc 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> 258

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 258

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> 259
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 259
cagagcatta gcagctat

```

18

```

<210> 260
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 260
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
  1                5

```

```

<210> 261
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 261
gctgcatcc

```

9

```

<210> 262
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> tổng hợp

```

```

<400> 262

```

Ala Ala Ser
1

<210> 263
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 263
caacagagtt acagtacccc tccgatacacc 30

<210> 264
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 264
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 265
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 265
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtacagc gggggggagtc cctgagactc 60
tcctgttcag cctctgactt catcttttaaa gattatgccca tgtactgggt ccgtcaaatt 120
ccagggaagg gtctagagtg gatctctctt attagtgggtg atgggtgacac tacatgggtat 180
ggagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acaacgaaaa ctccctcttt 240
ctgcaaatga acgatctgag aactgaggac accgccatgt actactgtgc aagagatatg 300
gggtggaact tcttttcagtt gcaatactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 266
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 266
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Arg Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Asp Phe Ile Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

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

<210> 267
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 267
 gacttcacatct ttaaagatta tgcc

24

<210> 268
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 268
 Asp Phe Ile Phe Lys Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 269
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 269
 attagtgggtg atgggtgacac taca

24

<210> 270
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 270

Ile Ser Gly Asp Gly Asp Thr Thr
1 5

<210> 271
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 271
gcaagagata tggggtggaa cttcttttcag ttgcaatac 39

<210> 272
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 272
Ala Arg Asp Met Gly Trp Asn Phe Phe Gln Leu Gln Tyr
1 5 10

<210> 273
<211> 361
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 273
dcaggtgcag ctgcaggagt cgggccccgc actggtgaag ccttcacaga ccctgtccct 60
cacctgcact gtctctggtg gctccatcat cagaggtagt acctactgga gttgggtccg 120
ccaattccca gggaagggcc tggagtggat tggatacagt tattacagtg ggaccgccta 180
ctataatccg tccctcgaga gtcgagctac catttctgta gacacgtcta agaaccagtt 240
ctccctgaac ctgaagtctg tgacggccgc ggacacggcc gtgtattatt gtacaagaga 300
aataggagtg gctggtctct ttgacatctg gggccaggga accctgggtca cegtctctc 360
a 361

<210> 274
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 274
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ile Arg Gly
20 25 30

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

<210> 275
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 275
 ggtggctcca tcatcagagg tagtacctac

30

<210> 276
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 276
 Gly Gly Ser Ile Ile Arg Gly Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 277
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 277
 agttattaca gtgggaccgc c

21

<210> 278
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 278

Ser Tyr Tyr Ser Gly Thr Ala
1 5

<210> 279

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 279

acaagagaaa taggagtggc tgggtctcttt gacatc

36

<210> 280

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 280

Thr Arg Glu Ile Gly Val Ala Gly Leu Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 281

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 281

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

<210> 282

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 282

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> 283
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 283
 agagcaagtc agtcagtcctc tagctcttat ctcgcc

36

<210> 284
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 284
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 285
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 285
 ggggcaagtt ccagggccac c

21

<210> 286
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 286
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 287
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 287
 caacagtagc gaagcagccc gtggacg

27

<210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 288
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 289
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 289
 caggagcagt tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtc 60
 tcttgtaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tacattgggt gcgacaggcc 120
 cctggactag ggcttgaatg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaataat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcaa tacagcctac 240
 atggagctga aaagactgaa atctgacgac tggccgtat attactgtgc gagagacgcc 300
 cctcccatg atgtttttga tatctggggc caagggacat tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 290
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 290
 Gln Glu Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Leu Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

<210> 291
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 291
 ggatacacct tcaccggcta ctat

24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 292
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 293
 atcaacccta acagtgggtgg caca

24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 294
 Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 295
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 295
 gcgagagacg cccctcccca tgatgttttt gatatc 36

<210> 296
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 296
 Ala Arg Asp Ala Pro Pro His Asp Val Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 297
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 297
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgctt gatctatgct gcacccagtt tgcaaattgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 298
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 298
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

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

<210> 299
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 299
 cagggcatta gaaatgat

18

<210> 300
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 300
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 301
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 301
 gctgcatcc

9

<210> 302
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 302
 Ala Ala Ser
 1

<210> 303
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 303

ctacagcata atagttaccc gctcact

27

<210> 304

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 304

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 305

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 305

caggtgcagc tgcaagagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agtgggtgctt accactggag ctggatccgc 120
cagcaccacag ggaagggcct agagtggatt ggatacatct attacaatgg ggacacctac 180
tataatccgt ccctcaagag tcgcgttacc atttcagtgg acacgtctaa gaaccaattc 240
ttcctgaagg tgacctctgt gactgccgcg gacacggcca tgtattactg tgcgggagaa 300
aagcagctga ctgcttttga tatctggggc caaggacat tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 306

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 306

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

Cys Ala Gly Glu Lys Gln Leu Thr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 307
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 307
 ggtggctcca tcagtagtgg tgcttaccac 30

<210> 308
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 308
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ala Tyr His
 1 5 10

<210> 309
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 309
 atctattaca atggggacac c 21

<210> 310
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 310
 Ile Tyr Tyr Asn Gly Asp Thr
 1 5

<210> 311
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 311

gcgggagaaa agcagctgac tgcttttgat atc

33

<210> 312

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 312

Ala Gly Glu Lys Gln Leu Thr Ala Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 313

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 313

gtcatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc 60
 ataacttgcc gggcgagtca ggacattaat aattttttaa attggtatca acagaaatta 120
 gggaaagccc ctaaaactcct gatctccgat gcatccaatt tgcagacagg agtcccgta 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttacttttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatatgg ctgcatatta ctgtcaacaa tatgatcatt tcccgatac ttttggccag 300
 gggaccagac tggagaacaa t 321

<210> 314

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 314

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

100

105

<210> 315
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 315
 caggacatta ataatttt

18

<210> 316
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 316
 Gln Asp Ile Asn Asn Phe
 1 5

<210> 317
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 317
 gatgcatcc

9

<210> 318
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 318
 Asp Ala Ser
 1

<210> 319
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 319
caacaatatg atcatttccc gtatact

27

<210> 320
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 320
Gln Gln Tyr Asp His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 321
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 321
gaggtgcagt tgggtggagtc tggggggaggt gtgggttcggc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgacctgggt ccgccaagct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctctggt attaatgga atggcgatag cacagagtat 180
tcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataa acagtctgag agccgaggac acggccttct atcactgtgc gagagagaat 300
aactggaact tctactttga ctactggggc caggggaaccc tgggtaccgt ctcctca 357

<210> 322
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 322
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Asp Ser Thr Glu Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr His Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Asn Asn Trp Asn Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 323
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 323
 ggattcacct ttgatgatta tggc

24

<210> 324
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 324
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
 1 5

<210> 325
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 325
 attaattgga atggcgatag caca

24

<210> 326
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 326
 Ile Asn Trp Asn Gly Asp Ser Thr
 1 5

<210> 327
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 327
gcgagagaga ataactggaa cttctacttt gactac 36

<210> 328
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 328
Ala Arg Glu Asn Asn Trp Asn Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 329
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 329
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctcgagggga aagagccacc 60
ctctcctgta gggccagtca gagggttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaactt 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtc 240
gaagattttg cagtttatta ttgtcagcag tataataact ggccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 330
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 330
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Arg Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 331

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 331
 cagagtgtta gcagcaac 18

<210> 332
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 332
 Gln Ser Val Ser Ser Asn
 1 5

<210> 333
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 333
 ggtgcatcc 9

<210> 334
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 334
 Gly Ala Ser
 1

<210> 335
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 335
 cagcagtata ataactggcc gtggacg 27

<210> 336
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 336
 Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 337
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 337
 caggtccacc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tttccggaaa caccctcact gaattatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatgggtga cacaatctac 180
 tcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgttc aacagtgggg 300
 ggacctacct ctgactgctg gggccagga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 338
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 338
 Gln Val His Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Asn Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Ile Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Thr Val Gly Gly Pro Thr Ser Asp Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 339
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 339
 ggaaacacccc tcactgaatt atcc

24

<210> 340
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 340
 Gly Asn Thr Leu Thr Glu Leu Ser
 1 5

<210> 341
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 341
 tttgatcctg aagatggtga caca

24

<210> 342
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 342
 Phe Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr
 1 5

<210> 343
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 343
 tcaacagtgg ggggacctac ctctgactgc

30

<210> 344

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 344
 Ser Thr Val Gly Gly Pro Thr Ser Asp Cys
 1 5 10

<210> 345
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 345
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaggctct gatcttcgat gcatccaatt tagaaccagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttacttttca ccatcatcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacaa tatgataatc tcccgatcac cttcggccag 300
 gggacacgac tggacattaa a 321

<210> 346
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 346
 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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asp Ala Ser Asn Leu Glu Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ile Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 347
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 347

caggacatta gcaactat

18

<210> 348

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 348

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

1

5

<210> 349

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 349

gatgcatcc

9

<210> 350

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 350

Asp Ala Ser

1

<210> 351

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 351

caacaatatg ataatctccc gatcacc

27

<210> 352

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 352

Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Ile Thr
 1 5

<210> 353

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HC

<400> 353

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

