



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

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



1-0043176

A61K 39/395; A61K 48/00; C12P 21/08; (13) B
(51)^{2020.01} C12N 15/13; C12N 5/10; A61K 35/12;
C07K 16/28

(21) 1-2021-02932

(22) 02/12/2019

(86) PCT/JP2019/047050 02/12/2019

(87) WO 2020/116398 A1 11/06/2020

(30) 2018-226669 03/12/2018 JP

(45) 25/02/2025 443

(43) 27/09/2021 402

(73) TEIJIN PHARMA LIMITED (JP)

2-1, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1000013, Japan

(72) TANOKURA, Akira (JP); KATO, Hirotsugu (JP); EGUCHI, Hiroshi (JP); TAKAGI, Kenichiro (JP); YAMAMURA, Satoshi (JP); NAMIKI, Naoko (JP); ISHIKAWA, Daisuke (JP); HIGUCHI, Hirofumi (JP); TAKEO, Tomoyo (JP); OHORI, Masayo (JP).

(74) Văn phòng Luật sư MINERVAS (MINERVAS)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC NHÂN HÓA KHÁNG THỤ THỂ IGF-I, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC, VECTƠ TÁCH DÒNG CHỨA PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC NÀY, TẾ BÀO TÁI TỔ HỢP, DƯỢC PHẨM, VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2021-02932

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa mà, thông qua thụ thể IGF-I, tăng khối lượng cơ nhưng không hạ mức đường huyết. Kháng thể được nhân hóa này là kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I, đoạn của nó, hoặc dẫn xuất của nó; có trình tự axit amin riêng biệt chẳng hạn như các SEQ ID NO. 1 đến 6 có vai trò làm trình tự CDR; và liên kết riêng biệt với miền ngoại bào thụ thể IGF-I.

```
IGF1R_Chúột to   EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTIDWSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGD 180
IGF1R_Chúột nhấ EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTIDWSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGD 180
IGF1R_Người      EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGD 180
IGF1R_Chúột lang EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYIVGNKSPKECGD 180
IGF1R_Thỏ        EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYIVGNKSPKECGD 180
*****

IGF1R_Chúột to   LCPGTLEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSCVCGKRACTENNECCHPECLGSCH 240
IGF1R_Chúột nhấ LCPGTLEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSCVCGKRACTENNECCHPECLGSCH 240
IGF1R_Người      LCPGTMEEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSTCGKRACTENNECCHPECLGSCH 240
IGF1R_Chúột lang LCPGTMEEEKPLCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSCVCGKRACTEYQECCHPECLGSCH 240
IGF1R_Thỏ        MCPGTLEEKPLCEKTA INNEYNYRCWTTNRCQKMCPSCVCGKRACTENNECCHPECLGSCH 240
:****:****:****:*****:*****:*****:*****

IGF1R_Chúột to   TPDDNTTCVACRHYYYKGVCVPACPPGTYRFEGRWCVRDRCANIPNAESSSDSGFVIHD 300
IGF1R_Chúột nhấ TPDDNTTCVACRHYYYKGVCVPACPPGTYRFEGRWCVRDRCANIPNAESSSDSGFVIHD 300
IGF1R_Người      APDNDTACVACRHYYYAGVCVPACPPNTYRFEGRWCVRDRCANILSAESSDSEGFVIHD 300
IGF1R_Chúột lang APDDDTACVACRHYYAGVCVPACPPGTYRFEGRWCVRDRCANIPNAESSDSEGFVIHD 300
IGF1R_Thỏ        APDDDTACVACRHYYFSGVCVPACPPNTYRFEGRWCVRDRCANIPNADGGDSEGFVIHD 300
:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***

IGF1R_Chúột to   GECMQECPSGFI RNSTQSMYCIPCEGPCPKVCGDEEEKTKTIDSVTSAQMLQGCTILKGN 360
IGF1R_Chúột nhấ GECMQECPSGFI RNSTQSMYCIPCEGPCPKVCGDEEEKTKTIDSVTSAQMLQGCTILKGN 360
IGF1R_Người      GECMQECPSGFI RINGSQSMYCIPCEGPCPKVCE-EEKTKTIDSVTSAQMLQGCTIFKGN 359
IGF1R_Chúột lang GECMQECPSGFI RINGSQSMYCIPCEGPCPKVCE-EEKTKTIDSVTSAQMLQGCTIFKGN 359
IGF1R_Thỏ        GECMQECPSGFI RINGSQSMFCIPCEGPCPKVCE-EDKTKTIDSVNSAQMLQGCTIFKGN 359
.*****:***:*****:*****:*****:*****:*****
```

FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I (thụ thể IGF-I), và cụ thể hơn là kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I mà liên kết riêng biệt với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

1. Yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I (IGF-I)

IGF-I là yếu tố tăng trưởng tương tự insulin được tiết ra chủ yếu từ gan thông qua sự hoạt hóa của thụ thể hormon tăng trưởng (GH) bằng hormon tăng trưởng được tiết ra từ tuyến yên, và tác động đến thụ thể IGF-I để bằng cách đó thể hiện nhiều chức năng sinh lý trong các cơ quan khác nhau. Chính bởi điều này, IGF-I được kỳ vọng sẽ được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh. Do trình tự axit amin của IGF-I có độ tương tự cao khoảng 40% so với tiền insulin, nên IGF-I có thể liên kết với thụ thể insulin và bằng cách đó thể hiện các hiệu quả tương tự insulin (Tài liệu phi sáng chế 1). Ngoài ra, do trình tự axit amin của thụ thể IGF-I có độ tương tự cao khoảng 60% so với thụ thể insulin, các thụ thể này có thể tạo thành dimer dị thể (Tài liệu phi sáng chế 1). Insulin có thể hoạt động trên thụ thể insulin bằng cách đó thể hiện hiệu quả cao trong việc hạ mức đường huyết, và do đó được sử dụng làm thuốc hạ đường huyết.

2. Thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I (thụ thể IGF-I)

Thụ thể IGF-I là protein xuyên màng bao gồm chuỗi alpha và chuỗi beta, và có sáu miền ngoại bào (L1, CR, L2, Fn1, Fn2, và Fn3), miền xuyên màng, và miền nội bào (Tài liệu phi sáng chế 2). Miền nội bào của thụ thể IGF-I chứa kinaza tyrosin. Miền ngoại bào là miền giàu xystein (miền CR) và tham gia vào sự hoạt hóa của kinaza tyrosin nội bào được kết hợp với sự thay đổi hình dạng của thụ thể IGF-I, mà xảy ra khi IGF-I liên kết với thụ thể IGF-I. Thụ thể IGF-I tạo thành phức hợp đồng dimer (cùng loại). IGF-I liên kết với thụ thể IGF-I (cùng loại) kích hoạt việc gửi tín hiệu thông qua sự hoạt hóa của kinaza thụ thể. Thụ thể IGF-I cũng tạo thành phức hợp dimer dị thể (khác loại) với thụ thể insulin. Insulin hoặc IGF-I liên kết với thụ thể IGF-I (cùng loại) kích hoạt việc gửi tín hiệu thông qua sự hoạt hóa của kinaza thụ thể (Tài liệu phi sáng chế 3 và 4).

3. Hiệu quả sinh lý của IGF-I

IGF-I đã được chứng minh cho thấy hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng, như tăng chiều cao và cân nặng của cơ thể, và hiệu quả chuyển hóa tương tự insulin, chẳng hạn như hiệu quả tăng tốc độ chuyển hóa glucoza và hạ đường huyết. Đã phát hiện ra mecaseerin, IGF-I tái tổ hợp ở người, cải thiện các triệu chứng liên quan đến sự bất thường của thụ thể insulin, chẳng hạn như tăng đường huyết, tăng insulin trong máu, bệnh gai đen và chứng rậm lông ở phụ nữ. IGF-I cũng được chứng minh là cải thiện sự rối loạn tăng trưởng của bệnh lùn do kháng hormon tăng trưởng (Tài liệu phi sáng chế 5).

4. Hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng của IGF-I

IGF-I được biết đến trong việc tăng cường khả năng tổng hợp DNA của các tế bào sụn ở người. Ngoài ra, việc sử dụng IGF-I làm tăng trọng lượng và kéo dài

chiều dài xương đùi trong cơ thể chuột đã cắt bỏ tuyến yên (Tài liệu phi sáng chế 5).

5. Hiệu quả của IGF-I trong việc tăng khối lượng cơ

Việc tăng cường hoạt tính tăng sinh tế bào bằng IGF-I đòi hỏi sự hoạt hóa liên tục của thụ thể IGF-I (Tài liệu phi sáng chế 6). Động vật biến đổi gen để hấp thụ quá mức thụ thể IGF-I biểu hiện khối lượng cơ bắp tăng (Tài liệu phi sáng chế 7). Việc duy trì sử dụng IGF-I/IGFBP3 cho bệnh nhân bị gãy xương đùi phần trên làm tăng cường lực cầm nắm và cải thiện khả năng đứng của bệnh nhân từ tư thế ngồi mà không cần hỗ trợ (Tài liệu phi sáng chế 8). Mức IGF-I trong cơ bắp của người lớn tuổi và chuột già được biết đến là thấp hơn so với của người trẻ tuổi và chuột non (Tài liệu phi sáng chế 9 và 10). Sự biểu hiện quá mức của IGF-I đặc biệt là trong các mô cơ của chuột già đã cải thiện khối lượng cơ của chúng so với loại chuột hoang dã (Tài liệu phi sáng chế 11).

6. Các sản phẩm có trước để tăng khối lượng cơ

Anamorelin, chất chủ vận thụ thể ghrelin, làm tăng khối lượng nạc trong cơ thể thông qua thử nghiệm lâm sàng đối với hội chứng suy nhược, mà là chứng teo cơ do bất động. Tuy nhiên, nó có các tác dụng phụ như gây buồn nôn và tăng đường huyết (Tài liệu phi sáng chế 12).

Myostatin, yếu tố kiểm soát tiêu cực sự hình thành cơ xương, ảnh hưởng đến thụ thể activin loại II (ActRII) bằng cách đó ức chế Akt/mTOR (Tài liệu phi sáng chế 13 và 15). LY2495655, kháng thể kháng myostatin, làm tăng khối lượng cơ của các bệnh nhân mà đã được phẫu thuật thay thế toàn bộ khớp háng và các bệnh nhân này là người cao tuổi (Tài liệu phi sáng chế 16 và 17).

Bimagrumab, kháng thể kháng ActRII, làm tăng khối lượng cơ của bệnh nhân mắc bệnh thần kinh cơ (Tài liệu phi sáng chế 18). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có thuốc để thúc đẩy sự hình thành cơ xương và có thể sử dụng để điều trị cho đối tượng có nhu cầu.

7. Tác động hạ đường huyết của IGF-I

IGF-I được biết đến có tác động hạ đường huyết như hiệu quả tương tự insulin. IGF-I tăng cường hiệu quả hấp thụ glucoza của các tế bào có nguồn gốc từ cơ của chuột (Tài liệu phi sáng chế 5). Việc sử dụng IGF-I cũng làm giảm mức đường huyết của các con chuột (Tài liệu phi sáng chế 5).

Đã có báo cáo rằng hiệu quả giảm glucoza của IGF-I dẫn đến việc hạ đường huyết như tác dụng phụ lâm sàng (Tài liệu phi sáng chế 19). Ngoài ra, việc sử dụng IGF-I ở người dẫn đến việc hạ đường huyết. Do đó, ở giai đoạn bắt đầu của việc điều trị bằng IGF-I, điều cần thiết là duy trì sự kiểm soát liều lượng bắt đầu từ liều lượng thấp với sự xem xét nhiều nghiên cứu lâm sàng bao gồm cả mức đường huyết sau khi sử dụng (Tài liệu phi sáng chế 5).

IGF-I thể hiện tác động hạ đường huyết thông qua việc thúc đẩy sự phosphoryl hóa Akt, mà là tín hiệu ngược dòng của thụ thể IGF-I. Biến thể hoạt hóa Akt cải thiện sự hấp thụ glucoza bởi các tế bào 3T3-L1 (Tài liệu phi sáng chế 20). Mặt khác, con chuột thiếu hụt Akt2 thể hiện mức đường huyết cao (Tài liệu phi sáng chế 21). Chất ức chế Akt ngăn cản sự hấp thụ glucoza gây ra bởi insulin ở các tế bào có nguồn gốc cơ chuột (Tài liệu phi sáng chế 22). Ngoài ra, IGF-I cũng được biết đến để hoạt hóa thụ thể insulin mà đóng vai trò trong tác động hạ đường huyết. Các kết quả nghiên cứu này đề xuất tác động hạ đường huyết của IGF-I bao gồm việc hoạt hóa quá mức Akt và hoạt hóa thụ thể insulin.

8. Chu kỳ bán rã ngắn của IGF-I trong máu

IGF-I có chu kỳ bán rã ngắn trong máu, và do đó đòi hỏi việc đưa vào thường xuyên khi được sử dụng trong điều trị. Trong thực tế, mecasermin, IGF-I tái tổ hợp ở người, có chu kỳ bán rã trong máu từ khoảng 11 đến 16 giờ, và do đó nó cần được đưa vào một đến hai lần mỗi ngày trong việc điều trị bệnh lùn (Tài liệu phi sáng chế 5).

Khoảng 70% đến 80% IGF-I liên kết với IGFBP3 trong máu, trong khi dạng tự do của IGF-I thể hiện các tác dụng sinh lý. Liên kết của IGF-I với IGFBP3 duy trì chu kỳ bán rã của nó trong máu trong khoảng thời gian từ 10 giờ đến 16 giờ (Tài liệu phi sáng chế 1).

IPLEX, thuốc kết hợp của IGF-I với IGFBP3, thể hiện chu kỳ bán rã trong máu của IGF-I được kéo dài trong khoảng thời gian từ 21 giờ đến 26 giờ, và bằng cách đó cho phép giảm tần suất đưa vào xuống một lần mỗi ngày (Tài liệu phi sáng chế 23). Tuy nhiên, IPLEX đã bị rút khỏi thị trường.

Có các nỗ lực để phát triển PEGylated IGF-I với các động lực học IGF-I được cải thiện, nhưng cho đến nay chưa có thuốc nào được phát triển thành công và vấn đề này vẫn đang tồn tại (Tài liệu sáng chế 1).

9. Hiệu quả điều trị được kỳ vọng sẽ đạt được thông qua hiệu quả của IGF-I

IGF-I được biết đến là có ảnh hưởng tới nhiều cơ quan và thực hiện nhiều chức năng sinh lý khác nhau (Tài liệu phi sáng chế 19).

IGF-I được báo cáo là có hiệu quả bảo vệ thần kinh ở hệ thống thần kinh trung ương bằng việc bảo vệ ty thể và hiệu quả chống oxy hóa thông qua sự hoạt hóa của thụ thể IGF-I (Tài liệu phi sáng chế 24 và 25). IGF-I thúc đẩy sự tái tạo của các sợi trục thần kinh bị tổn thương (Tài liệu phi sáng chế 26).

IGF-I là nhân tố chính của sự thúc đẩy tăng trưởng (Tài liệu phi sáng chế 27 và 28). Trong thực tế, mecaseimerin, IGF-I tái tổ hợp ở người, về phương diện lâm sàng được sử dụng như thuốc trong việc điều trị bệnh lùn.

IGF-I có vẻ như có hiệu quả trong việc điều trị xơ gan, mà phát triển từ tổn thương gan và bệnh gan mạn tính và bao gồm chứng xơ hóa gan. Việc sử dụng IGF-I cải thiện chứng xơ hóa gan ở động vật mô hình mắc xơ gan (Tài liệu phi sáng chế 29).

IGF-I cũng được biết đến với vai trò trong sự phát triển và các chức năng của thận. IGF-I có hiệu quả bảo vệ đối với stress oxy hóa và chết tế bào theo chương trình do ngộ độc glucoza trong các tế bào gian mao mạch của thận (Tài liệu phi sáng chế 30). IGF-I được kỳ vọng làm thuốc cho việc điều trị bệnh thận.

Ví dụ về các điều kiện bệnh lý được kỳ vọng sẽ được cải thiện qua việc sử dụng IGF-I bao gồm: bệnh lùn, hội chứng Laron, xơ gan, chứng xơ hóa gan, lão hóa, ức chế tăng trưởng nội tử cung (IUGR), bệnh thần kinh, đột quỵ não, chấn thương cột sống, bảo vệ tim mạch, đái tháo đường, kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh thận, loãng xương, xơ hóa bàng quang, chữa lành vết thương, loạn dưỡng tăng trưởng cơ lực, giảm cơ gắn với AIDS, hội chứng tái phân bố chất béo gắn với HIV, bệnh Crohn, hội chứng Werner, bệnh suy giảm miễn dịch kết hợp liên quan đến giới gen X, mất thính giác, chứng chán ăn tâm thần, và bệnh vồng mạc của trẻ sinh non (Tài liệu phi sáng chế 19).

Do đó, IGF-I được kỳ vọng làm thuốc cho việc điều trị nhiều bệnh do phạm vi hiệu quả sinh lý rộng rãi của nó. Tuy nhiên, các vấn đề như tác dụng phụ hạ đường huyết và chu kỳ bán rã ngắn của IGF-I đòi hỏi việc đưa vào nhiều lần đã cản trở các ứng dụng lâm sàng của nó.

10. Các kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I

Thông thường, các công thức kháng thể có chu kỳ bán rã dài, và được chứng minh là hiệu quả khi đưa vào một đến hai lần một tháng. Mặc dù một số các kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I được báo cáo là hiệu quả trong việc hoạt hóa thụ thể in vitro, không có kháng thể nào được báo cáo là thể hiện hoạt tính chủ vận đối với thụ thể IGF-I in vivo (Tài liệu phi sáng chế 31 đến 35).

Cụ thể, các kháng thể 3B7 và 2D1 tăng cường sự tổng hợp DNA tế bào in vitro (Tài liệu phi sáng chế 32).

Các kháng thể 11A1, 11A4, 11A11, và 24-57 tăng cường sự phosphoryl hóa tyrosin của thụ thể IGF-I in vitro (Tài liệu phi sáng chế 33).

Các kháng thể 16-13, 17-69, 24-57, 24-60, 24-31, và 26-3 được chứng minh là hiệu quả trong việc thúc đẩy sự tổng hợp DNA tế bào và hấp thụ glucoza in vitro, và có tiềm năng thể hiện tác động hạ đường huyết (Tài liệu phi sáng chế 34 và 35).

Tuy nhiên, không có kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I nào được báo cáo là thể hiện các hiệu quả tăng sinh tế bào trong thí nghiệm in vitro bằng việc sử dụng các tế bào nuôi cấy nguyên thủy, không kể các tế bào khác, các nguyên bào cơ ở người, dẫn đến hiệu quả gia tăng khối lượng cơ đơn in vivo.

11. Các kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I

Đã có các thử nghiệm sử dụng kháng thể mà liên kết với thụ thể IGF-I cho việc điều trị các bệnh ác tính, dựa trên hiệu quả đối vận của IGF-I trong việc ngăn cản sự liên kết IGF-I với thụ thể IGF-I. Tuy nhiên, các kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I hiện nay có nhiều tác dụng phụ như tăng đường huyết trong việc điều trị bằng một loại thuốc (Tài liệu phi sáng chế 36), và thể hiện tăng đường huyết

khi được sử dụng kết hợp với các chất chống ung thư khác (Tài liệu phi sáng chế 37). Theo đó, các ứng dụng điều trị của IGF-I được kỳ vọng sẽ được giới hạn.

Danh sách trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[Tài liệu sáng chế 1] JP2011-518778A

Tài liệu phi sáng chế

[Tài liệu phi sáng chế 1] Ohlsson, C., et al., The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev*, 2009. 30(5): trang 494-535.

[Tài liệu phi sáng chế 2] Kavran, J.M., et al., How IGF-I activates its receptor. *Elife*, 2014. 3.