```

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

```

<210> 354

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LC

<400> 354

```

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

```

<210> 355

<211> 1676

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> C5 người

<400> 355

```

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

```

Thr Ser Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly
 405 410 415
 Val Ala Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu
 420 425 430
 Phe Asn Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala
 435 440 445
 Arg Glu Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr
 450 455 460
 Leu Tyr Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu
 465 470 475 480
 His Leu Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile
 485 490 495
 Thr His Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe
 500 505 510
 Gly Thr Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile
 515 520 525
 Pro Val Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr
 530 535 540
 Ile Val Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp
 545 550 555 560
 Leu Asn Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser
 565 570 575
 Pro Asp Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met
 580 585 590
 Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala
 595 600 605
 Val Tyr Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe
 610 615 620
 Gln Phe Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu
 625 630 635 640
 Asn Asn Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn
 645 650 655
 Ala Asn Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile
 660 665 670
 Leu Arg Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala
 675 680 685
 Lys Tyr Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys
 690 695 700
 Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
 705 710 715 720
 Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser
 725 730 735
 Gln Leu Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu
 740 745 750
 His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr
 755 760 765
 Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys
 770 775 780
 Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln
 785 790 795 800
 Gly Val Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys
 805 810 815
 Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser
 820 825 830
 Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr
 835 840 845
 Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly
 850 855 860

```

Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser
865                      870                      875                      880
Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val
                      885                      890                      895
Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe
          900                      905                      910
Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg
          915                      920                      925
Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu
          930                      935                      940
Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro
945                      950                      955                      960
Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile
          965                      970                      975
Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu
          980                      985                      990
Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala
          995                      1000                      1005
Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His Tyr
          1010                      1015                      1020
Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu Ile
1025                      1030                      1035                      1040
Glu Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Leu Ser Ile
          1045                      1050                      1055
Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val Trp Lys Gly Gly
          1060                      1065                      1070
Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu Arg Val Leu Gly Gln
          1075                      1080                      1085
Val Asn Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn Ser Ile Cys Asn Ser Leu
          1090                      1095                      1100
Leu Trp Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu
1105                      1110                      1115                      1120
Asn Ser Gln Tyr Gln Pro Ile Lys Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu
          1125                      1130                      1135
Ala Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile
          1140                      1145                      1150
Arg Lys Ala Phe Asp Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu
          1155                      1160                      1165
Ile Lys Ala Asp Asn Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser
          1170                      1175                      1180
Thr Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys
1185                      1190                      1195                      1200
Thr His Pro Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala
          1205                      1210                      1215
Leu Val Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu
          1220                      1225                      1230
Gln His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val
          1235                      1240                      1245
Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp Ile
          1250                      1255                      1260
Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg Tyr
1265                      1270                      1275                      1280
Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu Gly
          1285                      1290                      1295
Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Ser Met Asp
          1300                      1305                      1310
Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu His Asn Tyr Lys Met
          1315                      1320                      1325

```

```

Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn Asp
1330                      1335                      1340
Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val His
1345                      1350                      1355                      1360
Val Thr Thr Val Val His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser
                      1365                      1370                      1375
Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg
                      1380                      1385                      1390
Gly Tyr Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr
                      1395                      1400                      1405
Lys Pro Ser Arg Glu Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met
                      1410                      1415                      1420
Asp Ile Ser Leu Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys
1425                      1430                      1435                      1440
Ala Leu Val Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys
                      1445                      1450                      1455
Asp Gly His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe
                      1460                      1465                      1470
Leu Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu
                      1475                      1480                      1485
Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys Gln
                      1490                      1495                      1500
Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val Cys
1505                      1510                      1515                      1520
Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met Gln
                      1525                      1530                      1535
Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr Ala
                      1540                      1545                      1550
Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr Ser Ile
                      1555                      1560                      1565
Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu Leu Asp Ile
                      1570                      1575                      1580
Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe
1585                      1590                      1595                      1600
Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln
                      1605                      1610                      1615
Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser
                      1620                      1625                      1630
Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp
                      1635                      1640                      1645
Pro Arg Asp Thr Thr Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu
                      1650                      1655                      1660
Asp Glu Phe Ala Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
1665                      1670                      1675

```

<210> 356

<211> 1686

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hC5 R885H

aa 1-1658: hC5 (aa 19-1676 of NM_001735.2 với sự thay đổi R885H)

aa 1659-1686: myc-myc-hexahistidin tag

<400> 356

Gln	Glu	Gln	Thr	Tyr	Val	Ile	Ser	Ala	Pro	Lys	Ile	Phe	Arg	Val	Gly
1				5					10					15	
Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Gln	Val	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Glu	Ala	Phe
			20					25					30		
Asp	Ala	Thr	Ile	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	Pro	Asp	Lys	Lys	Phe	Ser	Tyr
		35					40					45			
Ser	Ser	Gly	His	Val	His	Leu	Ser	Ser	Glu	Asn	Lys	Phe	Gln	Asn	Ser
	50					55					60				
Ala	Ile	Leu	Thr	Ile	Gln	Pro	Lys	Gln	Leu	Pro	Gly	Gly	Gln	Asn	Pro
65					70					75					80
Val	Ser	Tyr	Val	Tyr	Leu	Glu	Val	Val	Ser	Lys	His	Phe	Ser	Lys	Ser
				85					90					95	
Lys	Arg	Met	Pro	Ile	Thr	Tyr	Asp	Asn	Gly	Phe	Leu	Phe	Ile	His	Thr
			100					105					110		
Asp	Lys	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Asp	Gln	Ser	Val	Lys	Val	Arg	Val	Tyr
		115					120					125			
Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Leu	Lys	Pro	Ala	Lys	Arg	Glu	Thr	Val	Leu	Thr
	130					135					140				
Phe	Ile	Asp	Pro	Glu	Gly	Ser	Glu	Val	Asp	Met	Val	Glu	Glu	Ile	Asp
145					150					155					160
His	Ile	Gly	Ile	Ile	Ser	Phe	Pro	Asp	Phe	Lys	Ile	Pro	Ser	Asn	Pro
				165					170					175	
Arg	Tyr	Gly	Met	Trp	Thr	Ile	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Glu	Asp	Phe	Ser
			180					185					190		
Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Tyr	Phe	Glu	Val	Lys	Glu	Tyr	Val	Leu	Pro	His
		195					200					205			
Phe	Ser	Val	Ser	Ile	Glu	Pro	Glu	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gly	Tyr	Lys	Asn
	210					215					220				
Phe	Lys	Asn	Phe	Glu	Ile	Thr	Ile	Lys	Ala	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Lys
225					230					235					240
Val	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Phe	Gly	Ile	Arg	Glu	Asp
				245					250					255	
Leu	Lys	Asp	Asp	Gln	Lys	Glu	Met	Met	Gln	Thr	Ala	Met	Gln	Asn	Thr
			260					265					270		
Met	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Ala	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala
		275					280					285			
Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Asn	Lys	Tyr
	290					295					300				
Leu	Tyr	Ile	Ala	Val	Thr	Val	Ile	Glu	Ser	Thr	Gly	Gly	Phe	Ser	Glu
305					310					315					320
Glu	Ala	Glu	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val	Leu	Ser	Pro	Tyr	Lys	Leu
				325					330					335	
Asn	Leu	Val	Ala	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Lys	Pro	Gly	Ile	Pro	Tyr	Pro
			340					345					350		
Ile	Lys	Val	Gln	Val	Lys	Asp	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	Val	Gly	Gly	Val
		355					360					365			
Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Ala	Gln	Thr	Ile	Asp	Val	Asn	Gln	Glu	Thr	Ser
	370					375					380				