[Tài liệu phi sáng chế 3] Bailyes, E.M., et al., Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J*, 1997. 327 (Pt 1): trang 209-215.

[Tài liệu phi sáng chế 4] Pandini, G., et al., Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*, 2002. 277(42): trang 39684-39695.

[Tài liệu phi sáng chế 5] OrphanPacific, IF. 2015.

[Tài liệu phi sáng chế 6] Fukushima, T., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity bound to insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, which is continuously sustained by IGF-I stimulation, is required for IGF-I-induced cell proliferation. *J Biol Chem*, 2012. 287(35): trang 29713-29721.

[Tài liệu phi sáng chế 7] Schiaffino, S. and C. Mammucari, Regulation of skeletal muscle growth by the IGF-I-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle*, 2011. 1(1): trang 4.

[Tài liệu phi sáng chế 8] Boonen, S., et al., Musculoskeletal effects of the recombinant human IGF-I/IGF binding protein-3 complex in osteoporotic patients with proximal femoral fracture: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(4): trang 1593-1599.

[Tài liệu phi sáng chế 9] Barton-Davis, E.R., et al., Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(26): trang 15603-15607.

[Tài liệu phi sáng chế 10] Lamberts, S.W., A.W. van den Beld, and A.J. van der Lely, The endocrinology of aging. *Science*, 1997. 278(5337): trang 419-424.

[Tài liệu phi sáng chế 11] Musaro, A., et al., Localized IGF-I transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*, 2001. 27(2): trang 195-200.

[Tài liệu phi sáng chế 12] Temel, J.S., et al., Anamorelin in patients with non-small-cell lung cancer and cachexia (ROMANA 1 and ROMANA 2): results from two randomized, double-blind, phase 3 trials. *Lancet Oncol*, 2016. 17(4): trang 519-531.

[Tài liệu phi sáng chế 13] Glass, D.J., Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. 13(3): trang 225-229.

[Tài liệu phi sáng chế 14] Lee, S.J. and A.C. McPherron, Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(16): trang 9306-11.

[Tài liệu phi sáng chế 15] Amirouche, A., et al., Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*, 2009. 150(1): trang 286-294.

[Tài liệu phi sáng chế 16] Woodhouse, L., et al., A Phase 2 Randomized Study Investigating the Efficacy and Safety of Myostatin Antibody LY2495655 versus Placebo in Patients Undergoing Elective Total Hip Arthroplasty. *J Frailty Aging*, 2016.5(1): trang 62-70.

[Tài liệu phi sáng chế 17] Becker, C., et al., Myostatin antibody (LY2495655) in older weak fallers: a proof-of-concept, randomized, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015. 3(12): trang 948-57.

[Tài liệu phi sáng chế 18] Amato, A.A., et al., Treatment of sporadic inclusion body myositis with bimagrumab. *Neurology*, 2014. 83(24): trang 2239-2246.

[Tài liệu phi sáng chế 19] Puche, J.E. and I. Castilla-Cortazar, Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med*, 2012. 10: trang 224.

[Tài liệu phi sáng chế 20] Kohn, A.D., et al., Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*, 1996. 271(49): trang. 31372-31378.

[Tài liệu phi sáng chế 21] Cho, H., et al., Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 2001. 292(5522): trang 1728-1731.

[Tài liệu phi sáng chế 22] Green, C.J., et al., Use of Akt inhibitor and a drug-resistant mutant validates a critical role for protein kinase B/Akt in the insulin-dependent regulation of glucose and system A amino acid uptake. *J Biol Chem*, 2008. 283(41): trang. 27653-27667.

[Tài liệu phi sáng chế 23] Submission for marketing application to FDA, APPLICATION NUMBER, 21-884

[Tài liệu phi sáng chế 24] Garcia-Fernandez, M., et al., Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology*, 2008. 149(5): trang 2433-2442.

[Tài liệu phi sáng chế 25] Puche, J.E., et al., Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology*, 2008. 149(5): trang 2620-2627.

[Tài liệu phi sáng chế 26] Joseph D'Ercole, A. and P. Ye, Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology*, 2008. 149(12): trang 5958-5962.

[Tài liệu phi sáng chế 27] Abuzzahab, M.J., et al., IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med*, 2003. 349(23): trang 2211-2222.

[Tài liệu phi sáng chế 28] Woods, K.A., et al., Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*, 1996. 335(18): trang 1363-1367.

[Tài liệu phi sáng chế 29] Perez, R., et al., Mitochondrial protection by low doses of insulin-like growth factor- I in experimental cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(17): trang 2731-2739.

[Tài liệu phi sáng chế 30] Kang, B.P., et al., IGF-I inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. 285(5): trang F1013-F1024.

[Tài liệu phi sáng chế 31] Bhaskar, V., et al., A fully human, allosteric monoclonal antibody that activates the insulin receptor and improves glycemic control. *Diabetes*, 2012. 61(5): trang 1263-1271.

[Tài liệu phi sáng chế 32] Xiong, L., et al., Growth-stimulatory monoclonal antibodies against human insulin-like growth factor I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(12): trang 5356-5360.

[Tài liệu phi sáng chế 33] Runnels, H.A., et al., Human monoclonal antibodies to the insulin-like growth factor 1 receptor inhibit receptor activation and tumor growth in preclinical studies. *Adv Ther*, 2010. 27(7): trang 458-475.

[Tài liệu phi sáng chế 34] Soos, M.A., et al., A panel of monoclonal antibodies for the type I insulin-like growth factor receptor. Epitope mapping, effects on ligand binding, and biological activity. *J Biol Chem*, 1992. 267(18): trang 12955-12963.

[Tài liệu phi sáng chế 35] Kato, H., et al., Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem*, 1993. 268(4): p. 2655-2661.

[Tài liệu phi sáng chế 36] Atzori, F., et al., A Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Dalotuzumab (MK-0646), an Anti-Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Monoclonal Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.*, 2011.17(19): trang 6304-6312.

[Tài liệu phi sáng chế 37] de Bono J.S., et al., Phase II randomized study of figitumumab plus docetaxel and docetaxel alone with crossover for metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res., 2014.20(7): trang 1925-1934.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó mà có liên kết riêng biệt với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất kháng thể làm tăng khối lượng cơ thông qua thụ thể IGF-I trong khi không giảm mức đường huyết.

Giải pháp cho vấn đề

Sáng chế này liên quan đến các vấn đề sau đây:

Điểm [1]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó chứa:

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 1, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 1 thông qua việc thế một gốc axit amin, làm trình tự CDR-1 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H1);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 2 thông qua việc thế một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-2 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H2);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3 thông qua việc thể một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H3);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4 thông qua việc thể một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L1);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5 thông qua việc thể một gốc axit amin, làm trình tự CDR-2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L2); và

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6 thông qua việc thể một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L3);

trong đó kháng thể, đoạn hoặc dẫn xuất của nó liên kết riêng biệt với miền ngoại bào của SEQ ID NO: 14 (thụ thể IGF-I ở người).

Điểm [2]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm [1], chứa:

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7 thông qua việc thể, loại bỏ, hoặc thêm một hoặc nhiều gốc axit amin, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng; và

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8 thông qua việc thế, loại bỏ, hoặc thêm một hoặc nhiều gốc axit amin, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Điểm [3]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm [1] hoặc [2], chứa:

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng; và

trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, và 12, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Điểm [4]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [3], chứa:

các vùng hằng định của mỗi lớp globulin miễn dịch ở người, làm các vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Điểm [5]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm [4], trong đó vùng hằng định chuỗi nặng là vùng hằng định chuỗi nặng của IgG ở người lớp 4.

Điểm [6]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [5], mà liên kết với epitop chứa peptit mà có trình tự axit amin tương ứng với các gốc axit amin số 308 đến 319 (ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet) của SEQ ID NO: 14 (thụ thể IGF-I ở người) hoặc vùng trong vùng phụ cận của nó.

Điểm [7]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [6], mà khi được

đưa vào ở liều lượng đủ để gây ra sự tăng sinh của các nguyên bào cơ được nuôi cấy có nguồn gốc từ người hoặc chuột lang, không gây ra sự hấp thụ glucoza của các tế bào được nuôi cấy.

Điểm [8]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [7], mà khi được đưa vào động vật có xương sống ở liều lượng đủ để gây ra sự tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể của động vật có xương sống, không làm giảm mức đường huyết của động vật có xương sống.

Điểm [9]: Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm [8], mà khi được đưa vào động vật có xương sống ở mức độ phơi nhiễm trong máu là 10 lần hoặc cao hơn liều lượng đủ để gây ra sự tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể của động vật có xương sống, không làm giảm mức đường huyết của động vật có xương sống.

Điểm [10]: Phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit mã hóa kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [9].

Điểm [11]: Vector tách dòng hoặc vector biểu hiện mà có ít nhất một phân tử axit nucleic theo điểm [10].

Điểm [12]: Tế bào tái tổ hợp được dẫn xuất bằng việc đưa vector theo điểm [11] vào tế bào chủ.

Điểm [13]: Quy trình sản xuất kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [9], bao gồm:

nuôi cấy tế bào tái tổ hợp theo điểm [12]; và

tinh chế kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó được tạo ra từ tế bào tái tổ hợp.

Điểm [14]: Dược phẩm chứa kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [9], phân tử axit nucleic theo điểm [10], vector theo điểm [11], hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm [12] làm thành phần hoạt tính.

Điểm [15]: Dược phẩm theo điểm [14] để sử dụng trong việc điều trị bệnh teo cơ hoặc bệnh lùn.

Điểm [16]: Dược phẩm theo điểm [15], trong đó bệnh teo cơ là bệnh teo cơ do bất động, chứng giảm cơ, hoặc hội chứng suy giảm sức khỏe.

Điểm [17]: Dược phẩm theo điểm [15], trong đó bệnh lùn là bệnh lùn Laron hoặc bệnh lùn do kháng hormon tăng trưởng.

Hiệu quả của sáng chế

Kháng thể hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có hiệu quả liên kết riêng biệt với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa các trình tự axit amin theo hàng của các miền CR của các thụ thể IGF-I của chuột nhắt, chuột to, người, chuột lang và thỏ, trong đó các trình tự axit amin này được biểu thị bằng việc sử dụng mã một chữ cái;

Fig. 2 là biểu đồ biểu thị trọng lượng của các cơ đuôi dài các chân ở chuột lang mà nhận sự đưa vào liên tục IGF-I bằng bơm thẩm thấu hoặc đưa vào tĩnh mạch liều đơn của kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I R11-16B trong hai tuần sau khi đưa vào;

Fig. 3 là biểu đồ biểu thị động lực học máu của IGF-I ở chuột lang trong điều kiện nhịn ăn sau khi đưa vào dưới da liều đơn; và

Fig. 4 là biểu đồ biểu thị động lực học máu của kháng thể được nhân hóa R11-16B kháng thụ thể IGF-I ở chuột lang trong điều kiện nhịn ăn trong thời gian sau khi đưa vào tĩnh mạch liều đơn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần mô tả sau đây, sáng chế sẽ được mô tả với tham chiếu tới các phương án cụ thể, mặc dù sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án này theo bất kỳ cách nào. Tất cả tài liệu được trích dẫn trong sáng chế, bao gồm các công bố sáng chế, các công bố đơn đăng ký sáng chế chưa thẩm định, và các tài liệu phi sáng chế, được kết hợp tại bản mô tả này bằng việc tham chiếu đến toàn bộ nội dung của chúng cho tất cả các mục đích.

Trong phần mô tả này, IGF đề cập đến yếu tố tăng trưởng tương tự insulin, mà có thể là IGF-I hoặc IGF-II. Cả IGF-I và IGF-II đều là các phối tử sinh học có các hoạt tính chủ vận mà liên kết với thụ thể IGF-I (thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I) và chuyển đổi các tín hiệu chẳng hạn như sự phân chia tế bào và chuyển hóa thành tế bào. IGF-I và IGF-II được biết đến là có ái lực liên kết chéo với thụ thể insulin (INSR), mà tương tự về mặt cấu trúc với thụ thể IGF-I. Bản mô tả sáng chế sẽ đề cập chủ yếu đến IGF-I, do các đặc tính của nó như là các chức năng sinh lý được biết đến nhiều hơn so với IGF-II. Tuy nhiên, trong khi đề cập đến nhiều hiệu quả và bệnh lý trung gian thông qua sự liên kết của phối tử với thụ thể IGF-I, cả IGF-I và IGF-II có thể được đề cập chung.

IGF-I, còn được gọi là somatomedin C, là hormon polypeptit đơn chứa 70 axit amin. Trình tự IGF-I ở người có sẵn, ví dụ, trên EMBL-EBI với số nhận biết

riêng biệt UniProtKB P50919. Trình tự axit amin của IGF-I trưởng thành được minh họa trong SEQ ID NO:13 của trình tự liệt kê được đính kèm theo đây. Trình tự này chứa 70 axit amin được bảo tồn trong nhiều loài. Trong sáng chế này, thuật ngữ “IGF-I” không có bất kỳ giới hạn nào có nghĩa là protein IGF-I mà có hoạt tính hormon như vậy, trừ khi được định nghĩa khác.

IGF-I được sản xuất bởi nhiều tế bào trong cơ thể sống, bao gồm các tế bào gan, và tồn tại trong máu và các dịch cơ thể khác. Do đó, IGF-I thuần chủng có thể thu được thông qua sự tinh chế từ dịch cơ thể động vật hoặc từ tế bào được nuôi cấy nguyên thủy hoặc dòng tế bào được nuôi cấy có nguồn gốc từ động vật. Do hormon tăng trưởng gây ra sự sản xuất IGF-I bởi các tế bào, IGF-I cũng có thể được tinh chế từ dịch cơ thể động vật mà hormon tăng trưởng được đưa vào, hoặc từ tế bào động vật được nuôi cấy nguyên thủy hoặc dòng tế bào động vật được nuôi cấy trong sự hiện hữu của hormon tăng trưởng. Như một phương pháp khác, IGF-I cũng có thể thu được từ tế bào tái tổ hợp mà được sản xuất từ việc chuyển nhiễm vector biểu hiện mang phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của IGF-I vào vật chủ như là sinh vật không nhân (ví dụ, *E. coli*) hoặc tế bào có nhân bao gồm men, tế bào côn trùng, hoặc tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú được nuôi cấy, hoặc từ động vật biến đổi gen hoặc thực vật biến đổi gen mà trong đó gen IGF-I đã được chuyển nhiễm. IGF-I ở người cũng có sẵn như thuốc thử nghiên cứu (Enzo Life Sciences, danh mục: ADI-908-059-0100, Abnova, danh mục: P3452, v.v.) hoặc như dược phẩm (Somazon® mecasermin, INCRELEX®, v.v.). Các hoạt tính in vivo và in vitro của IGF-I để sử dụng có thể được đánh giá như các hoạt tính riêng biệt liên quan đến chất tiêu chuẩn IGF-I theo mã NIBSC: 91/554, chất mà có hoạt tính tương ứng một đơn vị/micrôgam quốc tế. Chất tiêu chuẩn này có sẵn từ Viện quốc gia về sinh học tiêu chuẩn và kiểm soát của Tổ

chức Y tế Thế giới (NIBSC). Trong nội dung sáng chế, IGF-I được xem là có hoạt tính riêng biệt tương đương với IGF-I có mã NIBSC: 91/554.

Thụ thể IGF-I

Trong sáng chế, thuật ngữ “thụ thể IGF-I” đề cập đến yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I. Thuật ngữ “thụ thể IGF-I” được sử dụng ở đây có nghĩa là protein thụ thể IGF-I, trừ khi được định nghĩa khác. Thụ thể IGF-I là protein được tạo thành từ hai phân tử protein đơn, mỗi phân tử này chứa chuỗi alpha và chuỗi beta. Trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người được biểu thị trong SEQ ID NO:14, trong đó trình tự con chứa các gốc axit amin thứ 31 đến 735 biểu thị chuỗi alpha, trong khi trình tự con bắt đầu từ gốc axit amin thứ 740 biểu thị chuỗi beta. Chuỗi alpha của thụ thể IGF-I có một phần mà liên kết với IGF-I, trong khi chuỗi beta có cấu trúc xuyên màng và thể hiện chức năng truyền tín hiệu vào tế bào. Chuỗi alpha của thụ thể IGF-I có thể được chia thành các miền L1, CR, L2, FnIII-1, và FnIII-2a/ID/FnIII-2b. Theo trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người được xác định trong SEQ ID NO:14, các gốc thứ 31 đến 179 tương ứng với miền L1, các gốc thứ 180 đến 328 tương ứng với miền CR, các gốc thứ 329 đến 491 tương ứng với miền L2, các gốc thứ 492 đến 607 tương ứng với miền FnIII-1, và các gốc thứ 608 đến 735 tương ứng với miền FnIII-2a/ID/FnIII-2b. Trong số chúng, miền CR (giàu xystein) liên quan đến sự hoạt hóa kinaza tyrosin nội bào trong chuỗi beta, chuỗi mà được kết hợp với sự thay đổi hình dạng của thụ thể IGF-I xảy ra khi IGF-I liên kết với thụ thể. Trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người có sẵn, ví dụ, trên EMBL-EBI với số nhận biết riêng biệt UniProtKB P08069, và cũng được biểu thị trong trình tự liệt kê là SEQ ID NO:14.

Thụ thể IGF-I được biết đến là được biểu hiện trong phạm vi rộng các mô và các tế bào trong cơ thể sống, và nhận nhiều nhân tố kích thích thông qua IGF-I,

như sự cảm ứng tăng sinh tế bào và sự hoạt hóa của các tín hiệu nội bào. Cụ thể, các hiệu quả của IGF-I trên các nguyên bào cơ thông qua thụ thể IGF-I có thể được đánh giá bằng việc sử dụng các hoạt tính tăng sinh tế bào làm các chỉ thị. Vì lý do này, các nguyên bào cơ hữu ích trong việc phân tích hiệu quả của các kháng thể liên kết với thụ thể IGF-I. Các tế bào biểu thị thụ thể IGF-I có nguồn gốc từ người hoặc bất kỳ động vật có xương sống nào khác có thể được sản xuất nhân tạo, bằng sự chuyển nhiễm vector biểu hiện mang phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của thụ thể IGF-I có nguồn gốc từ người hoặc bất kỳ động vật có xương sống nào khác thành tế bào chủ có nhân hoàn chỉnh, chẳng hạn như tế bào côn trùng được nuôi cấy hoặc tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú, để sản xuất tế bào tái tổ hợp biểu thị thụ thể IGF-I được mã hóa bởi axit nucleic đã chuyển nhiễm trên màng tế bào của nó. Tế bào thu được biểu thị thụ thể IGF-I có thể được sử dụng cho việc phân tích khả năng liên kết và khả năng truyền tín hiệu nội bào của các kháng thể.

Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I

Sáng chế đề xuất kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I mới (sau đây được gọi là “kháng thể của sáng chế” nếu phù hợp).

Trong sáng chế này, thuật ngữ “kháng thể” biểu thị glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) bắt cặp với nhau thông qua các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi chuỗi nặng (gọi tắt là VH) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng chứa ba miền, đó là, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (gọi tắt là VL) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ có một miền, đó là CL. Có hai loại vùng hằng định chuỗi nhẹ, đó là, chuỗi λ (lambda) và chuỗi κ (kappa). Vùng hằng định chuỗi nặng được phân loại thành chuỗi γ (gamma), chuỗi μ (mu), chuỗi α

(alpha), chuỗi δ (delta) và chuỗi ϵ (epsilon), và các loại khác nhau của vùng hằng định chuỗi nặng dẫn đến các lớp khác nhau của các kháng thể tương ứng, đó là, IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE. Mỗi vùng VH và VL cũng được chia thành bốn vùng bảo tồn tương đối (FR-1, FR-2, FR-3, và FR-4), được đề cập chung là các vùng khuôn (FR), và ba vùng siêu biến (CDR-1, CDR-2, và CDR-3), được đề cập chung là các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR). Vùng VH bao gồm ba vùng CRD và bốn vùng FR được sắp xếp theo thứ tự FR-1, CDR-1 (CDR-H1), FR-2, CDR-2 (CDR-H2), FR-3, CDR-3 (CDR-H3), và FR-4 từ đầu cuối amino đến đầu cuối cacboxyl. Vùng VL bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR được sắp xếp theo thứ tự FR-1, CDR-1 (CDR-L1), FR-2, CDR-2 (CDR-L2), FR-3, CDR-3 (CDR-L3), và FR-4 từ đầu cuối amino đến đầu cuối cacboxyl. Vùng biến đổi của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm miền liên kết, mà tiếp xúc với kháng nguyên.