Asp	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Thr	Arg	Val	Asp	Asp	Gly	Val	Ala
385					390					395					400
Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Glu	Phe	Asn
				405					410					415	
Val	Lys	Thr	Asp	Ala	Pro	Asp	Leu	Pro	Glu	Glu	Asn	Gln	Ala	Arg	Glu
			420					425					430		
Gly	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Tyr	Leu	Tyr
		435					440					445			
Ile	Asp	Trp	Thr	Asp	Asn	His	Lys	Ala	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	His	Leu
	450					455					460				

Asn	Ile	Ile	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Pro	Tyr	Ile	Asp	Lys	Ile	Thr	His
465					470					475					480
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Lys	Ile	Ile	His	Phe	Gly	Thr
			485						490						495
Arg	Glu	Lys	Phe	Ser	Asp	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ile	Asn	Ile	Pro	Val
			500					505					510		
Thr	Gln	Asn	Met	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Ile	Val
		515					520					525			
Thr	Gly	Glu	Gln	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ser	Asp	Ser	Val	Trp	Leu	Asn
	530					535					540				
Ile	Glu	Glu	Lys	Cys	Gly	Asn	Gln	Leu	Gln	Val	His	Leu	Ser	Pro	Asp
545					550					555					560
Ala	Asp	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Thr	Val	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	Thr
			565						570						575
Gly	Met	Asp	Ser	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	
			580					585					590		
Gly	Val	Gln	Arg	Gly	Ala	Lys	Lys	Pro	Leu	Glu	Arg	Val	Phe	Gln	Phe
		595					600					605			
Leu	Glu	Lys	Ser	Asp	Leu	Gly	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Asn	Asn
	610					615					620				
Ala	Asn	Val	Phe	His	Leu	Ala	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Thr	Asn	Ala	Asn
625					630					635					640
Ala	Asp	Asp	Ser	Gln	Glu	Asn	Asp	Glu	Pro	Cys	Lys	Glu	Ile	Leu	Arg
				645					650						655
Pro	Arg	Arg	Thr	Leu	Gln	Lys	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Ala	Ala	Lys	Tyr
			660					665						670	
Lys	His	Ser	Val	Val	Lys	Lys	Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys	Val	Asn
		675					680					685			
Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln	Arg	Ala	Ala	Arg	Ile	Ser	Leu	Gly	Pro
	690					695					700				
Arg	Cys	Ile	Lys	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Val	Val	Ala	Ser	Gln	Leu
705					710					715					720
Arg	Ala	Asn	Ile	Ser	His	Lys	Asp	Met	Gln	Leu	Gly	Arg	Leu	His	Met
			725						730						735
Lys	Thr	Leu	Leu	Pro	Val	Ser	Lys	Pro	Glu	Ile	Arg	Ser	Tyr	Phe	Pro
		740						745					750		
Glu	Ser	Trp	Leu	Trp	Glu	Val	His	Leu	Val	Pro	Arg	Arg	Lys	Gln	Leu
		755					760					765			
Gln	Phe	Ala	Leu	Pro	Asp	Ser	Leu	Thr	Thr	Trp	Glu	Ile	Gln	Gly	Val
	770					775					780				
Gly	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Asp	Thr	Val	Lys	Ala	Lys
785					790					795					800
Val	Phe	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Tyr	Ser	Val	Val
			805						810						815
Arg	Gly	Glu	Gln	Ile	Gln	Leu	Lys	Gly	Thr	Val	Tyr	Asn	Tyr	Arg	Thr
			820					825					830		
Ser	Gly	Met	Gln	Phe	Cys	Val	Lys	Met	Ser	Ala	Val	Glu	Gly	Ile	Cys
		835					840					845			
Thr	Ser	Glu	Ser	Pro	Val	Ile	Asp	His	Gln	Gly	Thr	Lys	Ser	Ser	Lys
	850					855						860			
Cys	Val	His	Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Val	Thr	Phe
865					870					875					880
Thr	Val	Leu	Pro	Leu	Glu	Ile	Gly	Leu	His	Asn	Ile	Asn	Phe	Ser	Leu
			885						890						895
Glu	Thr	Trp	Phe	Gly	Lys	Glu	Ile	Leu	Val	Lys	Thr	Leu	Arg	Val	Val
		900						905					910		
Pro	Glu	Gly	Val	Lys	Arg	Glu	Ser	Tyr	Ser	Gly	Val	Thr	Leu	Asp	Pro
		915					920						925		

Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro Tyr Arg
 930 935 940
 Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile Leu Ser
 945 950 955 960
 Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu Ser Gln
 965 970 975
 Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala Glu Ala
 980 985 990
 Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His Tyr Leu Glu
 995 1000 1005
 Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu Ile Glu Lys
 1010 1015 1020
 Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Leu Ser Ile Met Ser
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val Trp Lys Gly Gly Ser Ala
 1045 1050 1055
 Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu Arg Val Leu Gly Gln Val Asn
 1060 1065 1070
 Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn Ser Ile Cys Asn Ser Leu Leu Trp
 1075 1080 1085
 Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu Asn Ser
 1090 1095 1100
 Gln Tyr Gln Pro Ile Lys Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg
 1105 1110 1115 1120
 Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys
 1125 1130 1135
 Ala Phe Asp Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu Ile Lys
 1140 1145 1150
 Ala Asp Asn Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe
 1155 1160 1165
 Thr Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His
 1170 1175 1180
 Pro Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val
 1185 1190 1195 1200
 Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu Gln His
 1205 1210 1215
 Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val Glu Thr
 1220 1225 1230
 Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp Ile Asn Tyr
 1235 1240 1245
 Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg Tyr Gly Gly
 1250 1255 1260
 Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu Gly Leu Thr
 1265 1270 1275 1280
 Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Ser Met Asp Ile Asp
 1285 1290 1295
 Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu His Asn Tyr Lys Met Thr Asp
 1300 1305 1310
 Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu
 1315 1320 1325
 Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr
 1330 1335 1340
 Thr Val Val His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr
 1345 1350 1355 1360
 Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr
 1365 1370 1375
 Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro
 1380 1385 1390

```

Ser Arg Glu Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile
      1395                      1400                      1405
Ser Leu Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu
      1410                      1415                      1420
Val Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly
1425                      1430                      1435                      1440
His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu Cys
      1445                      1450                      1455
Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu Ser Pro
      1460                      1465                      1470
Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys Gln Cys Thr
      1475                      1480                      1485
Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val Cys Glu Gly
      1490                      1495                      1500
Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met Gln Glu Glu
1505                      1510                      1515                      1520
Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr Ala Cys Lys
      1525                      1530                      1535
Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val
      1540                      1545                      1550
Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys
      1555                      1560                      1565
Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys
      1570                      1575                      1580
Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu
1585                      1590                      1595                      1600
Ile Met Gly Lys Glu Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg
      1605                      1610                      1615
Tyr Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg
      1620                      1625                      1630
Asp Thr Thr Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu
      1635                      1640                      1645
Phe Ala Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys Glu Gln Lys Leu Ile Ser
      1650                      1655                      1660
Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1665                      1670                      1675                      1680
His His His His His His
      1685

```

<210> 357

<211> 1686

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hC5 R885C

aa 1-1658: hC5 (aa 19-1676 của NM_001735.2 với sự thay đổi
R885C)

aa 1659-1686: myc-myc-hexahistidin tag

<400> 357

```

Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg Val Gly
  1                      5                      10                      15
Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu Ala Phe
      20                      25                      30
Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe Ser Tyr
      35                      40                      45

```

Ser	Ser	Gly	His	Val	His	Leu	Ser	Ser	Glu	Asn	Lys	Phe	Gln	Asn	Ser
50						55				60					
Ala	Ile	Leu	Thr	Ile	Gln	Pro	Lys	Gln	Leu	Pro	Gly	Gly	Gln	Asn	Pro
65					70					75					80
Val	Ser	Tyr	Val	Tyr	Leu	Glu	Val	Val	Ser	Lys	His	Phe	Ser	Lys	Ser
				85					90					95	
Lys	Arg	Met	Pro	Ile	Thr	Tyr	Asp	Asn	Gly	Phe	Leu	Phe	Ile	His	Thr
			100					105					110		
Asp	Lys	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Asp	Gln	Ser	Val	Lys	Val	Arg	Val	Tyr
		115					120					125			
Ser	Leu	Asn	Asp	Asp	Leu	Lys	Pro	Ala	Lys	Arg	Glu	Thr	Val	Leu	Thr
	130					135					140				
Phe	Ile	Asp	Pro	Glu	Gly	Ser	Glu	Val	Asp	Met	Val	Glu	Glu	Ile	Asp
145					150					155					160
His	Ile	Gly	Ile	Ile	Ser	Phe	Pro	Asp	Phe	Lys	Ile	Pro	Ser	Asn	Pro
				165					170					175	
Arg	Tyr	Gly	Met	Trp	Thr	Ile	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Glu	Asp	Phe	Ser
			180					185					190		
Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Tyr	Phe	Glu	Val	Lys	Glu	Tyr	Val	Leu	Pro	His
		195					200					205			
Phe	Ser	Val	Ser	Ile	Glu	Pro	Glu	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gly	Tyr	Lys	Asn
	210					215					220				
Phe	Lys	Asn	Phe	Glu	Ile	Thr	Ile	Lys	Ala	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Lys
225					230					235					240
Val	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Phe	Gly	Ile	Arg	Glu	Asp
				245					250					255	
Leu	Lys	Asp	Asp	Gln	Lys	Glu	Met	Met	Gln	Thr	Ala	Met	Gln	Asn	Thr
			260					265					270		
Met	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Ala	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala
		275					280					285			
Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Asn	Lys	Tyr
	290					295					300				
Leu	Tyr	Ile	Ala	Val	Thr	Val	Ile	Glu	Ser	Thr	Gly	Gly	Phe	Ser	Glu
305					310					315					320
Glu	Ala	Glu	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val	Leu	Ser	Pro	Tyr	Lys	Leu
				325					330					335	
Asn	Leu	Val	Ala	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Lys	Pro	Gly	Ile	Pro	Tyr	Pro
			340					345					350		
Ile	Lys	Val	Gln	Val	Lys	Asp	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	Val	Gly	Gly	Val
		355					360					365			
Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Ala	Gln	Thr	Ile	Asp	Val	Asn	Gln	Glu	Thr	Ser
	370					375					380				
Asp	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Thr	Arg	Val	Asp	Asp	Gly	Val	Ala
385					390					395					400
Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Glu	Phe	Asn
				405					410					415	
Val	Lys	Thr	Asp	Ala	Pro	Asp	Leu	Pro	Glu	Glu	Asn	Gln	Ala	Arg	Glu
			420					425					430		
Gly	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Tyr	Leu	Tyr
		435					440					445			
Ile	Asp	Trp	Thr	Asp	Asn	His	Lys	Ala	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	His	Leu
	450					455					460				
Asn	Ile	Ile	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Pro	Tyr	Ile	Asp	Lys	Ile	Thr	His
465					470					475					480
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Lys	Ile	Ile	His	Phe	Gly	Thr
				485					490					495	
Arg	Glu	Lys	Phe	Ser	Asp	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ile	Asn	Ile	Pro	Val
			500					505					510		

Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr Ile Val
 515 520 525
 Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp Leu Asn
 530 535 540
 Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser Pro Asp
 545 550 555 560
 Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met Ala Thr
 565 570 575
 Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala Val Tyr
 580 585 590
 Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe Gln Phe
 595 600 605
 Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu Asn Asn
 610 615 620
 Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn Ala Asn
 625 630 635 640
 Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile Leu Arg
 645 650 655
 Pro Arg Arg Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr
 660 665 670
 Lys His Ser Val Val Lys Lys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn
 675 680 685
 Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro
 690 695 700
 Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu
 705 710 715 720
 Arg Ala Asn Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg Leu His Met
 725 730 735
 Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr Phe Pro
 740 745 750
 Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys Gln Leu
 755 760 765
 Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile Gln Gly Val
 770 775 780
 Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val Lys Ala Lys
 785 790 795 800
 Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser Val Val
 805 810 815
 Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr Arg Thr
 820 825 830
 Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly Ile Cys
 835 840 845
 Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser Ser Lys
 850 855 860
 Cys Val Cys Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu Val Thr Phe
 865 870 875 880
 Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn Phe Ser Leu
 885 890 895
 Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu Arg Val Val
 900 905 910
 Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr Leu Asp Pro
 915 920 925
 Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro Tyr Arg
 930 935 940
 Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile Leu Ser
 945 950 955 960
 Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu Ser Gln
 965 970 975

Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala Glu Ala
 980 985 990
 Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His Tyr Leu Glu
 995 1000 1005
 Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu Ile Glu Lys
 1010 1015 1020
 Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Leu Ser Ile Met Ser
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val Trp Lys Gly Gly Ser Ala
 1045 1050 1055
 Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu Arg Val Leu Gly Gln Val Asn
 1060 1065 1070
 Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn Ser Ile Cys Asn Ser Leu Leu Trp
 1075 1080 1085
 Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu Asn Ser
 1090 1095 1100
 Gln Tyr Gln Pro Ile Lys Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg
 1105 1110 1115 1120
 Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys
 1125 1130 1135
 Ala Phe Asp Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu Ile Lys
 1140 1145 1150
 Ala Asp Asn Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe
 1155 1160 1165
 Thr Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His
 1170 1175 1180
 Pro Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val
 1185 1190 1195 1200
 Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu Gln His
 1205 1210 1215
 Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val Glu Thr
 1220 1225 1230
 Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp Ile Asn Tyr
 1235 1240 1245
 Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg Tyr Gly Gly
 1250 1255 1260
 Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu Gly Leu Thr
 1265 1270 1275 1280
 Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Ser Met Asp Ile Asp
 1285 1290 1295
 Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu His Asn Tyr Lys Met Thr Asp
 1300 1305 1310
 Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu
 1315 1320 1325
 Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr
 1330 1335 1340
 Thr Val Val His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr
 1345 1350 1355 1360
 Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr
 1365 1370 1375
 Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro
 1380 1385 1390
 Ser Arg Glu Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile
 1395 1400 1405
 Ser Leu Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu
 1410 1415 1420
 Val Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly
 1425 1430 1435 1440