Kháng thể của sáng chế có thể là đoạn và/hoặc dẫn xuất của kháng thể. Các ví dụ của các đoạn kháng thể bao gồm F(ab')₂, Fab, và Fv. Các ví dụ của các dẫn xuất kháng thể bao gồm: các kháng thể mà trong đó sự đột biến axit amin được gây ra ở vùng hằng định của nó; các kháng thể mà trong đó thứ tự miền của các vùng hằng định được điều chỉnh; các kháng thể có hai hoặc nhiều Fc's trên phân tử; các kháng thể chỉ gồm chuỗi nặng hoặc chỉ gồm chuỗi nhẹ; các kháng thể với sự glycosyl hóa được điều chỉnh; các kháng thể đồng đặc hiệu; dung dịch cộng hợp của các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể với các hợp chất hoặc các protein khác ngoài kháng thể; các enzym kháng thể; các kháng thể đơn miền; kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp kép (tandem scFv's); kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp kép đồng đặc hiệu (bispecific tandem scFv's); các kháng thể đơn dòng; và các kháng thể VHH. Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng ở đây bao hàm các đoạn kháng thể

và/hoặc các dẫn xuất của các kháng thể như vậy, trừ trường hợp được định nghĩa khác.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “phản ứng kháng nguyên-kháng thể” được sử dụng ở đây có nghĩa là kháng thể liên kết với thụ thể IGF-I với ái lực được biểu thị bằng hằng số phân ly cân bằng (KD) là $1 \times 10^{-7} \text{M}$ hoặc thấp hơn. Kháng thể của sáng chế tốt hơn là liên kết với thụ thể IGF-I với KD thông thường là $1 \times 10^{-5} \text{M}$ hoặc thấp hơn, cụ thể là $1 \times 10^{-6} \text{M}$ hoặc thấp hơn, cụ thể hơn nữa là $1 \times 10^{-7} \text{M}$ hoặc thấp hơn.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “tính đặc hiệu” của kháng thể đối với kháng nguyên nghĩa là phản ứng kháng nguyên-kháng thể cao xảy ra giữa kháng thể và kháng nguyên. Trong nội dung của sáng chế, thuật ngữ “kháng thể thụ thể IGF-I đặc hiệu” có nghĩa là kháng thể mà, khi được sử dụng ở nồng độ hiệu quả để gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể một cách đáng kể với các tế bào biểu thị thụ thể IGF-I, gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với INSR ở độ phản ứng là 1,5 lần hoặc thấp hơn độ phản ứng với tế bào Mock. INSR có sự tương tự cao với thụ thể IGF-I trong cấu trúc ban đầu (trình tự axit amin) và cấu trúc bậc cao.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện việc đo phản ứng kháng nguyên-kháng thể bằng việc chọn xét nghiệm liên kết thích hợp trong hệ thống pha chất rắn hoặc pha chất lỏng. Ví dụ của các xét nghiệm như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi: xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzym (ELISA), xét nghiệm miễn dịch enzym pha rắn (EIA), hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET), truyền năng lượng cộng hưởng phát quang (LRET). Việc đo ái lực liên kết kháng nguyên-kháng thể có thể được thực hiện bằng, ví dụ, việc phân lớp kháng thể và/hoặc kháng nguyên với, ví dụ, enzym, chất huỳnh quang, chất phát

quang, hoặc chất đồng vị phóng xạ, và việc phát hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể bằng việc sử dụng phương pháp thích hợp để đo lường các đặc tính vật lý và/hoặc hóa học của lớp được sử dụng.

Bằng việc liên kết với miền CR của thụ thể IGF-I, kháng thể của sáng chế hoạt hóa thụ thể cùng loại, mà trong đó thụ thể IGF-I tạo thành dimer, hoặc thụ thể khác loại, mà trong đó thụ thể IGF-I và INSR tạo thành dimer.

Kháng thể của sáng chế tốt hơn nên có các trình tự axit amin riêng biệt như các trình tự CDR, như sẽ được mô tả chi tiết dưới đây. Trong nội dung sáng chế, thuật ngữ “tính đồng nhất” của các trình tự axit amin được sử dụng ở đây nghĩa là tỷ lệ của các gốc axit amin trùng nhau giữa các trình tự này, trong khi thuật ngữ “tính tương tự” của các trình tự axit amin ở đây có nghĩa là tỷ lệ của các gốc axit amin trùng nhau hoặc tương tự nhau giữa các trình tự này. Tính tương tự và tính đồng nhất của các trình tự axit amin có thể được xác định, ví dụ, bằng việc sử dụng phương pháp BLAST (với các điều kiện mặc định của PBLAST như được cung cấp bởi NCBI).

Thuật ngữ “các gốc axit amin tương tự” được sử dụng ở đây nghĩa là nhóm các gốc axit amin có các chuỗi bên với các đặc tính hóa học tương tự (ví dụ, tích điện hoặc kỵ nước). Các nhóm của các gốc axit amin tương tự bao gồm:

- 1) các gốc axit amin có các chuỗi bên béo: các gốc glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin;
- 2) các gốc axit amin có các chuỗi bên hydroxyl béo: các gốc serin và threonin;
- 3) các gốc axit amin có các chuỗi bên chứa amit: các gốc asparagin và glutamin;

4) các gốc axit amin có các chuỗi bên thơm: các gốc phenylalanin, tyrosin, và tryptophan;

5) các gốc axit amin có các chuỗi bên cơ bản: các gốc lysin, arginin, và histidin;

6) các gốc axit amin có các chuỗi bên có tính axit: các gốc axit aspartic và axit glutamic; và

7) các gốc axit amin có các chuỗi bên chứa lưu huỳnh: các gốc cystein và methionin.

Theo sáng chế, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-1 (CDR-H1) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 1 (SerTyrTrpMetHis) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 1 thông qua việc thế gốc axit amin tại một vị trí bất kỳ. Ngoài ra, trình tự CDR-H1 trong vùng biến đổi chuỗi nặng tốt hơn có 80% hoặc cao hơn sự tương đồng (tốt hơn là tính đồng nhất) với SEQ ID NO: 1.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-2 (CDR-H2) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 2 (GluThrAsnProSerAsnSerValThrAsnTyrAsnGluLysPheLysSer) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 2 thông qua việc thế một hoặc nhiều gốc axit amin tại một hoặc hai vị trí bất kỳ. Ngoài ra, trình tự CDR-H2 trong vùng biến đổi chuỗi nặng tốt hơn có 88% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 94% sự tương đồng (tốt nhất là tính đồng nhất) với SEQ ID NO:2.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-3 (CDR-H3) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3 (GlyArgGlyArgGlyPheAlaTyr) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 3 thông qua việc thế một hoặc

nhiều gốc axit amin tại một hoặc hai vị trí bất kỳ. Ngoài ra, trình tự CDR-H3 này trong vùng biến đổi chuỗi nặng tốt hơn có 75% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 87% sự tương đồng (tốt nhất là tính đồng nhất) với SEQ ID NO: 3.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-1 (CDR-L1) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4 (ArgAlaSerGlnAsnIleAsnPheTrpLeuSer) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 4 thông qua việc thế một hoặc nhiều gốc axit amin tại một hoặc hai vị trí bất kỳ. Ngoài ra, trình tự CDR-L1 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ tốt hơn có 81% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 90% hoặc cao hơn sự tương đồng (tốt nhất là tính đồng nhất) với SEQ ID NO: 4.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-2 (CDR-L2) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5 (LysAlaSerAsnLeuHisThr) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 5 thông qua việc thế gốc axit amin tại một vị trí bất kỳ. Ngoài ra, trình tự CDR-L2 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ tốt hơn có 85% hoặc cao hơn sự tương đồng (tốt hơn nữa là tính đồng nhất) với SEQ ID NO: 5.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-3 (CDR-L3) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6 (LeuGlnGlyGlnSerTyrProTyrThr) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 6 thông qua việc thế một hoặc nhiều gốc axit amin tại một hoặc hai vị trí bất kỳ. Ngoài ra, trình tự CDR-L3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ tốt hơn có 77% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 88% hoặc cao hơn sự tương đồng (tốt nhất là tính đồng nhất) với SEQ ID NO: 6.

Cụ thể, kháng thể của sáng chế tốt hơn có sự kết hợp của các trình tự CDR sau đây: trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 làm trình tự CDR-H1; trình tự axit

amin của SEQ ID NO: 2 làm trình tự CDR-H2; trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 làm trình tự CDR-H3; trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 làm trình tự CDR-L1; trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 làm trình tự của CDR-L2; và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 làm trình tự CDR-L3.

Các ví dụ của phương pháp xác định mỗi trình tự của CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, hoặc CDR-L3 trong kháng thể bao gồm phương pháp Kabat (Kabat et al., *The Journal of Immunology*, 1991, tập 147, số 5, trang 1709-1719) và phương pháp Chothia (Al-Lazikani et al., *Journal of Molecular Biology*, 1997, tập 273, số 4, trang 927-948). Các phương pháp này phổ biến về mặt công nghệ đối với người có trình độ hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, và tóm lược của chúng có sẵn, ví dụ, trên trang thông tin điện tử của Dr. Andrew C.R. Martin's Group (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

Trình tự khuôn của globulin miễn dịch, mà là kháng thể của sáng chế, tốt hơn là trình tự khuôn trong mỗi lớp globulin miễn dịch ở người.

Vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong kháng thể của sáng chế tốt hơn là có các trình tự axit amin riêng biệt, như được mô tả chi tiết dưới đây. Trong sáng chế này, cụm từ “một hoặc nhiều vị trí” biểu thị một vị trí, hai vị trí, ba vị trí, bốn vị trí, năm vị trí, sáu vị trí, bảy vị trí, tám vị trí, chín vị trí, hoặc mười vị trí trừ khi được chỉ ra khác.

Vùng biến đổi chuỗi nặng trong kháng thể của sáng chế này tốt hơn là có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7, trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 7 thông qua việc thế một hoặc nhiều gốc axit amin tại một hoặc nhiều vị trí, hoặc trình tự axit amin mà có 90% hoặc cao hơn sự tương đồng (tốt hơn là tính đồng nhất) với SEQ ID NO: 7. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong

kháng thể của sáng chế này tốt hơn là có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8, trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 8 thông qua việc thế một hoặc nhiều gốc axit amin tại một hoặc nhiều vị trí, hoặc trình tự axit amin mà có 90% hoặc cao hơn sự tương đồng (tốt hơn là tính đồng nhất) với SEQ ID NO: 8.

Cụ thể, kháng thể của sáng chế này tốt hơn là có SEQ ID NO: 7 làm vùng biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 7 làm vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc các trình tự gồm trình tự axit amin trong đó Tyr được thay thế bằng Ala, Ser, Phe hoặc Cys tại vị trí 36 (số Kabat: L36) của SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, một cách tương ứng).

Trình tự axit amin của mỗi vùng khuôn và/hoặc mỗi vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong kháng thể của sáng chế có thể được chọn từ, ví dụ, các lớp IgG, IgA, IgM, IgE, và IgD ở người và các biến thể của chúng. Một ví dụ của vùng hằng định chuỗi nặng trong kháng thể của sáng chế là vùng hằng định chuỗi nặng của IgG4 ở người.

Epitop của kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I

Kháng thể của sáng chế sử dụng miền CR của thụ thể IGF-I làm epitop. Kháng thể của sáng chế tốt hơn là liên kết với hoặc với vùng phụ cận của epitop bao gồm peptit mà có trình tự axit amin tương ứng với axit amin số 308 đến 319 (ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet) của SEQ ID NO: 14 (thụ thể IGF-I ở người). Kháng thể của sáng chế tốt hơn là liên kết với miền CR này của thụ thể IGF-I và bằng cách đó hoạt hóa thụ thể cùng loại mà trong đó thụ thể IGF-I tạo thành dimer hoặc thụ thể khác loại mà trong đó thụ thể IGF-I và INSR tạo thành dimer. Cần lưu ý rằng kháng thể chất chủ vận của sáng chế được mô tả sau (nghĩa

là, kháng thể của sáng chế là kháng thể chất chủ vận) không có ái lực với INSR mà có sự tương tự cao với cấu trúc ban đầu (trình tự axit amin) và cấu trúc cao hơn của thụ thể IGF-I.

Kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I và kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I

Kháng thể của sáng chế bao gồm cả kháng thể chất chủ vận và kháng thể chất đối vận (sau đây, kháng thể chất chủ vận và kháng thể chất đối vận của sáng chế sẽ được đề cập tương ứng là “kháng thể chất chủ vận sáng chế” và “kháng thể chất đối vận sáng chế”). Kháng thể chất chủ vận sáng chế có hiệu quả tăng cường hoạt động tăng sinh trên các nguyên bào cơ bởi IGF-I khi sử dụng độc lập. Mặt khác, kháng thể chất đối vận sáng chế có hiệu quả ngăn chặn hoạt động tăng sinh trên các nguyên bào cơ bởi IGF-I khi được sử dụng kết hợp với IGF-I.

Kháng thể chất chủ vận sáng chế tốt hơn là lớp IgG ở người hoặc biến thể của nó, tốt hơn nữa là lớp phụ IgG4 ở người hoặc biến thể của nó hoặc lớp phụ IgG1 ở người hoặc biến thể của nó. Theo một ví dụ, vùng hằng định IgG4 đã ổn định bao gồm prolin ở vị trí 241 trong vùng bản lề theo hệ đếm Kabat. Vị trí này tương ứng với vị trí 228 trong vùng bản lề theo hệ đếm châu Âu (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, DIANE Publishing, 1992, Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 63, 78-85, 1969). Gốc tại vị trí này trong IgG4 ở người thường là serin, và sự thay thế serin bằng prolin có thể dẫn đến sự ổn định. Theo ví dụ khác, sự hợp nhất của đột biến N297A vào vùng hằng định của IgG1 giúp giảm thiểu khả năng liên kết với thụ thể Fc và/hoặc cố định phần bổ sung.

Kháng thể chất chủ vận sáng chế liên kết mạnh với miền đặc hiệu của thụ thể IGF-I và có hiệu quả tăng cường hoạt động tăng sinh in vitro trên các nguyên bào cơ.

Ngoài ra, kháng thể chất chủ vận sáng chế được đặc trưng bởi không có tác dụng tăng cường hấp thụ glucoza in vitro thành tế bào cơ đã biệt hóa. Cụ thể, kháng thể chất chủ vận sáng chế không có hiệu quả tăng cường hấp thụ glucoza in vitro thành các tế bào cơ đã biệt hóa được nuôi cấy ở nồng độ hiệu quả để tăng cường hoạt động tăng sinh trên các nguyên bào cơ (ví dụ, các nguyên bào cơ có nguồn gốc từ người hoặc chuột lang), tốt hơn là ở nồng độ cao hơn 10 lần, hoặc tốt hơn nữa là ở nồng độ cao hơn 100 lần so với nồng độ hiệu quả.

Kháng thể chất chủ vận sáng chế không có tác dụng làm giảm đường huyết ở liều lượng mà thể hiện hiệu quả tăng khối lượng cơ. IGF-I có tác dụng làm giảm đường huyết đáng kể trong trường hợp đưa vào liều lượng mà thể hiện tác dụng tăng khối lượng cơ. Tuy nhiên, kháng thể chất chủ vận sáng chế không có tác dụng làm giảm mức đường huyết ở động vật có xương sống ở liều lượng làm tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể của động vật có xương sống. Kháng thể chất chủ vận sáng chế tốt hơn không có tác dụng làm giảm mức đường huyết ở động vật có xương sống ngay cả trong trường hợp kháng thể này được đưa vào ở mức độ phơi nhiễm máu đạt 10 lần hoặc cao hơn liều lượng hiệu quả mà làm tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể của động vật có xương sống.

Ngoài ra, kháng thể chất chủ vận sáng chế có hoạt tính in vivo để tăng khối lượng cơ khi đưa vào một lần so với việc đưa vào liên tục IGF-I. Ngoài ra, kháng thể chất chủ vận sáng chế có chu kỳ bán rã dài trong máu, và thể hiện hiệu quả tăng khối lượng cơ khi đưa vào một lần cho động vật có xương sống.

Các kết quả này chứng minh rằng kháng thể chất chủ vận sáng chế có tiềm năng cao làm chất điều trị hoặc chất phòng ngừa, mà là ưu điểm của IGF-I, trong nhiều loại bệnh khác nhau liên quan đến các thụ thể IGF-I, như là chứng teo cơ do bất động và bệnh lùn, và có thể vượt qua tác dụng giảm đường huyết và chu kỳ bán rã ngắn trong máu, mà là các nhược điểm của IGF-I.

Mặt khác, kháng thể chất đối vận sáng chế có hiệu quả ngăn chặn sự liên kết của IGF-I với thụ thể IGF-I.

Theo một phương án, kháng thể chất đối vận sáng chế hoạt hóa thụ thể IGF-I nhưng ngăn chặn tác dụng của IGF-I trên thụ thể IGF-I. Trong trường hợp này, kháng thể này có hiệu quả chống lại hoạt tính chủ vận bổ sung của IGF-I, ví dụ, hoạt tính gây tăng sinh của các nguyên bào cơ bởi IGF-I.

Theo phương án khác, kháng thể chất đối vận sáng chế liên kết với thụ thể IGF-I nhưng không hoạt hóa thụ thể IGF-I. Ví dụ về các kháng thể chất đối vận như vậy mà không gây ra sự hoạt hóa do liên kết chéo của thụ thể IGF-I bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, các kháng thể mà có hóa trị một trong liên kết kháng nguyên, như là Fab và scFv, các kháng thể mà có các vị trí liên kết hóa trị hai, như là các kháng thể đồng đặc hiệu, nhưng liên kết với vùng đặc hiệu của thụ thể IGF-I chỉ ở một phía của các vị trí liên kết, và các kháng thể mà trong đó khoảng cách giữa các vị trí liên kết hóa trị hai thay đổi, ví dụ, bằng đoạn nối.

Trong kháng thể chất đối vận mà liên kết với thụ thể IGF-I nhưng không có hoạt tính chủ vận giữa các kháng thể đối vận sáng chế, phương pháp đo phản ứng kháng nguyên-kháng thể giữa kháng thể và thụ thể IGF-I có thể xác nhận rằng kháng thể như vậy có ái lực đối với thụ thể IGF-I, trong khi sự thử nghiệm tăng

sinh tế bào trên các tế bào, ví dụ, các nguyên bào cơ có thể xác nhận rằng kháng thể như vậy không có hoạt tính gây tăng sinh tế bào.

Ngoài ra, kháng thể chất đối vận sáng chế không ảnh hưởng đến sự hấp thụ glucoza in vitro thành các tế bào cơ đã biệt hóa hoặc mức đường huyết in vivo. Theo đó, kháng thể chất đối vận sáng chế đóng vai trò như kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I mà không gây ra các tác dụng phụ, như tăng đường huyết, và có tiềm năng cao làm chất điều trị hoặc chất phòng ngừa đối với các khối u ác tính, như ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư mô liên kết, ung thư phổi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư tuyến giáp, và u tủy.