```

His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu Cys
      1445                      1450                      1455
Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu Ser Pro
      1460                      1465                      1470
Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys Gln Cys Thr
      1475                      1480                      1485
Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val Cys Glu Gly
      1490                      1495                      1500
Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met Gln Glu Glu
1505                      1510                      1515                      1520
Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr Ala Cys Lys
      1525                      1530                      1535
Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr Ser Ile Thr Val
      1540                      1545                      1550
Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys
      1555                      1560                      1565
Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys
      1570                      1575                      1580
Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu
1585                      1590                      1595                      1600
Ile Met Gly Lys Glu Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser Phe Arg
      1605                      1610                      1615
Tyr Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg
      1620                      1625                      1630
Asp Thr Thr Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu
      1635                      1640                      1645
Phe Ala Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys Glu Gln Lys Leu Ile Ser
      1650                      1655                      1660
Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1665                      1670                      1675                      1680
His His His His His His
      1685

```

<210> 358

<211> 1686

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M. fascicularis C5 R885H

aa 1-1658: M. fascicularis C5 (xác định nội tại
; NTBK#12480)

aa 1659-1686: myc-myc-hexahistidin tag

<400> 358

```

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

```


Lys Lys Ile Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile His Thr
 100 105 110
 Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg Val Tyr
 115 120 125
 Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val Leu Thr
 130 135 140
 Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Ile Asp Met Val Glu Glu Ile Asp
 145 150 155 160
 His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser Asn Pro
 165 170 175
 Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Gln Ala Lys Tyr Lys Glu Asp Phe Ser
 180 185 190
 Thr Thr Gly Thr Ala Phe Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro His
 195 200 205
 Phe Ser Val Ser Val Glu Pro Glu Ser Asn Phe Ile Gly Tyr Lys Asn
 210 215 220
 Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr Asn Lys
 225 230 235 240
 Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg Glu Asp
 245 250 255
 Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln Asn Thr
 260 265 270
 Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu Thr Ala
 275 280 285
 Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn Lys Tyr
 290 295 300
 Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe Ser Glu
 305 310 315 320
 Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr Lys Leu
 325 330 335
 Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro Tyr Ser
 340 345 350
 Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ala Leu Asp Gln Leu Val Gly Gly Val
 355 360 365
 Pro Val Thr Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu Thr Ser
 370 375 380
 Asp Leu Glu Pro Arg Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly Val Ala
 385 390 395 400
 Ser Phe Val Val Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu Phe Asn
 405 410 415
 Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Asp Glu Asn Gln Ala Arg Glu
 420 425 430
 Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr Leu Tyr
 435 440 445
 Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu Tyr Leu
 450 455 460
 Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile Thr His
 465 470 475 480
 Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe Gly Thr
 485 490 495
 Arg Glu Lys Leu Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile Pro Val
 500 505 510
 Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr Ile Val
 515 520 525
 Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp Leu Asn
 530 535 540
 Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser Pro Asp
 545 550 555 560

Ala Asp Thr Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met Val Thr
 565 570 575
 Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Val Asp Ser Ala Val Tyr
 580 585 590
 Gly Val Gln Arg Arg Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe Gln Phe
 595 600 605
 Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu Asn Asn
 610 615 620
 Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn Ala Asn
 625 630 635 640
 Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile Ile Arg
 645 650 655
 Pro Arg Arg Met Leu Gln Glu Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr
 660 665 670
 Lys His Leu Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Val Arg Ile Asn
 675 680 685
 His Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Val Gly Pro
 690 695 700
 Arg Cys Val Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu
 705 710 715 720
 Arg Ala Asn Asn Ser His Lys Asp Leu Gln Leu Gly Arg Leu His Met
 725 730 735
 Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser Tyr Phe Pro
 740 745 750
 Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys Gln Leu
 755 760 765
 Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Val Thr Thr Trp Glu Ile Gln Gly Val
 770 775 780
 Gly Ile Ser Asn Ser Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Ile Lys Ala Lys
 785 790 795 800
 Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr Ser Val Val
 805 810 815
 Arg Gly Glu Gln Val Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn Tyr Arg Thr
 820 825 830
 Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu Gly Ile Cys
 835 840 845
 Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys Ser Ser Lys
 850 855 860
 Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Asn His Leu Val Thr Phe
 865 870 875 880
 Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu Gln Asn Ile Asn Phe Ser Leu
 885 890 895
 Glu Thr Ser Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Ser Leu Arg Val Val
 900 905 910
 Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Leu Asp Pro
 915 920 925
 Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe Pro Tyr Arg
 930 935 940
 Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg Ile Leu Ser
 945 950 955 960
 Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val Leu Ser Arg
 965 970 975
 Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser Ala Glu Ala
 980 985 990
 Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His Tyr Leu Glu
 995 1000 1005
 Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu Ile Glu Lys
 1010 1015 1020

Arg Asn Leu Glu Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Val Ser Ile Met Ser
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val Trp Lys Gly Gly Ser Ala
 1045 1050 1055
 Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu Arg Val Leu Gly Gln Val His
 1060 1065 1070
 Lys His Val Glu Gln Asn Gln Asn Ser Ile Cys Asn Ser Leu Leu Trp
 1075 1080 1085
 Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu Asn Ser
 1090 1095 1100
 Gln Tyr Gln Pro Ile Lys Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu Ala Arg
 1105 1110 1115 1120
 Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile Arg Lys
 1125 1130 1135
 Ala Phe Asp Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asn Thr Ala Leu Ile Lys
 1140 1145 1150
 Ala Asp Thr Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser Thr Phe
 1155 1160 1165
 Thr Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys Thr His
 1170 1175 1180
 Pro Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala Leu Val
 1185 1190 1195 1200
 Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Ser Leu Gln His
 1205 1210 1215
 Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val Glu Thr
 1220 1225 1230
 Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp Ile Asn Tyr
 1235 1240 1245
 Val Asn Pro Ile Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg Tyr Gly Gly
 1250 1255 1260
 Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu Gly Leu Thr
 1265 1270 1275 1280
 Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Asn Met Asp Ile Asp
 1285 1290 1295
 Val Ala Tyr Lys His Lys Gly Pro Leu His Asn Tyr Lys Met Thr Asp
 1300 1305 1310
 Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn Asp Asp Leu
 1315 1320 1325
 Val Val Ser Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val His Val Thr
 1330 1335 1340
 Thr Val Val His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser Phe Tyr
 1345 1350 1355 1360
 Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg Gly Tyr
 1365 1370 1375
 Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr Lys Pro
 1380 1385 1390
 Ser Arg Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met Asp Ile
 1395 1400 1405
 Ser Leu Pro Thr Gly Ile Asn Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu
 1410 1415 1420
 Val Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys Asp Gly
 1425 1430 1435 1440
 His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe Leu Cys
 1445 1450 1455
 Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu Ser Pro
 1460 1465 1470
 Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys Gln Cys Thr
 1475 1480 1485