Phản ứng chéo

Kháng thể của sáng chế tốt hơn nên phản ứng chéo với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống khác. Thuật ngữ “phản ứng chéo” có nghĩa là trong khi kháng thể gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với thụ thể IGF-I từ động vật đích (chẳng hạn như người), kháng thể này cũng có khả năng để liên kết với kháng nguyên có nguồn gốc từ động vật khác với động vật đích. Kháng thể này tốt hơn nên có khả năng phản ứng chéo với thụ thể IGF-I của động vật khác với động vật đích mà có thụ thể IGF-I là mục tiêu của phản ứng kháng nguyên-kháng thể bằng kháng thể, như là người hoặc động vật không phải người bao gồm chuột lang, khi, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, hoặc gia cầm. Ví dụ 4 được mô tả sau chứng minh rằng kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I, R11-16B, được minh họa để liên kết với trình tự ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet ở miền CR của thụ thể IGF-I ở người. Do trình tự ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet này được bảo tồn trong các phần tương ứng của các thụ thể IGF-I ở khi (khi đuôi dài), thỏ, chuột lang, bò, cừu, ngựa, và chó, kháng thể này có khả năng liên kết chéo với các thụ thể IGF-I từ các loài này. Ngoài ra, do các trình tự axit amin của các

phần đồng chủng của chuột to và chuột nhắt đều là ProSerGlyPheIleArgAsnSerThrGlnSerMet, sự phân loại đối với kháng thể kháng thụ thể IGF-I mà liên kết với phần này để nó có thể thu được kháng thể mà liên kết với các thụ thể IGF-I của, ví dụ, chuột to và chuột nhắt, và cũng có các đặc tính và chức năng tương tự như của R11-16B.

Ngoài ra, tế bào hoặc động vật thuộc loài mà không có phản ứng chéo với kháng thể của sáng chế có thể được biến đổi thông qua kỹ thuật di truyền vào tế bào hoặc động vật biểu thị thụ thể IGF-I mà liên kết chéo với kháng thể của sáng chế.

Hoạt tính gây tăng sinh tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống và hoạt tính gây ra sự tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể

Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I theo phương án của sáng chế có hoạt tính gây tăng sinh các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống. Mặc dù các kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I đã được biết đến, nhưng không kháng thể nào được báo cáo là thể hiện hoạt tính gây tăng sinh các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy, cụ thể là các nguyên bào cơ. Cũng chưa có kháng thể nào đã biết đến hiện nay mà được báo cáo là có hoạt tính gây tăng sinh tế bào ở liều lượng thấp hơn giá trị EC_{50} của IGF-I in vitro.

Thuật ngữ “các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống” trong nội dung của sáng chế này tốt hơn là các tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú, chim, loài bò sát, loài lưỡng cư, hoặc cá, tốt hơn là các tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc chim, tốt hơn nữa là các tế bào có nguồn gốc từ người, khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, cừu, ngựa hoặc chó. Các tế bào có nguồn gốc từ các loài này biểu thị thụ thể IGF-I mà phản ứng chéo với kháng thể của sáng chế có thể được tạo ra

để tăng sinh bằng kháng thể của sáng chế. “Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống” theo sáng chế này cũng bao gồm: các tế bào và các động vật biến đổi gen để biểu thị thụ thể IGF-I của các loài mà phản ứng chéo với kháng thể của sáng chế; và các tế bào động vật bị biến đổi có nguồn gốc từ các tế bào và động vật biến đổi gen như vậy.

Hoạt tính gây tăng sinh tế bào của kháng thể ở các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống có thể được phân tích in vitro bằng việc sử dụng các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy, các dòng tế bào liên tục, hoặc các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các tế bào như vậy.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy” có nghĩa là các tế bào mà được phân lập từ cơ quan hoặc mô của sinh vật sống, và có thể được nuôi cấy thứ cấp một cách điển hình cho một số đời. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy có nguồn gốc từ động vật có xương sống có thể thu được từ cơ quan hoặc mô của động vật có xương sống thông qua việc xử lý enzym, sự phân tán với các phương thức vật lý, hoặc phương pháp cấy mô khởi sinh vật. Cơ quan hoặc mô hoặc đoạn của chúng thu được từ động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng cho sự phân tích hoạt tính của kháng thể trên. Các ví dụ tốt hơn của các cơ quan và mô từ các tế bào nguyên thủy được sản xuất bao gồm: các mô tuyến nội tiết như tuyến giáp, tuyến cận giáp, và tuyến thượng thận; các mô tuyến miễn dịch như ruột thừa, amidan, các hạch bạch huyết, và lá lách; các cơ quan hô hấp như khí quản và phổi; các cơ quan tiêu hóa như dạ dày, tá tràng, ruột non, và ruột già; các cơ quan bài tiết như thận và bàng quang; các cơ quan sinh dục nam như ống dẫn tinh, tinh hoàn và tuyến tiền liệt; các cơ quan sinh dục nữ như vú và ống dẫn trứng; và các mô cơ như cơ tim và cơ xương. Các ví dụ tốt hơn nữa bao gồm gan, thận, hoặc các cơ quan tiêu hóa hoặc các mô cơ, trong số chúng thì các

mô cơ vẫn tốt hơn cả. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy mà có thể được sử dụng cho sự phân tích hoạt tính gây tăng sinh của kháng thể của sáng chế này là các tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được tạo ra để tăng sinh bằng việc liên kết IGF-I với thụ thể IGF-I. Các ví dụ điển hình của chúng là các nguyên bào cơ xương, mà là các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy được phân lập từ mô cơ. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy có nguồn gốc từ người hoặc động vật có sẵn do chuyển nhượng hoặc có sẵn về mặt thương mại trên thị trường cũng có thể thu được và sử dụng. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy ở người có sẵn từ nhiều tổ chức và công ty, ví dụ, ATCC®, ECACC, Lonza, Gibco®, Cell Applications, ScienCell research laboratories, và PromoCell.

Trong sáng chế này, thuật ngữ “dòng tế bào” có nghĩa là dòng các tế bào được nuôi cấy mà có nguồn gốc từ sinh vật sống và sau đó được làm bất tử để chúng có thể tăng sinh bán vĩnh viễn mà vẫn duy trì các đặc tính riêng biệt của loài. Các dòng tế bào được chia thành các dòng tế bào không có nguồn gốc từ khối u và các dòng tế bào có nguồn gốc từ khối u. Các dòng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống mà có thể được sử dụng cho việc phân tích hoạt tính gây tăng sinh của kháng thể của sáng chế này là các tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được tạo ra để tăng sinh bằng việc liên kết IGF-I với thụ thể IGF-I. Các ví dụ của các dòng tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được tạo ra để tăng sinh bằng IGF-I bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi: u nguyên bào thần kinh ở người SH-SY5Y, dòng tế bào sừng biểu bì ở người HaCaT, dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến phế nang ở người A549, dòng tế bào ung thư biểu mô đại tràng ở người Caco-2, dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan ở người HepG2, dòng tế bào ung thư cổ tử cung ở người Hela, dòng tế bào ung thư cổ tử cung ở

người SiHa, dòng tế bào ung thư vú ở người MCF7, dòng ung thư biểu mô tế bào phôi người đa năng NTERA-2, và dòng tế bào ung thư xương ở người U-2-OS.

Trong sáng chế này, các chất chuyển hóa mà được sử dụng để phân tích hoạt tính gây tăng sinh của kháng thể của sáng chế này là các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy hoặc các dòng tế bào như được mô tả trên đây. Các ví dụ của các chất chuyển hóa như vậy bao gồm: các tế bào iPS được tạo ra từ các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy; và các tế bào và mô được biệt hóa từ các tế bào iPS như vậy. Các ví dụ của các chất chuyển hóa khác bao gồm các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy và các dòng tế bào mà được biến đổi gen để hợp nhất gen nhằm biểu thị một cách tạm thời và nhanh chóng gen này. Các ví dụ của gen có thể được đưa vào và biểu thị bằng các dòng tế bào như vậy bao gồm các gen thụ thể IGF-I của người và các loài khác.

Các phương pháp để xác định hoạt tính gây tăng sinh tế bào của kháng thể của sáng chế này trong các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống bao gồm: việc đếm tế bào, phép đo sự tổng hợp DNA, và phép đo sự thay đổi trong hoạt tính của enzym chuyển hóa. Các phương pháp cho việc đếm tế bào bao gồm các phương pháp sử dụng các đĩa đếm tế bào máu hoặc các thiết bị đếm tế bào như máy đếm Coulter. Các phương pháp để đo sự tổng hợp DNA bao gồm các phương pháp dựa trên sự hấp thụ [3H]-thymidin hoặc 5-bromo-2'-deoxyulysin (BrdU). Phương pháp để đo sự thay đổi hoạt tính của enzym chuyển hóa bao gồm phương pháp MTT, phương pháp XTT, và phương pháp WST. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể sử dụng các phương pháp khác nếu thích hợp.

Hoạt tính gây tăng sinh tế bào có thể được xác định bằng sự tăng sinh của các tế bào được nuôi cấy phản ứng với kháng thể của sáng chế này tăng lên so với

sự tăng sinh của các tế bào được nuôi cấy mà không phản ứng với kháng thể này. Trong trường hợp này, hoạt tính cảm ứng có thể được bình thường hóa một cách thuận lợi thông qua phép đo bằng việc sử dụng IGF-I, phối tử gốc của thụ thể IGF-I, mà được phản ứng dưới các điều kiện tương tự như tiêu chuẩn so sánh. Giá trị EC_{50} chỉ ra nồng độ mà tại đó 50% hoạt tính gây tăng sinh tối đa được đưa ra trong trường hợp kháng thể của sáng chế và IGF-I được phản ứng với các nồng độ khác nhau đến các tế bào được nuôi cấy. Trong trường hợp hoạt tính gây tăng sinh được đánh giá với các nguyên bào cơ xương ở người, kháng thể của sáng chế tốt hơn có giá trị EC_{50} trong hoạt tính gây tăng sinh tế bào tương đương với giá trị đó của IGF-I, tốt hơn là giá trị EC_{50} là 1/10 hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 1/20 hoặc thấp hơn, tốt nhất là 1/50 hoặc thấp hơn giá trị đó của IGF-I. Ngoài ra, trong trường hợp hoạt tính gây tăng sinh được đánh giá với các nguyên bào cơ xương của người, kháng thể của sáng chế có giá trị EC_{50} tốt hơn là 0,5 nmol/L hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 0,3 nmol/L hoặc thấp hơn, tốt nhất là 0,1 nmol/L hoặc thấp hơn.

Các phương pháp để đo hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống in vivo bao gồm: phương pháp gồm việc đưa kháng thể của sáng chế vào động vật có xương sống và đo sự thay đổi về trọng lượng, kích thước, đếm tế bào, v.v, đối với toàn bộ cơ thể của cá thể mà nhận sự đưa vào hoặc đối với cơ quan hoặc mô được phân lập từ cá thể; và phương pháp gồm việc sử dụng động vật với mô ghép của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống và đo sự thay đổi về cân nặng, kích thước, đếm tế bào, v.v, của mô ghép gồm các tế bào động vật có xương sống. Các phép đo cho toàn bộ cơ thể của cá thể bao gồm: các phép đo trọng lượng cơ thể, chiều dài cơ thể, và chu vi bốn chi; phép đo cấu tạo cơ thể bằng việc sử dụng phương pháp trở kháng; và

phép đo hệ số chiều cao creatinin. Các phép đo cho cơ quan, mô, hoặc mô ghép từ cá thể bao gồm: trong trường hợp động vật không phải người, phương pháp gồm việc phục hồi trực tiếp cơ quan, mô hoặc mô ghép đích và việc đo trọng lượng, kích thước, hoặc số lượng tế bào bao gồm trong đó. Các phép đo không xâm lấn cho cơ quan, mô hoặc mô ghép từ cá thể bao gồm: sự phân tích hình ảnh bằng việc sử dụng ảnh chụp X-quang, CT, và MRI; và các phương pháp tương phản bằng việc sử dụng các chất đánh dấu bằng các chất đồng vị hoặc các chất huỳnh quang. Nếu mô đích là cơ xương, sự thay đổi lực cơ sau đó cũng có thể được sử dụng như một chỉ số. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể sử dụng bất kỳ phương pháp khác mà thích hợp để phân tích hoạt tính của kháng thể của sáng chế để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống in vivo. Các phương pháp đo hoạt tính của kháng thể của sáng chế để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống in vivo bao gồm: việc thực hiện các phép đo bằng việc sử dụng, ví dụ, các phương pháp đã đề cập ở trên đối với các cá thể đã nhận sự đưa kháng thể của sáng chế vào và các cá thể đã nhận sự đưa các kháng thể khác so với kháng thể của sáng chế vào hoặc bất kỳ chất tiêu chuẩn so sánh khác, và so sánh các kết quả đo giữa các cá thể.

Kháng thể của sáng chế này được đặc trưng bởi có thời gian hiệu quả gây tăng sinh tế bào dài hơn tương ứng với thời gian tiếp xúc với các tế bào so với thời gian của IGF-I thuần chủng, và bằng cách đó thể hiện tính bền vững được cải thiện. Trong các hoạt tính gây tăng sinh tế bào in vitro, khi các tế bào được tiếp xúc với IGF-I thuần chủng và sau đó được rửa bằng dung môi nuôi cấy không có IGF-I, hoạt tính gây tăng sinh tế bào của IGF-I thuần chủng đã biến mất sau khi rửa. Mặt khác, khi các tế bào được tiếp xúc với kháng thể IGF11-16 (JP-2017-

106529) mà là cơ sở của mẫu kháng thể của sáng chế này và sau đó được rửa bằng dung môi nuôi cấy không có IGF11-16, hoạt tính gây tăng sinh tế bào vẫn tiếp tục ngay cả sau khi rửa. Theo Ví dụ 8 được mô tả sau đây, mà so sánh các động lực học của IGF-I và R11-16B (kháng thể của sáng chế) trong máu, khoảng 50% hoặc cao hơn IGF-I thuần chủng được đưa vào động vật đã biến mất khỏi máu trong vòng 24 giờ sau khi đưa vào, trong khi 60% hoặc cao hơn kháng thể R11-16B được đưa vào động vật vẫn còn trong máu thậm chí 48 giờ sau khi đưa vào. Vì vậy, kháng thể R11-16B được thể hiện là duy trì trong máu trong thời gian dài. Các kết quả này chỉ ra rằng kháng thể của sáng chế thể hiện hiệu quả gây ra sự tăng sinh tế bào lâu dài cả in vitro và in vivo.

Kháng thể của sáng chế cũng được kỳ vọng thể hiện hiệu quả in vivo trong việc tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể. Cụ thể, IGF-I có hiệu quả gây ra sự tăng trưởng và sự biệt hóa các nguyên bào cơ trong các cơ xương như được đề cập ở trên, cũng như hiệu quả trong việc mở rộng các sợi cơ. Điều được kỳ vọng là các hiệu quả này cùng dẫn đến hiệu quả tăng khối lượng cơ. Giống như IGF-I, khi kháng thể của sáng chế được đưa vào động vật, nó cũng thể hiện hiệu quả tăng khối lượng cơ của động vật. Kháng thể của sáng chế là kháng thể đầu tiên mà được chứng minh biểu hiện hiệu quả in vivo của việc tăng khối lượng cơ.

Các phương pháp để đo hoạt tính của kháng thể của sáng chế để tăng khối lượng cơ bao gồm: đối với toàn bộ cơ thể của cá thể mà nhận sự đưa vào, phép đo trọng lượng cơ thể, chiều dài cơ thể, và chu vi bốn chi; phép đo cấu tạo cơ thể bằng việc sử dụng phương pháp trở kháng; và phép đo creatinin, và hệ số chiều cao. Các phương pháp khác bao gồm: sự phân tích hình ảnh bằng việc sử dụng ảnh chụp X quang, CT, và MRI; và các phương pháp tương phản bằng việc sử dụng các chất đánh dấu bằng các chất đồng vị hoặc các chất huỳnh quang; và phép

đo sự thay đổi lực cơ. Trong trường hợp động vật không phải người, phương pháp bao gồm việc phục hồi trực tiếp cơ quan, mô hoặc mô ghép đích và đo trọng lượng và/hoặc kích thước của nó có thể được sử dụng. Hiệu quả của việc gia tăng khối lượng cơ có thể được đánh giá bằng: việc so sánh khối lượng cơ tăng giữa cá thể mà kháng thể của sáng chế được đưa vào và cá thể mà kháng thể này không được đưa vào; hoặc việc so sánh các khối lượng cơ của cá thể trước và sau khi đưa kháng thể của sáng chế vào. Hiệu quả tăng khối lượng cơ có thể được xác định nếu có bất kỳ sự gia tăng nào trong khối lượng cơ của cá thể trước và sau khi đưa kháng thể của sáng chế vào. Tốt hơn là, hiệu quả thu được bằng việc đưa kháng thể của sáng chế vào có thể được xác định khi có sự khác biệt tốt hơn là 103% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 104% hoặc cao hơn của khối lượng cơ giữa cá thể mà kháng thể của sáng chế được đưa vào và cá thể mà kháng thể này không được đưa vào, hoặc của khối lượng cơ của cùng cá thể giữa trước và sau khi đưa kháng thể của sáng chế vào. IGF-I cũng đóng vai trò trong sự tăng trưởng xương, và có hiệu quả tăng chiều dài cơ thể (chiều cao cơ thể trong trường hợp của người). Do đó, kháng thể của sáng chế cũng thể hiện hiệu quả tăng chiều dài cơ thể khi được đưa vào động vật. Hiệu quả của kháng thể của sáng chế trong việc tăng chiều dài cơ thể của cá thể có thể được xác định bằng việc đo trọng lượng cơ thể, chiều dài cơ thể, và chu vi bốn chi của cá thể.

Các hiệu quả hấp thụ glucoza bởi các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống và/hoặc mức đường huyết trong động vật

Kháng thể theo phương án của sáng chế được đặc trưng bởi việc không tác động đến sự hấp thụ glucoza vào các tế bào cơ được biệt hóa có nguồn gốc từ động vật có xương sống và/hoặc mức đường huyết trong động vật có xương sống. IGF-I được biết đến là gây ra sự tăng hấp thụ glucoza vào các tế bào và sự giảm

mức đường huyết như một phần của hiệu quả chủ vận trên thụ thể IGF-I. Tuy nhiên, kháng thể chất chủ vận sáng chế mà có chức năng như kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I có hiệu quả ngoài mong đợi là kháng thể này không gây ra sự hấp thụ glucoza vào các tế bào cơ được biệt hóa ngay cả ở liều lượng gấp 100 lần hoặc cao hơn giá trị EC_{50} in vitro trong hoạt tính tăng sinh trong các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống, và không làm thay đổi mức đường huyết ngay cả khi mức phoi nhiễm trong máu gấp 10 lần hoặc cao hơn liều lượng hiệu quả mà gây ra sự tăng khối lượng cơ trong khi đưa vào động vật ngoài đường tiêu hóa. Ngoài ra, kháng thể chất đối vận sáng chế có chức năng như kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I cũng không tác động đến sự hấp thụ glucoza vào các tế bào cơ được biệt hóa của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống và/hoặc mức đường huyết trong động vật có xương sống, từ đó dẫn đến hiệu quả có lợi về ngăn ngừa, ví dụ, tăng mức đường huyết, mà là vấn đề không mong muốn khi sử dụng kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I thông thường trong việc điều trị cho người. Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống trong sáng chế được mô tả trên đây.

Để phân tích hiệu quả của kháng thể của sáng chế này trong việc không tác động đến sự hấp thụ glucoza nội bào bởi các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống in vitro, có thể sử dụng các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy, các dòng tế bào và các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các tế bào như vậy. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy, các tế bào liên tục, và các tế bào chuyển hóa trong sáng chế này được mô tả trên đây.

Các phương pháp để xác định hiệu quả của kháng thể của sáng chế đối với sự hấp thụ glucoza bởi các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống bao gồm: phép đo nồng độ glucoza nội bào; phép đo sự hấp thụ nội bào của chất phóng

xạ đánh dấu tương tự glucoza; và phép đo sự thay đổi về lượng của chất vận chuyển glucoza. Các phương pháp đo nồng độ glucoza bao gồm các phương pháp đo độ hấp thụ như phương pháp enzym. Các phương pháp đo lượng hấp thụ nội bào của chất phóng xạ đánh dấu tương tự glucoza bao gồm phép đo lượng hấp thụ của $[3H]$ -2'-deoxyglucoza. Các phương pháp đo sự thay đổi về lượng của chất vận chuyển glucoza bao gồm nhuộm tế bào miễn dịch (immunocytostaining) và tách miễn dịch (western blotting). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể sử dụng các phương pháp khác nếu thích hợp. Thực tế là không có tác động về sự hấp thụ glucoza nội bào có thể được xác nhận nếu sự hấp thụ glucoza nội bào của các tế bào được nuôi cấy phản ứng với kháng thể của sáng chế gần như là giống với sự hấp thụ glucoza nội bào của các tế bào được nuôi cấy khi không có kháng thể này. Trong trường hợp này, cũng thuận tiện để thực hiện phép đo trong cùng các điều kiện bằng việc sử dụng IGF-I, mà là phối tử gốc đối với thụ thể IGF-I, như tiêu chuẩn so sánh.

Các tế bào được nuôi cấy để thử nghiệm đã được xử lý hoặc là với kháng thể của sáng chế hoặc là với IGF-I có nồng độ thay đổi, và sự hấp thụ glucoza của nhóm xử lý được chỉ ra là tỷ lệ khi sự hấp thụ glucoza nội bào của nhóm không xử lý được xác định là 100%. Khi các tế bào cơ được biệt hóa ở người được sử dụng để đánh giá sự hấp thụ glucoza, sự hấp thụ glucoza đạt được bằng kháng thể của sáng chế tốt hơn là bằng hoặc thấp hơn sự hấp thụ glucoza đạt được bằng IGF-I ở cùng nồng độ. Tốt hơn là, sự hấp thụ glucoza đạt được bằng kháng thể của sáng chế nên là 110% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 100%, của lượng hấp thụ glucoza của nhóm không điều trị. Khi các tế bào cơ được biệt hóa ở người được sử dụng để đánh giá sự hấp thụ glucoza, sự hấp thụ glucoza đạt được bằng kháng

thể của sáng chế mà được thêm vào một lượng 100 nmol/L tốt hơn là 110% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 105% hoặc thấp hơn, tốt nhất là từ 95% đến 100%.

Các phương pháp để xác định sự hấp thụ glucoza bởi các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống in vivo bao gồm: các phương pháp gồm việc đưa kháng thể của sáng chế vào động vật có xương sống và việc xác định sự thay đổi hàm lượng glucoza của cơ quan hoặc mô của cá thể này. Các phương pháp đo cho toàn bộ cơ thể của cá thể mà nhận sự đưa vào này bao gồm: phép đo mức đường huyết; và hemoglobin A1C bằng việc sử dụng protein được glycosyl hóa làm các chỉ số. Các phương pháp đo sự hấp thụ glucoza của cơ quan hoặc mô của cá thể bao gồm: trong trường hợp động vật không phải người, việc phục hồi trực tiếp cơ quan hoặc mô đích, và việc tính toán nồng độ glucoza hoặc chất phóng xạ đánh dấu. Các phương pháp không xâm lấn để đo cá thể hấp thụ glucoza đối với cơ quan hoặc mô của cá thể bao gồm: sự phân tích hình ảnh bằng việc sử dụng ảnh chụp X-quang, CT và MRI; và các phương pháp tương phản sử dụng các chất phóng xạ đánh dấu với các đồng vị hoặc các chất huỳnh quang. Nếu mô đích là cơ xương, sau đó kẹp glucoza cũng có thể được sử dụng làm chỉ số. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể sử dụng bất kỳ phương pháp nào khác mà thích hợp để phân tích tác động của kháng thể của sáng chế này đối với sự hấp thụ glucoza của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống in vivo.

Kháng thể của sáng chế cũng được đặc trưng ở chỗ khi được đưa vào động vật có xương sống ngay cả khi với liều lượng hiệu quả đủ để tăng khối lượng cơ của động vật có xương sống, tốt hơn là với liều lượng gấp 10 lần hoặc lớn hơn liều lượng hiệu quả, điều này không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống. Khi đánh giá tác động của kháng thể của sáng chế trong việc thay

đổi mức đường huyết của động vật có xương sống, tốt hơn là sử dụng động vật mà thuộc động vật có vú, chim, loài bò sát, loài lưỡng cư hoặc cá, tốt hơn nữa là động vật thuộc động vật có vú hoặc chim, tốt hơn nữa là người, khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, cừu, ngựa hoặc chó. Động vật biến đổi gen để biểu thị thụ thể IGF-I của loài mà có khả năng phản ứng chéo với kháng thể của sáng chế cũng có thể được sử dụng làm động vật để đánh giá tác động của kháng thể của sáng chế trong việc thay đổi mức đường huyết. Các phương pháp xâm lấn để đo mức đường huyết bao gồm phương pháp đo màu và phương pháp điện cực. Các ví dụ về các phương pháp enzym được sử dụng để phát hiện bao gồm phương pháp oxy hóa glucoza (phương pháp GOD) và phương pháp dehydrogenaza glucoza (phương pháp GDH). Các phương pháp không xâm lấn bao gồm các phương pháp đo quang học. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể lựa chọn bất kỳ phương pháp nào khác nếu thích hợp. Trong trường hợp ở người, giới hạn bình thường của mức đường huyết lúc đói là từ 100mg/dL đến 109mg/dL. Liên quan đến các tác dụng phụ trong mức đường huyết do sử dụng thuốc (Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0), mức đường huyết thấp hơn giới hạn từ 77mg/dL xuống 55mg/dL được xác định như một chỉ thị của đường huyết thấp, trong khi mức đường huyết cao hơn giới hạn từ 109mg/dL đến 160mg/dL được xác định như một chỉ thị của đường huyết cao. Việc sử dụng thuốc được xem như là không ảnh hưởng đến mức đường huyết khi mức đường huyết sau khi đưa thuốc vào cao hơn 55mg/dL và thấp hơn 160mg/dL, tốt hơn là cao hơn 77mg/dL và thấp hơn 109mg/dL. Tuy nhiên, giá trị bình thường của mức đường huyết và giới hạn dao động của nó thay đổi phụ thuộc vào động vật mà thuốc được đưa vào, và ngay cả đối tượng là người cũng không phải lúc nào cũng có mức đường huyết trong giới hạn bình thường tại thời điểm đưa thuốc vào. Theo đó,

trong nội dung của sáng chế, kháng thể của sáng chế này tốt hơn nên được coi là không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống mà kháng thể này được đưa vào khi sự thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống tốt hơn là 30% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 20% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 10% hoặc thấp hơn.

Quy trình sản xuất kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I

Kháng thể của sáng chế có thể được tạo ra bởi sự nhân hóa của kháng thể đơn dòng IGF11-16 ở chuột (kháng thể IGF11-16 ở chuột, JP 2017-106529) đối với thụ thể IGF-I. Phương pháp mẫu để sản xuất kháng thể được nhân hóa được minh họa trong Ví dụ 1 được mô tả sau đây, và các kháng thể được nhân hóa mà được sản xuất bằng phương pháp như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, mỗi kháng thể được nhân hóa (R11-16B, R11-16C, R11-16D, R11-16E hoặc R11-16F) có trình tự axit amin VH của SEQ ID NO: 7 và trình tự axit amin VL của các SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 hoặc 12.

Phân tử axit nucleic có trình tự bazơ mã hóa axit amin của protein trong kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I thu được có thể được sản xuất, và phân tử axit nucleic như vậy cũng được biến đổi gen để sản xuất kháng thể. Chuỗi H, chuỗi L, hoặc các vùng biến đổi của chúng trong thông tin gen của kháng thể này có thể được điều chỉnh để cải thiện ái lực và tính đặc hiệu của kháng thể với sự tham chiếu đến thông tin, ví dụ, của các trình tự CDR.

Trong phương pháp sản xuất kháng thể của sáng chế, ví dụ, các tế bào động vật có vú, các tế bào côn trùng, và vi khuẩn *Escherichia coli* mà trong đó các gen mã hóa các axit amin của các protein trong kháng thể đích được đưa vào được nuôi cấy, và bằng cách đó kháng thể có thể được sản xuất thông qua sự tinh chế

chất lỏng bề mặt nuôi cấy thu được bằng quy trình thông thường. Phương pháp cụ thể bất kỳ được minh họa dưới đây.

Phân tử axit nucleic mà mã hóa vùng biến đổi chuỗi H được liên kết với phân tử axit nucleic mà mã hóa peptit tín hiệu chuỗi H và phân tử axit nucleic mà mã hóa vùng hằng định chuỗi H để sản xuất kháng thể của sáng chế. Phân tử axit nucleic mà mã hóa vùng biến đổi chuỗi L được liên kết với phân tử axit nucleic mà mã hóa peptit tín hiệu chuỗi L và phân tử axit nucleic mà mã hóa vùng hằng định chuỗi L để sản xuất kháng thể của sáng chế.

Các gen chuỗi H và chuỗi L được kết hợp thành vector, ví dụ, vector tách dòng hoặc vector biểu hiện, mà phù hợp để biểu hiện trong tế bào chủ đã chọn. Trong trường hợp này, gen chuỗi H và gen chuỗi L có thể được kết hợp thành một vector hoặc các vector riêng rẽ sao cho cả hai gen này được biểu hiện.

Vector được tạo thành từ việc gen chuỗi H và gen chuỗi L được kết hợp sau đó được đưa vào tế bào chủ. Các ví dụ của các tế bào chủ bao gồm các tế bào có nhân, như các tế bào động vật có vú, các tế bào côn trùng, các tế bào nấm men hoặc các tế bào thực vật, và các tế bào vi khuẩn. Phương pháp đưa các gen này vào tế bào chủ có thể được lựa chọn thích hợp từ phương pháp hóa học như quy trình canxi photphat hoặc quy trình bao gói trong liposome, phương pháp vật lý như quy trình điện di hoặc quy trình chuyển gen bằng súng bắn gen, và phương pháp dựa trên sự lây nhiễm virus hoặc thực thể khuẩn. Tế bào chủ mà gen chuỗi H và gen chuỗi L được đưa vào có thể được sử dụng trong việc nuôi cấy không có bất kỳ sự lựa chọn nào, sự ngưng tụ có chọn lọc của các tế bào tái tổ hợp mà các gen này được đưa vào bằng việc sử dụng các đặc tính, ví dụ, tính kháng thuốc và hiện tượng dinh dưỡng thụ động, hoặc việc nuôi cấy các tế bào vô tính tái tổ hợp được thực hiện từ tế bào chủ đơn mà các gen này được đưa vào.

Tế bào chủ mà gen chuỗi H và gen chuỗi L được đưa vào đó được nuôi cấy trong môi trường và điều kiện nuôi cấy tối ưu. Trong quy trình này, các sản phẩm của gen chuỗi H và gen chuỗi L biểu hiện trong tế bào chủ thường được tiết vào môi trường như các protein kháng thể, và các protein kháng thể được tạo ra này có thể được phục hồi bằng việc thu lại môi trường. Tuy nhiên, thông qua sự kết hợp của các gen và tế bào chủ, các protein kháng thể tích tụ trong tế bào có thể được phục hồi bằng việc phá hủy tế bào chủ khi cần thiết, hoặc các protein kháng thể có thể được phục hồi từ phần chu chất trong trường hợp của tế bào không nhân. Các ví dụ của các phương pháp thông thường được sử dụng để tinh chế kháng thể từ một mẫu như là môi trường mà chứa các protein kháng thể được phục hồi bao gồm sự kết tủa muối; cung cấp dinh dưỡng hoặc trao đổi dung môi bằng phép thẩm tách và sự lọc qua máy siêu lọc; và phép sắc ký ái lực bằng việc sử dụng chất mang mà chứa, ví dụ, protein A được cố định, protein G, hoặc kháng nguyên. Phép sắc ký trao đổi ion, phép sắc ký kỵ nước, phép sắc ký chế độ hỗn hợp, và phép sắc ký loại trừ kích thước cũng có sẵn. Nhiều kỹ thuật được sử dụng trong các phương pháp này được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Trong mỗi liên hệ này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể tạo ra nhiều kháng thể như các protein di truyền kháng thể, các kháng thể phân tử thấp, và các kháng thể giá thể (scaffold) bằng việc sử dụng các kỹ thuật đã biết, ví dụ, bằng việc thực hiện biến đổi gen đối với gen mà mã hóa chuỗi nặng và/hoặc nhẹ chuỗi của globulin miễn dịch để đưa ra đặc điểm mong muốn, hoặc bằng việc sử dụng thông tin cấu trúc của các vùng biến đổi hoặc các vùng CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Ngoài ra, để cải thiện hiệu suất của kháng thể hoặc tránh các tác dụng phụ, có thể đưa biến thể vào cấu

trúc của vùng hằng định của kháng thể hoặc đưa vào các vị trí glycosyl hóa của kháng thể, bằng việc sử dụng các kỹ thuật được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật nếu thích hợp.

Thuốc chứa kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I

Kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc điều trị hoặc phòng ngừa cho tình trạng liên quan đến IGF-I hoặc bệnh gây ra bởi bất kỳ tác động nào trên thụ thể IGF-I. Cụ thể, các tình trạng liên quan đến IGF-I hoặc các bệnh mà có thể là mục tiêu của việc điều trị hoặc phòng ngừa bằng việc sử dụng kháng thể chất chủ vận kháng thụ thể IGF-I bao gồm: các bệnh teo cơ (ví dụ như, teo cơ do bất động, giảm cơ, hội chứng suy giảm sức khỏe cachexia), bệnh lùn (ví dụ như, bệnh lùn loại Laron và bệnh lùn do kháng hormon tăng trưởng), xơ gan, xơ hóa gan, đái tháo đường thận, suy thận mãn tính, lão hóa, ức chế tăng trưởng nội tử cung (IUGR), bảo vệ tim mạch, đái tháo đường, kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, loãng xương, xơ hóa bàng quang, loạn dưỡng tăng trưởng cơ lực, giảm cơ gắn với AIDS, hội chứng tái phân bố chất béo gắn với HIV, bệnh Crohn, hội chứng Werner, bệnh suy giảm miễn dịch kết hợp liên quan đến giới gen X, suy giảm thính lực, chứng chán ăn tâm thần và bệnh vớng mạc của trẻ sinh non, hội chứng Tóc nơ, hội chứng Prader-Willi, hội chứng Silver-Russell, bệnh lùn tự phát, béo phì, đa xơ cứng, viêm loét đại tràng, giảm lượng cơ, nhồi máu cơ tim, và loãng xương. Các bệnh mà có thể là mục tiêu của việc điều trị hoặc phòng ngừa bằng cách sử dụng kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I bao gồm: u nguyên bào thần kinh, ung thư mô liên kết cơ vân, ung thư xương, ung thư ở trẻ em, bệnh to đầu chi, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, u xơ tiền liệt tuyến, ung thư vú, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư xương, ung thư phổi, ung thư trực kết tràng, ung thư cổ tử cung, ung thư mô liên kết hoạt dịch, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, u

Wilm, tiêu chảy gắn với hạch ung thư di căn và u bài tiết peptit ruột vận mạch, u hormon peptit ruột vận mạch, hội chứng Verner-Morrison, hội chứng Beckwith-Wiedemann, ung thư thận, ung thư tế bào thận, ung thư tế bào chuyển tiếp, ung thư mô liên kết Ewing, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính, u não, u não glioblastoma, u não phi glioblastoma, u màng não, u tuyến yên, u dây thần kinh thính giác, u ngoại bì thần kinh nguyên thủy, u nguyên bào tuỷ, u sao bào, u tế bào thần kinh đệm ít nhánh, u màng não thất, u nhú đám rối màng mạch, bệnh khổng lồ, bệnh vảy nến, xơ vữa động mạch, tái phát hẹp van tim cơ trơn mạch máu, phát triển vi mạch không phù hợp, vồng mạc đại tháo đường, bệnh Graves, bệnh đa xơ cứng, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh suy giáp mạn tính, bệnh nhược cơ, viêm tuyến giáp tự miễn và bệnh Behcet. Cụ thể, tốt hơn nên sử dụng kháng thể của sáng chế này bao gồm sử dụng như thuốc điều trị hoặc phòng ngừa các loại bệnh teo cơ (ví dụ như, teo cơ do bất động, giảm cơ, hội chứng suy giảm sức khỏe cachexia) và/hoặc bệnh lùn (ví dụ như, bệnh lùn loại Laron và bệnh lùn do kháng hormon tăng trưởng). Kháng thể của sáng chế này hữu ích ở chỗ nó không làm thay đổi mức đường huyết khi đưa vào cơ thể.

Thuốc chứa kháng thể của sáng chế có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm mà chứa, ngoài kháng thể của sáng chế, chất mang dược dụng và/hoặc bất kỳ tá dược nào khác. Việc bào chế thuốc bằng việc sử dụng chất mang dược dụng và/hoặc bất kỳ tá dược nào khác có thể được thực hiện theo, ví dụ, phương pháp được mô tả trong “Remington: The Science and Practice of Pharmacy, tái bản lần thứ 20”, Lippincott Williams & Wilkins, Đại học Khoa học ở Philadelphia, 2000.

Thuốc điều trị hoặc phòng ngừa như vậy có thể được tạo ra dưới dạng bào chế lỏng được sản xuất bằng việc hòa tan, làm lơ lửng, hoặc nhũ hóa các thành phần vào môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu, hoặc là dạng bào chế

đông khô của chúng. Môi trường hoặc dung môi để sản xuất dạng bào chế như vậy có thể là môi trường nước, các ví dụ của môi trường nước bao gồm nước cất để tiêm và dung dịch muối sinh lý, mà có thể được sử dụng tùy ý với việc thêm vào chất điều hòa áp suất thẩm thấu (ví dụ, D-glucoza, D-sorbitol, D-mannitol, và natri clorua), và/hoặc trong sự kết hợp với chất hỗ trợ hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol hoặc polyetylen glycol), hoặc chất hoạt động bề mặt không chứa ion (ví dụ, polysorbat 80 hoặc dầu thầu dầu hydro hóa polyoxyetylen 50). Dạng bào chế như vậy cũng có thể được sản xuất với môi trường dầu hoặc dung môi, các ví dụ của môi trường như vậy bao gồm dầu mè và dầu đậu nành, mà có thể được sử dụng tùy ý kết hợp với chất hỗ trợ hòa tan chẳng hạn như benzyl benzoat và rượu benzyl. Các thuốc dạng lỏng như vậy thường có thể được sản xuất bằng việc sử dụng các chất phụ gia thích hợp chẳng hạn như các chất đệm (ví dụ, các chất đệm photphat và các chất đệm axetat), các chất làm dịu (ví dụ, benzalkonium clorua và procain hydroclorua), các chất ổn định (ví dụ, albumin huyết thanh người và polyetylen glycol), các chất bảo quản (ví dụ, axit ascorbic, axit erytorbic, và các muối của chúng), các chất tạo màu (ví dụ, chlorophyll β -caroten màu đồng, đỏ #2 và xanh dương #1), các chất khử trùng (ví dụ, các este axit paraoxybenzoic, phenol, benzethonium clorua và benzalkonium clorua), các chất làm đặc (ví dụ, hydroxypropyl xenlulozơ, cacboxymetyl xenlulozơ, và các muối của chúng), các chất ổn định (ví dụ, mannitol albumin huyết thanh người và sorbitol), và các chất điều chỉnh mùi (ví dụ, hương liệu bạc hà và cam quýt).