```

Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val Cys Glu Gly
  1490                      1495                      1500
Ala Thr Cys Lys Cys Ile Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met Gln Lys Glu
  1505                      1510                      1515                      1520
Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr Ala Cys Asn
                      1525                      1530                      1535
Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ile Ile Thr Ser Ile Thr Thr
                      1540                      1545                      1550
Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu Leu Asp Ile Tyr Lys
                      1555                      1560                      1565
Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe Ile Lys
                      1570                      1575                      1580
Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln Tyr Leu
  1585                      1590                      1595                      1600
Ile Met Gly Lys Glu Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Thr Phe Arg
                      1605                      1610                      1615
Tyr Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp Pro Arg
                      1620                      1625                      1630
Asp Thr Thr Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu Asp Glu
                      1635                      1640                      1645
Phe Ala Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys Glu Gln Lys Leu Ile Ser
                      1650                      1655                      1660
Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
  1665                      1670                      1675                      1680
His His His His His His
                      1685

```

<210> 359

<211> 1676

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hc5 P01031

<400> 359

```

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

```

				165					170					175			
Ile	Asp	His	Ile	Gly	Ile	Ile	Ser	Phe	Pro	Asp	Phe	Lys	Ile	Pro	Ser		
			180					185					190				
Asn	Pro	Arg	Tyr	Gly	Met	Trp	Thr	Ile	Lys	Ala	Lys	Tyr	Lys	Glu	Asp		
		195					200					205					
Phe	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ala	Tyr	Phe	Glu	Val	Lys	Glu	Tyr	Val	Leu		
	210					215					220						
Pro	His	Phe	Ser	Val	Ser	Ile	Glu	Pro	Glu	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gly	Tyr		
225					230					235					240		
Lys	Asn	Phe	Lys	Asn	Phe	Glu	Ile	Thr	Ile	Lys	Ala	Arg	Tyr	Phe	Tyr		
			245						250					255			
Asn	Lys	Val	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Phe	Gly	Ile	Arg		
			260					265					270				
Glu	Asp	Leu	Lys	Asp	Asp	Gln	Lys	Glu	Met	Met	Gln	Thr	Ala	Met	Gln		
	275						280					285					
Asn	Thr	Met	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Ala	Gln	Val	Thr	Phe	Asp	Ser	Glu		
	290					295					300						
Thr	Ala	Val	Lys	Glu	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Asn		
305					310					315					320		
Lys	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ala	Val	Thr	Val	Ile	Glu	Ser	Thr	Gly	Gly	Phe		
			325						330					335			
Ser	Glu	Glu	Ala	Glu	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	Tyr	Val	Leu	Ser	Pro	Tyr		
			340					345					350				
Lys	Leu	Asn	Leu	Val	Ala	Thr	Pro	Leu	Phe	Leu	Lys	Pro	Gly	Ile	Pro		
	355						360					365					
Tyr	Pro	Ile	Lys	Val	Gln	Val	Lys	Asp	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	Val	Gly		
	370					375					380						
Gly	Val	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Ala	Gln	Thr	Ile	Asp	Val	Asn	Gln	Glu		
385					390					395					400		
Thr	Ser	Asp	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Thr	Arg	Val	Asp	Asp	Gly		
			405						410					415			
Val	Ala	Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Leu	Pro	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Glu		
			420					425					430				
Phe	Asn	Val	Lys	Thr	Asp	Ala	Pro	Asp	Leu	Pro	Glu	Glu	Asn	Gln	Ala		
	435						440					445					
Arg	Glu	Gly	Tyr	Arg	Ala	Ile	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Tyr		
	450					455					460						
Leu	Tyr	Ile	Asp	Trp	Thr	Asp	Asn	His	Lys	Ala	Leu	Leu	Val	Gly	Glu		
465					470					475					480		
His	Leu	Asn	Ile	Ile	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Pro	Tyr	Ile	Asp	Lys	Ile		
			485						490					495			
Thr	His	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	Gly	Lys	Ile	Ile	His	Phe		
			500					505					510				
Gly	Thr	Arg	Glu	Lys	Phe	Ser	Asp	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ser	Ile	Asn	Ile		
	515						520					525					
Pro	Val	Thr	Gln	Asn	Met	Val	Pro	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr		
	530					535					540						
Ile	Val	Thr	Gly	Glu	Gln	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ser	Asp	Ser	Val	Trp		
545					550					555					560		
Leu	Asn	Ile	Glu	Glu	Lys	Cys	Gly	Asn	Gln	Leu	Gln	Val	His	Leu	Ser		
			565					570						575			
Pro	Asp	Ala	Asp	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	Gln	Thr	Val	Ser	Leu	Asn	Met		
			580					585					590				
Ala	Thr	Gly	Met	Asp	Ser	Trp	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Val	Asp	Ser	Ala		
	595						600					605					
Val	Tyr	Gly	Val	Gln	Arg	Gly	Ala	Lys	Lys	Pro	Leu	Glu	Arg	Val	Phe		
	610					615					620						
Gln	Phe	Leu	Glu	Lys	Ser	Asp	Leu	Gly	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu		

625					630					635					640
Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Phe	His	Leu	Ala	Gly	Leu	Thr	Phe	Leu	Thr	Asn
				645					650						655
Ala	Asn	Ala	Asp	Asp	Ser	Gln	Glu	Asn	Asp	Glu	Pro	Cys	Lys	Glu	Ile
			660					665					670		
Leu	Arg	Pro	Arg	Arg	Thr	Leu	Gln	Lys	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Ala	Ala
		675					680					685			
Lys	Tyr	Lys	His	Ser	Val	Val	Lys	Lys	Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys
	690					695					700				
Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln	Arg	Ala	Ala	Arg	Ile	Ser	Leu
705					710					715					720
Gly	Pro	Arg	Cys	Ile	Lys	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Val	Val	Ala	Ser
			725						730					735	
Gln	Leu	Arg	Ala	Asn	Ile	Ser	His	Lys	Asp	Met	Gln	Leu	Gly	Arg	Leu
			740					745					750		
His	Met	Lys	Thr	Leu	Leu	Pro	Val	Ser	Lys	Pro	Glu	Ile	Arg	Ser	Tyr
		755					760					765			
Phe	Pro	Glu	Ser	Trp	Leu	Trp	Glu	Val	His	Leu	Val	Pro	Arg	Arg	Lys
	770					775					780				
Gln	Leu	Gln	Phe	Ala	Leu	Pro	Asp	Ser	Leu	Thr	Thr	Trp	Glu	Ile	Gln
785					790						795				800
Gly	Val	Gly	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Ile	Cys	Val	Ala	Asp	Thr	Val	Lys
			805						810					815	