Các dạng bào chế thay thế khác bao gồm các thuốc điều trị hoặc thuốc phòng ngừa để bôi vào niêm mạc, các dạng bào chế như vậy thường chứa các chất phụ gia chẳng hạn như các chất kết dính nhạy áp lực, các chất tăng cường nhạy áp lực,

các chất điều chỉnh độ nhớt, các chất làm đặc và các chất tương tự (ví dụ, chất nhầy, chất làm đông aga, gelatin, pectin, caragenan, natri alginat, gồm hạt bồ mễ, gồm xanthan, gồm tragacan, gồm arabic, chitosan, pullulan, tinh bột sắn, sucralfat, xenlulozo và các dẫn xuất của nó (chẳng hạn như hydroxypropyl metyl xenlulozo), các este axit béo polyglyxerol, các chất đồng trùng hợp acrylic axit-alkyl (meth)acrylat, hoặc các muối của chúng và các este axit béo polyglyxerol), chủ yếu cho mục đích chuyển tải các đặc tính duy trì và hấp thụ vào niêm mạc. Tuy nhiên, dạng bào chế này, dung môi và các chất phụ gia cho thuốc điều trị hoặc thuốc phòng ngừa được đưa vào cơ thể không bị giới hạn bởi các dạng này, và việc lựa chọn thích hợp có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Thuốc chứa kháng thể của sáng chế có thể chứa thêm, ngoài kháng thể của sáng chế, chất khác đã được biết đến (thành phần hoạt tính). Thuốc chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được kết hợp với chất khác đã biết dưới dạng bộ kit. Các ví dụ của các thành phần hoạt tính để kết hợp với kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I bao gồm: hormon tăng trưởng hoặc chất tương tự của chúng, insulin hoặc chất tương tự của chúng, IGF-II hoặc chất tương tự của chúng, kháng thể kháng myostatin, chất đối vận myostatin, kháng thể thụ thể kháng activin loại IIB, chất đối vận thụ thể activin loại IIB, thụ thể activin loại IIB có thể hòa tan hoặc chất tương tự của chúng, ghrelin hoặc chất tương tự của chúng, follistatin hoặc chất tương tự của chúng, chất chủ vận beta-2, và chất điều biến thụ thể hormon nam chọn lọc. Các ví dụ về các thành phần hoạt tính để kết hợp với kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I bao gồm: corticosteroid, thuốc chống nôn mửa, ondansetron hydroclorua, granisetron hydroclorua, metoclopramit, domperidon, haloperidol, cyclizin, lorazepam, prochlorperazin, dexametason,

levomepromazin, tropisetron, vắc xin ung thư, chất ức chế GM-CSF, vắc xin DNA GM-CSF, vắc xin trên cơ sở tế bào, vắc xin tế bào đuôi gai, vắc xin vi rút tái tổ hợp, vắc xin protein sốc nhiệt (HSP), vắc xin u đồng đẳng, vắc xin nguyên bào nhiễm, chất giảm đau, ibuprofen, naproxen, cholin magie trisalicylat, oxycodon hydroclorua, chất ức chế tạo mạch máu mới, chất chống đông máu, kháng thể kháng PD-1, nivolumab, pembrolizumab, kháng thể kháng PD-L1, atezolizumab, kháng thể kháng CTLA4, ipilimumab, kháng thể kháng CD20, rituximab, kháng thể kháng HER2, trastuzumab, kháng thể kháng CCR4, mogamulizumab, kháng thể kháng VEGF, bevacizumab, kháng thể kháng thụ thể VEGF, đoạn thụ thể VEGF có thể hòa tan, kháng thể kháng TWEAK, kháng thể thụ thể kháng TWEAK, đoạn thụ thể TWEAK có thể hòa tan, AMG 706, AMG 386, chất chống tăng sinh, chất ức chế transferaza protein farnesyl, chất ức chế alpha v beta 3, chất ức chế alpha v beta 5, chất ức chế p53, chất ức chế thụ thể Kit, chất ức chế thụ thể ret, chất ức chế PDGFR, chất ức chế bài tiết hormon tăng trưởng, chất ức chế angiopoietin, chất ức chế đại thực bào thâm nhiễm khối u, chất ức chế c-fms, kháng thể kháng c-fms, chất ức chế CSF-1, kháng thể kháng CSF-1, đoạn c-fms có thể hòa tan, pegvisomant, gemcitabin, panitumumab, irinotecan, và SN-38. Liều lượng của chất khác được sử dụng kết hợp với kháng thể có thể trong phạm vi liều lượng được sử dụng đối với việc trị liệu thông thường, nhưng có thể tăng hoặc giảm tùy theo tình huống.

Thuốc điều trị hoặc phòng ngừa theo sáng chế có thể được đưa vào ngoài đường tiêu hóa nhằm mục đích cải thiện các triệu chứng. Đối với việc đưa vào ngoài đường tiêu hóa, chất dùng qua đường mũi có thể được sản xuất, và thuốc dạng lỏng, dạng bào chế thể huyền phù hoặc rắn có thể được lựa chọn. Dạng mũi tiêm có thể được sản xuất như dạng khác của việc đưa vào ngoài đường tiêu hóa,

việc tiêm được lựa chọn là tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm truyền, tiêm vào cơ, tiêm nội nhãn hoặc tiêm trong màng bụng. Các dạng bào chế khác được sử dụng cho việc đưa thuốc vào ngoài đường tiêu hóa bao gồm thuốc đạn, thuốc ngậm dưới lưỡi, thuốc tiêm dưới da và thuốc đưa xuyên niêm mạc ngoài thuốc dùng qua đường mũi. Ngoài ra, việc đưa vào động mạch vành là có thể bằng phương thức bỏ sung hoặc phủ lên ống đỡ động mạch hoặc dụng cụ bịt ống động mạch.

Liều lượng đối với chất điều trị hoặc phòng ngừa theo sáng chế sẽ khác nhau phụ thuộc vào độ tuổi bệnh nhân, giới tính, trọng lượng cơ thể và các triệu chứng, hiệu quả trị liệu, phương pháp đưa thuốc vào, thời gian điều trị, hoặc các loại thành phần hoạt tính trong dược phẩm, nhưng thông thường thuốc có thể được đưa vào trong giới hạn 0,1 mg đến 1 g và tốt hơn là trong giới hạn 0,5 mg đến 300 mg của hợp chất hoạt tính trên mỗi lần đưa vào đối với người lớn, một đến bốn tuần một lần, hoặc một đến hai tháng một lần. Tuy nhiên, vì liều lượng và tần suất đưa thuốc vào sẽ khác nhau tùy thuộc vào nhiều điều kiện, liều lượng đưa vào thấp hơn và tần suất đưa vào ít hơn so với liều lượng được đề cập trên đây có thể là đủ, hoặc liều lượng và tần suất đưa vào vượt quá các giới hạn này có thể là cần thiết.

Phương pháp nuôi cấy các tế bào bằng việc sử dụng kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I

IGF-I và các dẫn xuất của nó được sử dụng rộng rãi trong các kỹ thuật nuôi cấy tế bào để duy trì, tăng trưởng và/hoặc biệt hóa các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống in vitro, và được bán trên thị trường như các thuốc thử nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, do IGF-I có thể mất các hiệu quả của nó trong quá trình nuôi cấy dài hạn do, ví dụ, thiếu độ ổn định đủ, nên điều cần thiết là, ví dụ, giữ việc điều chỉnh nồng độ của nó để tiến hành nuôi cấy tế bào ổn định. Ngoài

ra, do IGF-I gây ra sự hấp thụ glucoza bởi các tế bào, có khả năng rằng sự chuyển hóa và các đặc tính của các tế bào có thể bị thay đổi do sự tăng nồng độ glucoza nội bào, và rằng các điều kiện nuôi cấy có thể thay đổi do sự giảm nồng độ glucoza của môi trường nuôi cấy. So với IGF-I, kháng thể của sáng chế đặc trưng ở chỗ nó ổn định hơn, có thể duy trì hiệu quả tăng sinh tế bào ngay cả sau khi tiếp xúc với các tế bào, có thể thể hiện hoạt tính gây tăng sinh tế bào ngay cả ở nồng độ thấp hơn, và không gây ra sự hấp thụ glucoza nội bào. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I của sáng chế có thể được sử dụng để nuôi cấy tế bào, bằng việc thêm lượng thích hợp kháng thể này vào môi trường nuôi cấy hoặc bằng việc hấp thụ hoặc bằng việc cố định lượng thích hợp kháng thể này vào pha rắn của bình nuôi cấy. Do đó, kháng thể của sáng chế có thể làm giảm lượng được sử dụng, và gây ra sự tăng sinh của các tế bào một cách hiệu quả gắn với pha rắn. Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống trong sáng chế được mô tả trên đây. Cụ thể hơn, các ví dụ của các đối tượng mà có thể được nuôi cấy bằng việc sử dụng kháng thể của sáng chế cũng bao gồm cơ quan hoặc mô của động vật có xương sống hoặc động vật biến đổi gen có nguồn gốc từ động vật có xương sống như vậy. Kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng cho việc nuôi cấy các tế bào nhằm mục đích sản xuất tế bào của chất hoặc việc trị liệu tế bào và thuốc tái tạo bằng việc sử dụng các tế bào như vậy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ngay bây giờ sáng chế này sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ sau đây. Sáng chế không được hiểu là bị giới hạn bởi các ví dụ này, mà có thể được thực hiện dưới bất kỳ dạng nào mà không mất đi nội dung cốt lõi của sáng chế.

Ví dụ 1: Sản xuất gen kháng thể được nhân hóa của kháng thể IGF11-16 ở chuột

Mẫu kháng thể người được chọn từ các dòng mầm của các kháng thể người có các trình tự axit amin mà tương đồng cao với trình tự của các vùng khuôn (FR) trong vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể IGF11-16 ở chuột, trong đó các axit amin của vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) trong VH và VL của kháng thể đơn dòng IGFA11-16 ở chuột (kháng thể IGF1116 ở chuột được bộc lộ trong JP 2017-106529) đến các thụ thể IGF-I mà được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai của Kohler et al. (Nature, 256: 495-497, 1975) được cấy lại vào mẫu kháng thể người.

Các trình tự axit amin được yêu cầu từ VH và VL của kháng thể IGF11-16 ở chuột được cấy vào FR trong VH và VL của mẫu các kháng thể người để tạo ra các kháng thể được nhân hóa. Cụ thể, trình tự axit amin CDR và nhiều vị trí trong trình tự axit amin FR trong VH của mẫu kháng thể người được thay thế bằng các trình tự axit amin tương ứng trong VH của kháng thể IGF11-16 ở chuột để thiết kế trình tự axit amin của R11-16VH (SEQ ID NO: 7), mà là VH mà kháng thể được nhân hóa IGF11-16 ở chuột, và để thiết kế thêm trình tự cơ sở của các DNA mã hóa các axit amin này.

Trình tự axit amin CDR và nhiều vị trí trong trình tự axit amin FR trong VL của mẫu kháng thể người được thay thế bằng các trình tự axit amin trong VL của kháng thể IGF11-16 ở chuột để thiết kế trình tự axit amin của R11-16VL, mà là VL mà kháng thể được nhân hóa IGF11-16 ở chuột.

Axit amin ở vị trí 36 trong R11-16VL là xystein trong kháng thể IGF11-16 ở chuột. Tuy nhiên, xystein hiếm khi hiện hữu ở vị trí này trong kháng thể người bình thường. Do sự tái tạo của liên kết disulfua mà không tạo ra ban đầu các kết quả có thể trong khối kết tụ, năm trình tự axit amin của các R11-16VL, đó là, R11-16VL-C36, R11-16VL-C36Y, R11-16VL-C36A, R11-16VL-C36S, và R11-

16VL-C36F (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11), mà mỗi trình tự gồm xystein, tyrosin, alanin, serin, hoặc phenylalanin tại vị trí 36 được thiết kế thêm, và các trình tự cơ sở của các DNA mã hóa các axit amin cũng được thiết kế thêm. Cấu trúc của các kháng thể được nhân hóa và các trình tự axit amin của chúng được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Các cấu trúc và trình tự axit amin của các kháng thể được nhân hóa được sản xuất

Tên kháng thể	Vùng biến đổi chuỗi nặng	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ
R11-16B	R11-16VH	R11-16VL-C36Y
	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
R11-16C	R11-16VH	R11-16VL-C36A
	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9
R11-16D	R11-16VH	R11-16VL-C36S
	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10
R11-16E	R11-16VH	R11-16VL-C36F
	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11
R11-16F	R11-16VH	R11-16VL-C36
	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 12

Ví dụ 2: Việc sản xuất kháng thể được nhân hóa

Các DNA mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng R11-16VH của kháng thể nhân được hóa được thiết kế và các DNA mã hóa biến thể IgG4S228P ở người mà làm ổn định lớp phụ IgG4 ở người được tổng hợp, được kết hợp và được kết nối vào vector biểu hiện pCAGGS1 để tạo thành plasmit biểu hiện chuỗi nặng của kháng thể được nhân hóa.

Đối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ R11-16VL của kháng thể được nhân hóa được thiết kế, các DNA mã hóa vùng chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa được kết nối với vùng hằng định chuỗi kappa mà được tổng hợp và được kết hợp vào vectơ biểu hiện pCAGGS1 để tạo thành plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa.

Plasmit biểu thị chuỗi nặng và plasmit biểu thị chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa được trộn lẫn và đưa vào các tế bào bằng việc sử dụng Expi293 TM Expression System (Thermo Fisher Scientific), và bằng cách đó nhiều kháng thể được sản xuất bằng việc nhân hóa kháng thể IGF11-16 ở chuột được biểu hiện. Các kháng thể này được đặt tên là kháng thể R11-16B, kháng thể R11-16C, kháng thể R11-16D, kháng thể R11-16E, và kháng thể R11-16F, tương ứng: kháng thể R11-16B là kháng thể được nhân hóa được biểu hiện bằng sự kết hợp của plasmit biểu hiện chuỗi nặng kết hợp R11-16VH và plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kết hợp R11-16VL-C36Y; kháng thể R11-16C là kháng thể được nhân hóa được biểu hiện bằng sự kết hợp của plasmit biểu hiện chuỗi nặng kết hợp R11-16VH và plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kết hợp R11-16VL-C36A; kháng thể R11-16D là kháng thể được nhân hóa được biểu hiện bằng sự kết hợp của plasmit biểu hiện chuỗi nặng kết hợp R11-16VH và plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kết hợp R11-16VL-C36S; kháng thể R11-16E là kháng thể được nhân hóa được biểu hiện bằng sự kết hợp của plasmit biểu hiện chuỗi nặng kết hợp R11-16VH và plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kết hợp R11-16VL-C36F; và kháng thể R11-16F là kháng thể được nhân hóa được biểu hiện bằng sự kết hợp của plasmit biểu hiện chuỗi nặng kết hợp R11-16VH và plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ kết hợp R11-16VL-C36. Các kháng thể được nhân hóa được sản xuất bằng việc tinh chế ái lực chất lỏng bề mặt nuôi cấy

của tế bào vào các plasmit biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được nhân hóa mà được đưa vào qua cột protein A.

Ví dụ 3: Ái lực với thụ thể IGF-I (ELISA)

Các ái lực của các kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I với các thụ thể IGF-I của người (SEQ ID NO: 14, NP_000866), chuột lang (SEQ ID NO: 16, XP_003475316), khỉ đuôi dài (SEQ ID NO: 18, XP_005560575) và chuột nhắt (SEQ ID NO: 20, NP_434694) được kiểm tra bằng việc sử dụng các tế bào mà trong đó các thụ thể IGF-I được biểu hiện bằng ELISA dựa trên tế bào.

Các vector biểu hiện pEF1 (Thermo fisher) mà trong đó các gen thụ thể IGF-I ở người (SEQ ID NO: 15), chuột lang (SEQ ID NO: 17), khỉ đuôi dài (SEQ ID NO: 19) và chuột nhắt (SEQ ID NO: 21) được kết hợp được đưa vào các tế bào HEK239T bằng việc bao gói trong liposome. Các tế bào HEK239T được nuôi cấy trong ít nhất một đêm sau khi việc bao gói trong liposome được thêm vào đĩa nuôi cấy 96 giếng (được phủ với poly-D-lysine) trong 4×10^4 tế bào/giếng, và đĩa này được nuôi cấy trong ít nhất một đêm nữa được sử dụng trong ELISA.

Trong ELISA, 2 nM dung dịch kháng thể được nhân hóa trong 1% BSA/1% FBS/PBS (100 μ L) được thêm vào các giếng tương ứng và được phản ứng trong khoảng một giờ ở 37°C. Các giếng này được rửa ba lần bằng dung dịch tẩy rửa. Các dung dịch liên hợp HRP (100 μ L) của kháng thể kháng IgG ở người được điều chế ở các nồng độ khác nhau với 1% BSA/1% FBS/ BS được thêm vào các giếng tương ứng và được phản ứng trong khoảng một giờ ở 37°C. Mỗi giếng được rửa ba lần bằng dung dịch tẩy rửa. Chất nền TMB (100 μ L) được thêm vào mỗi giếng để khơi mào phản ứng. Khoảng 30 phút sau, axit sulfuric 1M (100 μ L) được thêm vào mỗi giếng để đo độ hấp thụ ở 450 nm và 650 nm và tính toán sự khác

biệt của các giá trị giữa 450 nm và 650 nm. Ái lực được tính dựa trên sự khác biệt giữa độ hấp thụ ở 450 nm và 650 nm đối với các tế bào không chứa gen thụ thể IGF-I, mà là các tế bào HEK293T (đó là, các tế bào tiêu chuẩn so sánh), làm giá trị tiêu chuẩn 1. Các kết quả được minh họa trong Bảng 2.

Bảng 2: Ái lực* của các kháng thể được nhân hóa với các thụ thể IGF-I khác nhau

Kháng thể được nhân hóa	Người	Khỉ đuôi dài	Chuột lang	Chuột nhắt
R11-16B	3,4	3,3	3,3	0,8
R11-16C	3,4	3,3	3,3	0,9
R11-16D	3,4	3,4	3,3	0,9
R11-16E	3,7	3,7	3,4	0,8
R11-16F	3,4	3,3	3,3	0,9

* Ái lực là giá trị so sánh với giá trị tiêu chuẩn 1 của các tế bào tiêu chuẩn so sánh (HEK293T).

Trong các tế bào biểu hiện các thụ thể IGF-I của người, khỉ đuôi dài và chuột lang, mỗi kháng thể được nhân hóa thể hiện ái lực gấp ba lần hoặc cao hơn ái lực của các tế bào tiêu chuẩn so sánh (HEK293T). Ngược lại, ái lực của các tế bào biểu hiện thụ thể IGF-I của chuột nhắt bằng với ái lực của tế bào tiêu chuẩn so sánh. Các kết quả này chỉ ra rằng mỗi kháng thể được nhân hóa liên kết với các thụ thể IGF-I của người, khỉ đuôi dài, và chuột lang, nhưng không phải đối với thụ thể IGF-I của chuột nhắt.

Ví dụ 4: Xác định epitop trong kháng thể được nhân hóa R11-16B

Kháng thể được nhân hóa R11-16B liên kết với các thụ thể IGF-I của người, khỉ đuôi dài và chuột lang, nhưng không phải với thụ thể IGF-I của chuột nhắt.

Ngoài ra, kháng thể IGF11-16 ở chuột to, mà là kháng thể chuột to (JP 2017-106529) có vai trò như cơ sở để thiết kế R11-16B, liên kết với miền CR trong thụ thể IGF-I ở người, nhưng không liên kết với miền CR trong thụ thể IGF-I ở chuột nhắt. Điều được giả định từ các kết quả này là epitop của R11-16B có trình tự axit amin chung cho người, khỉ đuôi dài và chuột lang, và trình tự axit amin khác biệt so với chuột nhắt trong số các trình tự axit amin của các miền CR trong các thụ thể IGF-I.

Ái lực của miền CR với các phân tử thể axit amin khác nhau được đo bằng ELISA để xác định vị trí mà axit amin trong miền CR của thụ thể IGF-I ở người R11-16B liên kết với. ELISA dựa trên tế bào được thực hiện bằng việc sử dụng các tế bào biểu hiện các thụ thể IGF-I mà trong đó trình tự axit amin được kỳ vọng để liên kết với R11-16B trong miền CR được biến đổi.

Hai phân tử thể axit amin trong miền CR được sử dụng như mô tả dưới đây. Tiêu chuẩn so sánh dương tính được sử dụng là vector biểu hiện pEF1 (Thermo fisher) mà được kết hợp với DNA mã hóa trình tự axit amin (SEQ ID NO: 22) mà trong đó thể FLAG (AspTyrLysAspAspAspAspLys) được liên kết với đầu cuối C của thụ thể IGF-I thuần chủng ở người (SEQ ID NO: 14, NP_000866). Các tế bào bao gồm vector biểu hiện pEF1 đơn được chỉ định làm Mock.

Phân tử thể 1 của miền CR

Trong trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người (SEQ ID NO: 14, NP_000866), axit aspartic, alanin, và axit glutamic tương ứng ở các vị trí 245, 247 và 294 được thay thế bằng asparagin, threonin và axit aspartic. DNA (SEQ ID NO: 23) mã hóa trình tự axit amin mà trong đó thể FLAG được liên kết với đầu cuối C của trình tự axit amin của thụ thể phần tử thể 1 được kết hợp vào vector

biểu hiện pEF1.

Phần tử thế 2 của miền CR

Trong trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người (SEQ ID NO: 14, NP_000866), glyxin và serin tương ứng ở các vị trí 315 và 316 được thay thế bằng serin và threonin. DNA (SEQ ID NO: 24) mã hóa trình tự axit amin mà trong đó thẻ FLAG được liên kết với đầu cuối C của trình tự axit amin của thụ thể phần tử thế 2 được kết hợp vào vector biểu hiện pEF1.

Các tế bào 293T được cấy trong các đĩa 10-cm mà được phủ bằng poly-D-lysine trong 6×10^6 tế bào. Vào ngày tiếp theo, mỗi DNA plasmit được đưa vào các tế bào bằng việc bao gói trong liposome. Hai ngày sau, các tế bào 293T được tách ra bằng trypsin/EDTA 0,05% và được làm lơ lửng trong môi trường nuôi cấy. Các tế bào 293T này được thêm vào đĩa nuôi cấy 96 giếng (được phủ bằng poly-D-lysine) trong 2×10^4 tế bào/giếng và được ủ qua đêm ở 37°C dưới 5% CO₂. Môi trường được loại bỏ khỏi đĩa nuôi cấy 96 giếng này. Đĩa này được cố định bằng đệm focmalin 10% (Mildform® 10NM, Wako), được thay thế bằng đệm khóa màng (3% BSA/PBS/0,02% natri azit), và được sử dụng cho ELISA.

Trong ELISA, dung dịch R11-16B 5nM trong đệm khóa màng (50 µL) được thêm vào mỗi giếng và được phản ứng trong khoảng một giờ ở nhiệt độ phòng. Mỗi giếng này được rửa hai lần bằng dung dịch tẩy rửa. Dung dịch được pha loãng bậc 2500 của dung dịch liên hợp ALP kháng thể kháng IgG ở người (2087-04, Southern Biotech) trong đệm khóa màng (50 µL) được thêm vào mỗi giếng và được phản ứng trong khoảng một giờ ở nhiệt độ phòng. Mỗi giếng được rửa ba lần bằng dung dịch tẩy rửa. Chất nền pNPP (100 µL) được thêm vào mỗi giếng để khơi mào phản ứng. Độ hấp thụ ở 450nm và 550 nm được đo sau khoảng một

giờ. Giá trị được đưa ra bằng việc trừ giá trị của nhóm không được thêm R11-16B cho giá trị của nhóm được thêm R11-16B được xác định làm ái lực. Các kết quả được minh họa trong Bảng 3.

Bảng 3: Ái lực của R11-16B với thụ thể IGF-I ở người và các phần tử thể axit amin của chúng

	Mock	Thụ thể IGF-I ở người	Phần tử thể 1	Phần tử thể 2
Ái lực	0,328	0,835	0,885	0,308

Ái lực của R11-16B với thụ thể IGF-I gấp hai lần hoặc cao hơn so với ái lực đến Mock. Ái lực đến phần tử thể 1 bằng với ái lực đến thụ thể IGF-I ở người. Ngược lại, ái lực đến phần tử thể 2 bằng với ái lực đến Mock, mà chỉ ra không có sự cải thiện ái lực. Các kết quả này chỉ ra rằng các axit amin ở các vị trí 315 và 316 của thụ thể IGF-I là cần thiết cho ái lực của R11-16B với thụ thể IGF-I ở người.

Các kết quả này gợi ý rằng vị trí liên kết của R11-16B với thụ thể IGF-I ở người nằm trong vùng phụ cận của Gly (glyxin) hoặc Ser (serin) ở các vị trí 315 và 316 tương ứng. Nói chung, dựa trên số thứ tự nhận dạng của tám gốc axit amin (nghĩa là giá trị của sáu đến mười gốc) bằng kháng thể và phản ứng chéo của R11-16B (không có ái lực với thụ thể IGF-I ở chuột nhắt, và có ái lực với các thụ thể IGF-I ở người và chuột lang), trình tự của thụ thể IGF-I ở người tại các vị trí liên kết đến R11-16B được tin là ProSerGlyPheIleArgAsnGly*Ser*GlnSerMet (Gly*Ser* chỉ ra trình tự axit amin ở các vị trí 315 và 316).

Ví dụ 5: Hoạt tính tăng sinh tế bào trên các nguyên bào cơ người

Các chất khác nhau được thêm vào các nguyên bào cơ người, và hàm lượng ATP trong các tế bào được đo sau bốn ngày để kiểm tra hoạt tính tăng sinh của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I trên các nguyên bào cơ người.

Các tế bào nguyên bào cơ xương của người bình thường (HSMM, Lonza) được cấy vào đĩa nuôi cấy 96 giếng (được phủ Collagen loại I) trong 0,1 mL/giếng (2×10^3 tế bào/giếng) bằng việc sử dụng môi trường SkBM-2 (CC-3246, Lonza) chứa 1% BSA, và đĩa này được ủ ở 37°C dưới 5% CO₂. Vào ngày tiếp theo sau khi cấy các tế bào, các chất khác nhau được thêm vào trong 25 µL/giếng, và đĩa này được ủ trong bốn ngày ở 37°C dưới 5% CO₂. Hàm lượng ATP trong các tế bào làm chỉ số của sự tăng sinh tế bào được đo bằng thử nghiệm khả năng sống sót của tế bào phát quang CellTiter-Glo® (Promega). Chất lỏng bề mặt này được loại bỏ khỏi đĩa nuôi cấy 96 giếng mà được ủ trong bốn ngày sao cho dung dịch nuôi cấy đạt 50 µL/giếng, và đĩa này được để yên trong 30 phút hoặc lâu hơn ở nhiệt độ phòng. Thuốc thử CellTiter-Glo® được thêm vào đĩa này trong 50 µL/giếng và được phản ứng trong mười phút hoặc lâu hơn, và sau đó tín hiệu phát quang được đo bằng máy quang kế (Berthold). Hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào ở người được tính trong đó hoạt tính của nhóm mà dung môi được thêm vào riêng lẻ được xác định là 100%. Các kết quả được minh họa trong các Bảng 4 đến 6.

Bảng 4: Hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào cơ ở người trong trường hợp bổ sung các chất khác nhau ở 0,5 nM

Tác nhân	Hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào cơ ở người (%)
R11-16B	135
Kháng thể IGF11-16 ở chuột to	137
IGF-I	123

Việc thêm R11-16B vào trong lượng 0,0000005, 0,000005, 0,00005, 0,0005, 0,005, 0,05, 0,5, 5, hoặc 50 nM đã tăng cường hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào cơ ở người phụ thuộc vào nồng độ. Các giá trị EC₅₀ của hoạt tính tăng sinh

của R11-16B, kháng thể IGF11-16 ở chuột to và IGF-I trên các nguyên bào cơ ở người tương ứng là 0,002, 0,002 và 0,95 nM. Hoạt tính của R11-16B bằng với hoạt tính của kháng thể IGF11-16 ở chuột to và gấp 100 lần hoặc cao hơn hoạt tính của IGF-I.

Bảng 5: Hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào cơ ở người trong trường hợp bổ sung các chất khác nhau trong 0,5 nM và 0,005 nM

Tác nhân	Nồng độ (nM)	Hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào cơ ở người (%)	
		Thí nghiệm 1	Thí nghiệm 2
IGF-I	0,005	108	110
R11-16B		147	148
R11-16C		150	143
R11-16D		144	149
R11-16E		150	143
R11-16F		146	148
IGF-I	0,5	133	125
R11-16B		164	164
R11-16C		178	172
R11-16D		160	169
R11-16E		166	164
R11-16F		161	156

Việc thêm R11-16B, R11-16C, R11-16D, R11-16E, R11-16F vào lượng 0,00005, 0,0005, 0,005, 0,05, 0,5, 5 hoặc 50 nM đã tăng cường hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào cơ ở người phụ thuộc vào nồng độ. Tất cả các giá trị EC_{50} của hoạt tính tăng sinh của R11-16B, R11-16C, R11-16D, R11-16E và R11-16F

trên các nguyên bào cơ ở người là 0,002 nM. Mỗi kháng thể được nhân hóa có hoạt tính cao hơn gấp 100 lần hoặc cao hơn hoạt tính của IGF-I.

Bảng 6: Hoạt tính tăng sinh trên các nguyên bào cơ ở người trong trường hợp bổ sung các chất khác nhau trong 0,5 nM và 0,005 nM

Tác nhân	Nồng độ (nM)	Thí nghiệm 1	Thí nghiệm 2
		Hoạt tính tăng sinh tế bào (%)	Hoạt tính tăng sinh tế bào (%)
Kháng thể tiêu chuẩn so sánh (kháng thể FLAG M2)	0,005	99	-
IGF-I	0,005	102	103
R11-16B	0,005	-	127
16-13	0,005	-	102
26-3	0,005	-	108
Dung môi tiêu chuẩn so sánh 1* (chứa natri azit)	-	-	104
Kháng thể tiêu chuẩn so sánh (kháng thể FLAG M2)	0,5	98	-
IGF-I	0,5	133	137
R11-16B	0,5	-	140
16-13	0,5	-	109
26-3	0,5	-	119
Dung môi tiêu chuẩn so sánh 2* (chứa natri azit)	-	-	112
* Các dung môi tiêu chuẩn so sánh 1 và 2 tương ứng chứa natri azit trong nồng độ 0,005 nM và 0,5 nM là cùng nồng độ của các kháng thể 16-13 và 26-3.			

IGF-I tăng cường hoạt tính tăng sinh so với kháng thể tiêu chuẩn so sánh (FLAG M2, Sigma-Aldrich).

Kháng thể 16-13 và kháng thể 26-3 được mô tả trong Tài liệu phi sáng chế 35 (đó là, các kháng thể chất chủ vận mà có hiệu quả in vitro để tăng cường tổng hợp DNA tế bào và sự hấp thụ glucoza) được biểu hiện không có hoạt tính tăng sinh đáng kể so với dung môi tiêu chuẩn so sánh (chứa natri azit) và hoạt tính thấp hơn hoạt tính của R11-16B.

Ví dụ 6: Hiệu quả in vivo (tăng hiệu quả trong khối lượng cơ ở chuột lang)

Hiệu quả in vivo của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I được xác nhận bằng sự so sánh với hiệu quả của việc đưa vào liên tục IGF-I.

Liều đơn R11-16B duy nhất được đưa vào chuột lang, và khối lượng cơ được đo sau hai tuần. Hiệu quả làm tăng khối lượng cơ được xác nhận bằng hiệu quả mà dẫn đến tăng khối lượng cơ của chuột lang từ 5% hoặc cao hơn so với nhóm tiêu chuẩn so sánh. Liều đơn R11-16B (0,1 và 0,3 mg/kg) được tiêm tĩnh mạch ở chuột lang bình thường. Tiêu chuẩn so sánh dương tính là chuột lang mà trong đó IGF-I tái tổ hợp ở người (mecasermin) được cấy vào dưới da bằng việc sử dụng bơm thẩm thấu (Alzet) và được đưa vào liên tục ở lượng 0,3 và 1 mg/kg/ngày. Hai tuần sau sự đưa vào, chuột lang được lấy máu khi gây mê, và trọng lượng của cơ duỗi dài các chi được đo. Các kết quả được minh họa trong Fig. 2.

Trong nhóm (R11-16B) mà trong đó R11-16B được tiêm vào tĩnh mạch ở lượng 0,1 và 0,3 mg/kg, khối lượng cơ tăng lên phụ thuộc vào liều lượng và được tăng lên đáng kể so với nhóm tiêu chuẩn so sánh (dung môi) mà trong đó dung môi được thêm vào riêng lẻ.

Sự tăng khối lượng cơ của nhóm R11-16B đưa vào riêng lẻ ở lượng 0,3 mg/kg gần như bằng với sự tăng khối lượng cơ của nhóm (IGF-I) mà trong đó IGF-I tái tổ hợp ở người được đưa vào liên tục ở lượng 1 mg/kg/ngày. Kết quả này chỉ ra rằng việc đưa R11-16B vào riêng lẻ có hiệu quả tương đương việc đưa vào liên tục IGF-I. Do liều lượng lâm sàng của IGF-I (mecasermin) được đưa vào một hoặc hai lần hàng ngày và, ngược lại, việc đưa vào in vivo R11-16B một lần mỗi hai tuần có hiệu quả tương đương với việc đưa vào liên tục IGF-I, R11-16B này biểu hiện độ bền vượt trội so với IGF-I.

Ví dụ 7: Tác động hạ đường huyết in vivo (tác động hạ đường huyết ở chuột lang)

Liều R11-16B riêng lẻ được đưa vào chuột lang, và mức đường huyết được đo với thời gian và được so sánh với tác động hạ đường huyết trong việc đưa IGF-I vào riêng lẻ để xác minh sự tồn tại của tác động hạ đường huyết in vivo của kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I. Tác động hạ đường huyết được xác nhận bằng tác động mà hạ thấp mức đường huyết xuống 50 mg/dL hoặc thấp hơn hoặc gây ra triệu chứng hạ đường huyết.

Tác động hạ đường huyết của IGF-I được kiểm tra. Chuột lang bị cho nhịn ăn trong 12 giờ và liều IGF-I tái tổ hợp ở người (mecasermin) riêng lẻ được đưa vào liên tục với lượng 0,3, 1,3 và 10 mg/kg. Chuột lang bị cho nhịn ăn đến 24 giờ sau sự đưa vào này. Các mẫu máu được thu lại từ các con chuột lang tỉnh táo trước khi đưa vào (0 giờ) và tại 1, 2, 4, 8, và 24 giờ sau khi đưa vào, các mức đường huyết được đo bằng máy cảm biến Glutest (Sanwa Kagaku Kenkyusho). Các kết quả được minh họa trong Bảng 7.

Bảng 7: Tác động hạ đường huyết của IGF-I ở chuột lang nhịn ăn

Thời gian (Giờ)	Nhóm dung môi tiêu chuẩn so sánh	Nhóm IGF-I đưa vào (mg/kg)			
		0,3	1	3	10
0	114	93	108	92	94
1	116	77	35	30	20
2	115	31	20	20	20
4	105	48	20	20	20
8	99	94	35	24	-
24	95	85	95	101	-

Các giá trị trong bảng này chỉ ra mức đường huyết trung bình (mg/dL).

Thấp hơn giới hạn có thể đo thấp hơn của mức đường huyết (thấp hơn 20mg/dL) được chỉ ra là 20.

-: Không có dữ liệu do tất cả các cá thể đều chết.

IGF-I hạ thấp đáng kể mức đường huyết trong lượng 0,3 mg/kg hoặc nhiều hơn, các triệu chứng hạ đường huyết xảy ra ở lượng 1mg/kg hoặc nhiều hơn, và các trường hợp tử vong được ghi lại trong lượng 3 mg/kg hoặc nhiều hơn.

Các tác động của R11-16B, R11-16C, R11-16D, R11-16E và R11-16F đối với mức đường huyết được kiểm tra. Chuột lang bị cho nhịn ăn trong vòng 12 giờ và mỗi kháng thể được nhân hóa được đưa vào với lượng 10mg/kg ở liều tĩnh mạch đơn. Chuột lang bị cho nhịn ăn đến 24 giờ sau khi đưa vào. Các mẫu máu được thu lại từ các con chuột lang tỉnh táo trước khi đưa vào (0 giờ) và tại 1, 2, 4, 8, và 24 giờ sau khi đưa vào, và mức đường huyết được đo bằng máy cảm biến Glutest (Sanwa Kagaku Kenkyusho). Các kết quả được minh họa trong các Bảng 8 đến 10.

Bảng 8: Tác động của R11-16B đối với mức đường huyết* ở chuột lang nhịn ăn

Thời gian (Giờ)	Nhóm dung môi tiêu chuẩn so sánh	Nhóm đưa vào R11-16B (10 mg/kg)
0	90	81
1	81	82
2	79	78
4	81	68
8	87	74
24	79	70

* Các giá trị trong bảng này chỉ ra mức đường huyết trung bình (mg/dL).

Bảng 9: Tác động của R11-16C và R11-16D đối với mức đường huyết* ở chuột lang nhịn ăn

Thời gian (Giờ)	Nhóm dung môi tiêu chuẩn so sánh	Nhóm đưa vào R11-16C (10mg/kg)	Nhóm đưa vào R11-16D (10mg/kg)
0	91	88	95
1	90	94	87
2	92	91	91
4	84	80	77
8	80	76	80
24	79	78	72

* Các giá trị trong bảng này chỉ ra mức đường huyết trung bình (mg/dL).

Bảng 10: Tác động của R11-16E và R11-16F đối với mức đường huyết* ở chuột lang nhin ăn

Thời gian (Giờ)	Nhóm dung môi tiêu chuẩn so sánh	Nhóm đưa vào R11-16E (10mg/kg)	Nhóm đưa vào R11-16F (10mg/kg)
0	103	103	101
1	92	102	102
2	91	96	103
4	91	94	95
8	94	100	106
24	92	94	87

* Các giá trị trong bảng này chỉ ra mức đường huyết trung bình (mg/dL).

Mỗi kháng thể được nhân hóa có mức đường huyết 50 mg/dL hoặc cao hơn sau khi đưa vào mà biểu hiện khác biệt không đáng kể với nhóm dung môi tiêu chuẩn so sánh mà trong đó dung môi được đưa vào riêng lẻ. Các kết quả này chứng minh rằng mỗi kháng thể được nhân hóa có tác động hạ đường huyết không đáng kể và không tác động đối với mức đường huyết, không giống như IGF-I, và bằng cách đó mỗi kháng thể được nhân hóa biểu hiện tiềm năng cao làm chất mà có thể khắc phục sự hạ đường huyết, mà là tác dụng phụ trong sử dụng IGF-I.

Ví dụ 8: Các động lực học máu của IGF-I và R11-16B (các động lực học máu ở chuột lang)

Động lực học máu của IGF-I

Chuột lang bị cho nhin ăn trong 12 giờ và IGF-I tái tổ hợp ở người được đưa vào liên tục ở lượng 0,3, 1,3 và 10 mg/kg. Chuột lang bị cho nhin ăn đến 24 giờ sau khi đưa vào. Các mẫu máu được thu lại từ các con chuột lang tỉnh táo trước

khi đưa vào (0 giờ) và tại 1, 2, 4, 8, 10 và 24 sau khi đưa vào, và nồng độ của IGF-I ở người trong huyết tương được đo bằng ELISA (DG100, R&D). Các kết quả được minh họa trong Fig. 3.