Ala	Lys	Val	Phe	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Tyr	Ser
			820					825					830		
Val	Val	Arg	Gly	Glu	Gln	Ile	Gln	Leu	Lys	Gly	Thr	Val	Tyr	Asn	Tyr
		835					840					845			
Arg	Thr	Ser	Gly	Met	Gln	Phe	Cys	Val	Lys	Met	Ser	Ala	Val	Glu	Gly
	850					855					860				
Ile	Cys	Thr	Ser	Glu	Ser	Pro	Val	Ile	Asp	His	Gln	Gly	Thr	Lys	Ser
865					870					875					880
Ser	Lys	Cys	Val	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	His	Leu	Val
			885						890					895	
Thr	Phe	Thr	Val	Leu	Pro	Leu	Glu	Ile	Gly	Leu	His	Asn	Ile	Asn	Phe
			900					905					910		
Ser	Leu	Glu	Thr	Trp	Phe	Gly	Lys	Glu	Ile	Leu	Val	Lys	Thr	Leu	Arg
		915					920					925			
Val	Val	Pro	Glu	Gly	Val	Lys	Arg	Glu	Ser	Tyr	Ser	Gly	Val	Thr	Leu
	930					935						940			
Asp	Pro	Arg	Gly	Ile	Tyr	Gly	Thr	Ile	Ser	Arg	Arg	Lys	Glu	Phe	Pro
945					950					955					960
Tyr	Arg	Ile	Pro	Leu	Asp	Leu	Val	Pro	Lys	Thr	Glu	Ile	Lys	Arg	Ile
			965						970					975	
Leu	Ser	Val	Lys	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Glu	Ile	Leu	Ser	Ala	Val	Leu
			980					985					990		
Ser	Gln	Glu	Gly	Ile	Asn	Ile	Leu	Thr	His	Leu	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala
			995				1000					1005			
Glu	Ala	Glu	Leu	Met	Ser	Val	Val	Pro	Val	Phe	Tyr	Val	Phe	His	Tyr
	1010					1015					1020				
Leu	Glu	Thr	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Ile	Phe	His	Ser	Asp	Pro	Leu	Ile
1025					1030					1035					1040
Glu	Lys	Gln	Lys	Leu	Lys	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Gly	Met	Leu	Ser	Ile
			1045						1050					1055	
Met	Ser	Tyr	Arg	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Val	Trp	Lys	Gly	Gly
			1060					1065					1070		
Ser	Ala	Ser	Thr	Trp	Leu	Thr	Ala	Phe	Ala	Leu	Arg	Val	Leu	Gly	Gln
	1075						1080					1085			
Val	Asn	Lys	Tyr	Val	Glu	Gln	Asn	Gln	Asn	Ser	Ile	Cys	Asn	Ser	Leu

1090	1095	1100
Leu Trp Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys Glu		
1105	1110	1115 1120
Asn Ser Gln Tyr Gln Pro Ile Lys Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val Glu		
	1125	1130 1135
Ala Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly Ile		
	1140	1145 1150
Arg Lys Ala Phe Asp Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala Leu		
	1155	1160 1165
Ile Lys Ala Asp Asn Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln Ser		
	1170	1175 1180
Thr Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp Lys		
1185	1190	1195 1200
Thr His Pro Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu Ala		
	1205	1210 1215
Leu Val Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn Leu		
	1220	1225 1230
Gln His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met Val		
	1235	1240 1245
Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp Ile		
	1250	1255 1260
Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg Tyr		
1265	1270	1275 1280
Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu Gly		
	1285	1290 1295
Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Ser Met Asp		
	1300	1305 1310
Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu His Asn Tyr Lys Met		
	1315	1320 1325
Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn Asp		
	1330	1335 1340
Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val His		
1345	1350	1355 1360
Val Thr Thr Val Val His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys Ser		
	1365	1370 1375
Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr Arg		
	1380	1385 1390
Gly Tyr Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser Tyr		
	1395	1400 1405
Lys Pro Ser Arg Glu Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val Met		
	1410	1415 1420
Asp Ile Ser Leu Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu Lys		
1425	1430	1435 1440
Ala Leu Val Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile Lys		
	1445	1450 1455
Asp Gly His Val Leu Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp Phe		
	1460	1465 1470
Leu Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe Leu		
	1475	1480 1485
Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys Gln		
	1490	1495 1500
Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val Cys		
1505	1510	1515 1520
Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met Gln		
	1525	1530 1535
Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr Ala		
	1540	1545 1550
Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr Ser Ile		

```

      1555              1560              1565
Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu Leu Asp Ile
      1570              1575              1580
Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser Glu Ile Thr Phe
1585              1590              1595              1600
Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg Gln
      1605              1610              1615
Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe Ser
      1620              1625              1630
Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr Trp
      1635              1640              1645
Pro Arg Asp Thr Thr Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn Leu
      1650              1655              1660
Asp Glu Phe Ala Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys
1665              1670              1675

```

<210> 360
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> C5 peptit người aa591-599

<400> 360
 Asn Met Ala Thr Gly Met Asp Ser Trp
 1 5

<210> 361
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> C5 peptit người aa775-794

<400> 361
 Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg Lys Gln Leu Gln Phe Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Asp Ser Leu
 20

<210> 362
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HCVR của M1M17628N

<400> 362
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Ala Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu.Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Arg Asp
 20 25 30

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

<210> 363
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> LCVR của M1M17628N

<400> 363
 Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile His Val Trp
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 364
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IRBP peptit

<400> 364
 Gly Pro Thr His Leu Phe Gln Pro Ser Leu Val Leu Asp Met Ala Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Asp
 20

<210> 365
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCVR của M1M17627N

<400> 365

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

<210> 366

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCVR của M1M17627N

<400> 366

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