Nồng độ IGF-I trong huyết tương tăng tùy thuộc vào liều lượng, và nồng độ IGF-I trong huyết tương giảm xuống còn khoảng 50% hoặc thấp hơn đỉnh tối đa tại 24 giờ sau khi đưa vào. Nồng độ IGF-I trong nhóm đưa vào với lượng 0,3 mg/kg đạt dưới giới hạn có thể đo thấp hơn tại 24 giờ sau khi đưa vào. Trong nhóm đưa vào ở lượng 10 mg/kg, huyết tương không thể lấy được vì chuột lang chết do hạ đường huyết sau 4 giờ sau khi đưa vào.

Các động lực học máu của kháng thể được nhân hóa

Chuột lang bị cho nhịn ăn trong 12 giờ và kháng thể được nhân hóa R11-16B được đưa vào liên tục ở lượng 1,5 và 10 mg/kg ở liều tĩnh mạch đơn. Chuột lang bị cho nhịn ăn đến 24 giờ sau khi đưa vào. Các mẫu máu được thu lại từ các con chuột lang tỉnh táo trước khi đưa vào (0 giờ) và tại 2, 4, 8, 24, 48 và 72 giờ sau khi đưa vào, nồng độ của kháng thể được nhân hóa trong huyết tương được đo bằng ELISA. Các kết quả được minh họa trong Fig. 4.

Nồng độ của kháng thể được nhân hóa trong huyết tương tăng phụ thuộc vào liều lượng, và nồng độ của kháng thể được nhân hóa trong huyết tương được duy trì ở khoảng 50% hoặc cao hơn ngay cả tại 48 giờ hoặc lâu hơn sau khi đưa vào so với nồng độ tại 24 giờ sau khi đưa vào. Các động lực học máu của kháng thể được nhân hóa biểu thị độ bền vượt trội hơn so với IGF-I.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết trực tiếp với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống, và bằng cách đó làm tăng khối lượng cơ thông qua thụ thể

IGF-I, nhưng không hạ thấp mức đường huyết. Do đó, sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, phòng ngừa, hoặc chẩn đoán các bệnh liên quan đến kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó chứa:

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 1, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 1 thông qua việc thế một gốc axit amin, làm trình tự CDR-1 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H1);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 2 thông qua việc thế một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-2 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H2);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3 thông qua việc thế một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H3);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4 thông qua việc thế một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L1);

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5 thông qua việc thế một gốc axit amin, làm trình tự CDR-2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L2); và

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6 thông qua việc thể một hoặc hai gốc axit amin, làm trình tự CDR-3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L3);

trong đó kháng thể, đoạn hoặc dẫn xuất của nó liên kết riêng biệt với vùng liên kết chứa các gốc axit amin ở các vị trí 315 và 316 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 (thụ thể IGF-I ở người).

2. Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm 1, chứa:

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7 thông qua việc thể, loại bỏ, hoặc thêm một hoặc nhiều gốc axit amin, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng; và

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8, hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8 thông qua việc thể, loại bỏ, hoặc thêm một hoặc nhiều gốc axit amin, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

3. Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm 1 hoặc 2, chứa:

trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng; và

trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, và 12, làm trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

4. Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3, chứa:

các vùng hằng định của mỗi lớp globulin miễn dịch ở người, làm các vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

5. Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm 4, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng là vùng hằng định chuỗi nặng của IgG ở người lớp 4.

6. Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 5, mà liên kết với epitop chứa peptit có trình tự axit amin tương ứng với các gốc axit amin số 308 đến 319 (ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet) của SEQ ID NO:14 (thụ thể IGF-I ở người) hoặc vùng trong vùng phụ cận của nó.

7. Phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit mã hóa kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 6.

8. Vector tách dòng hoặc vector biểu hiện mà chứa ít nhất một phân tử axit nucleic theo điểm 7.

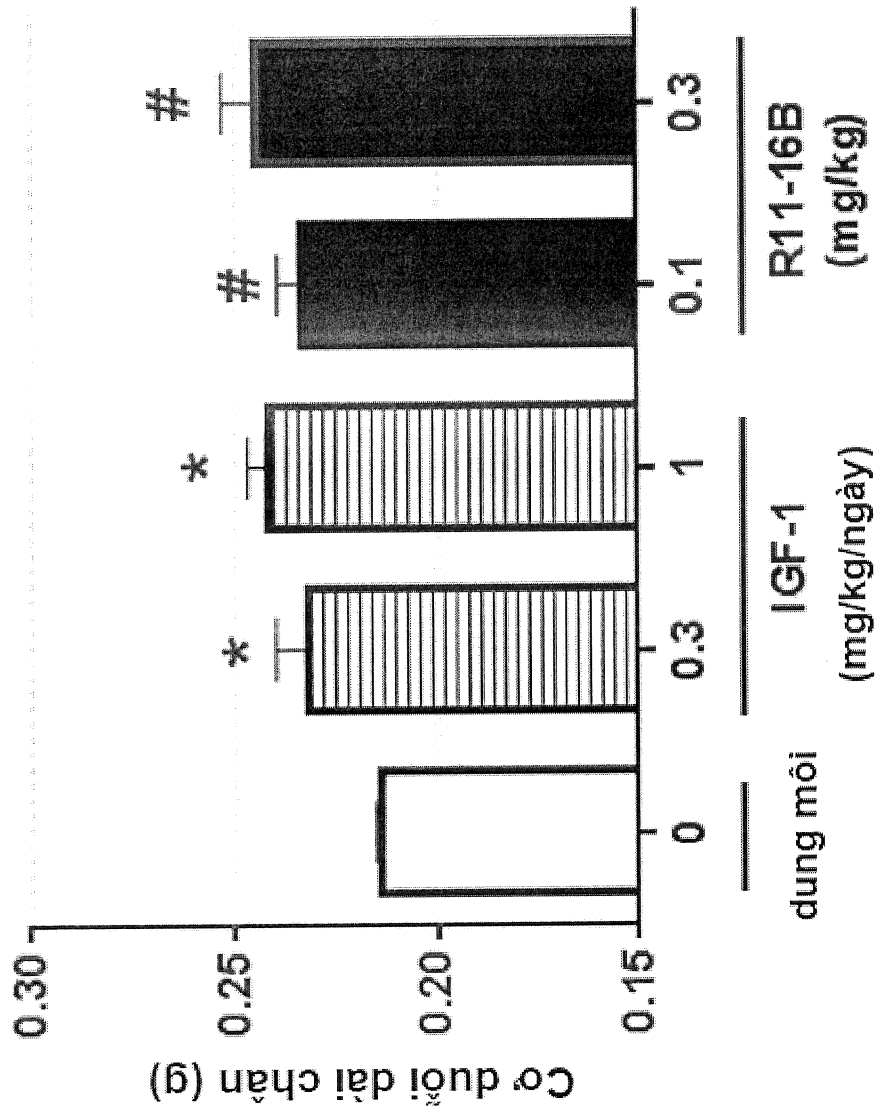
9. Tế bào tái tổ hợp được dẫn xuất bằng việc đưa vector theo điểm 8 vào tế bào chủ.

10. Quy trình sản xuất kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 6, bao gồm:

nuôi cấy tế bào tái tổ hợp theo điểm 9; và

tinh chế kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó mà được tạo ra bởi tế bào tái tổ hợp.

11. Dược phẩm chứa kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 6, phân tử axit nucleic theo điểm 7, vector theo điểm 8, hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm 9 làm thành phần hoạt tính.



Trung bình, SEM, n=6-8

*, #: $p < 0.05$, thử nghiệm Shirley-Williams, so với dung môi

FIG. 2

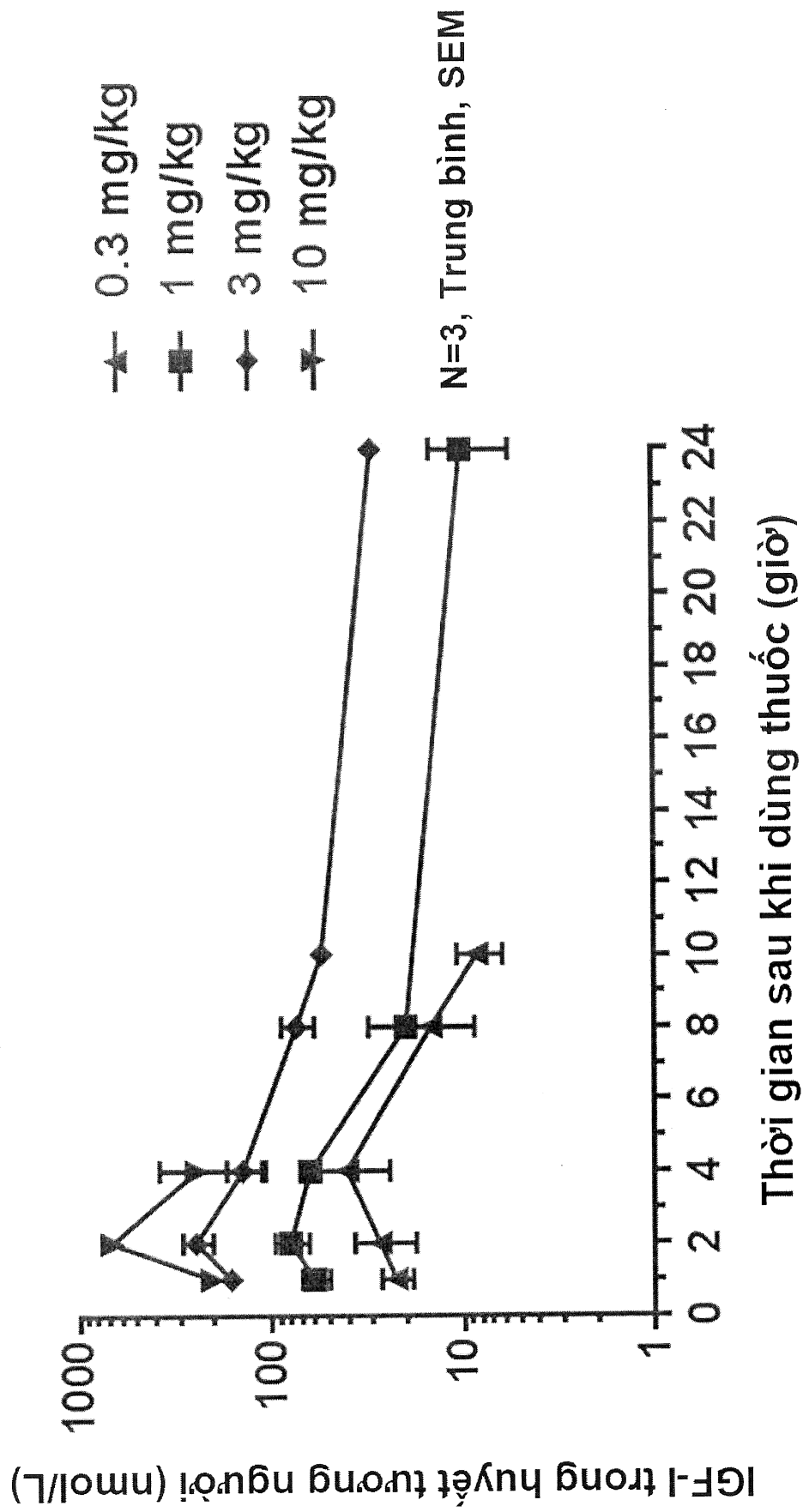


FIG. 3

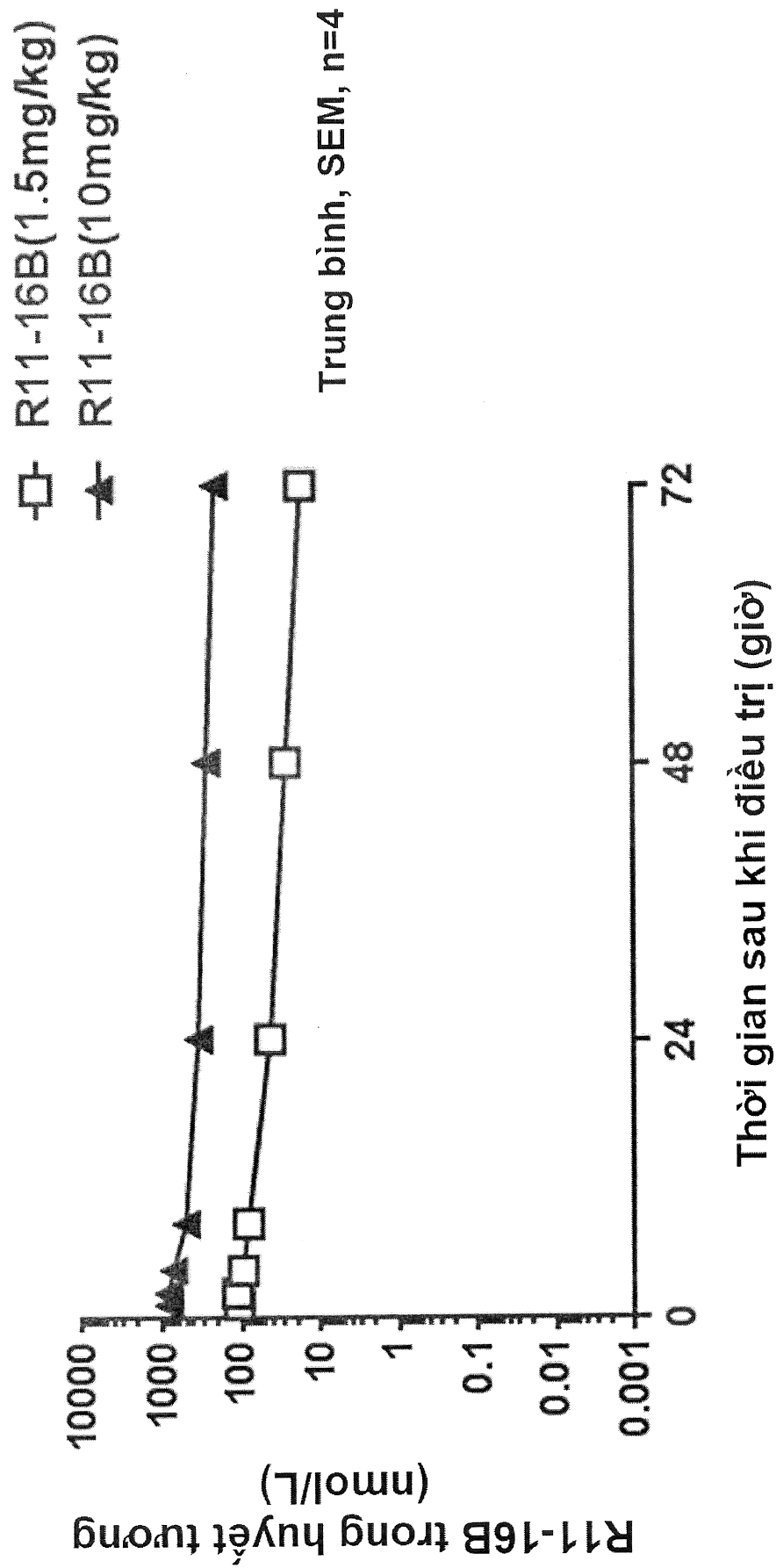


FIG. 4

TRÌNH TỰ LIỆT KÊ

<110> Teijin Pharma Limited
KM Biologics Co., Ltd.

<120> Kháng thể được nhân hóa kháng thụ thể IGF-I, phân tử axit nucleic,
vectơ tách dòng chứa phân tử axit nucleic này, tế bào tái tổ hợp,
được phẩm và quy trình sản xuất kháng thể này

<130> P190562WO

<150> 2018-226669

<151> 2018-12-03

<160> 24

<170> Sáng chế phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-H1

<400> 1

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDR-H2

<400> 2

Glu Thr Asn Pro Ser Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR-H3

<400> 3

Gly Arg Gly Arg Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CDR-L1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Phe Trp Leu Ser
1 5 10

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

<220>
<223> CDR-L2

<400> 5

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

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

<220>

<223> CDR-L3

<400> 6

Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> R11-16VH

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Thr Asn Pro Ser Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Thr Ile Gly Arg Gly Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R11-16VL-C36Y

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Phe Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His 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 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R11-16VL-C36A

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Phe Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Ala Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His 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 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> R11-16VL-C36S

<400> 10

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Phe Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His 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 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> R11-16VL-C36F

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Phe Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His 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 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> R11-16VL-C36

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Phe Trp
20 25 30

Leu Ser Trp Cys Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His 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 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 13

<211> 70

<212> PRT

<213> Người tinh khôn

<220>

<223> IGF-I ở người trưởng thành

<400> 13

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65 70

<210> 14
<211> 1367
<212> PRT
<213> Người tinh khôn

<220>
<223> Thụ thể IGF-I ở người

<400> 14

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
930 935 940

Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
945 950 955 960

Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
965 970 975

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
980 985 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
995 1000 1005

Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
1010 1015 1020

Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
1025 1030 1035

Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
1040 1045 1050

Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
1055 1060 1065

Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
1070 1075 1080

Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met
1085 1090 1095

Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
1100 1105 1110

Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
1115 1120 1125

Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val
1130 1135 1140

Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg
1145 1150 1155

Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu
1160 1165 1170

Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val
1175 1180 1185

Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp
1190 1195 1200

Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn
1205 1210 1215

Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
1220 1225 1230

Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys
1235 1240 1245

Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile
 1250 1255 1260

Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser
 1265 1270 1275

Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu
 1280 1285 1290

Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser
 1295 1300 1305

Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His
 1310 1315 1320

Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
 1325 1330 1335

Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
 1340 1345 1350

Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
 1355 1360 1365

<210> 15

<211> 4128

<212> DNA

<213> Người tinh khôn

<220>

<223> Thụ thể IGF-I ở người

<400> 15

atgaagtctg gctccggagg aggggtccccg acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc 60

gccgcgctct cgctctggcc gacgagtga gaaatctgcg ggccaggcat cgacatccgc 120

aacgactatc agcagctgaa gcgcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac 180

atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gttccccaa gtcacggtc	240
attaccgagt acttgctgct gttccgagtg gctggcctcg agagcctcgg agacctcttc	300
cccaacctca cggtcatccg cggctggaaa ctcttctaca actacgccct ggtcatcttc	360
gagatgacca atctcaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcggggggcc	420
atcaggattg agaaaaatgc tgacctctgt tacctctcca ctgtggactg gtccctgac	480
ctggatgcgg tgtccaataa ctacattgtg gggaataagc ccccaaagga atgtggggac	540
ctgtgtccag ggaccatgga ggagaagccg atgtgtgaga agaccacat caacaatgag	600
tacaactacc gctgctggac cacaaaccgc tgccagaaaa tgtgcccaag cacgtgtggg	660
aagcgggcgt gcaccgagaa caatgagtgc tgccaccccg agtgccctggg cagctgcagc	720
gcgcctgaca acgacacggc ctgtgtagct tgccgccact actactatgc cggtgtctgt	780
gtgcctgcct gcccgccaa cacctacagg tttgagggct ggcgctgtgt ggaccgtgac	840
ttctgcgcca acatcctcag cgcgagagc agcgactccg aggggtttgt gatccacgac	900
ggcgagtga tgcaggagtg cccctcgggc ttcatccgca acggcagcca gagcatgtac	960
tgcacccctt gtgaaggctc ttgcccgaag gtctgtgagg aagaaaagaa aacaaagacc	1020
attgattctg ttacttctgc tcagatgctc caaggatgca ccatcttcaa gggcaatttg	1080
ctcattaaca tccgacgggg gaataacatt gcttcagagc tggagaactt catggggctc	1140
atcgaggctg tgacgggcta cgtgaagatc cgccattctc atgccttggt ctccctgtcc	1200
ttcctaataa accttcgcct catcctagga gaggagcagc tagaaggga ttactccttc	1260
tacgtcctcg acaaccagaa cttgcagcaa ctgtgggact gggaccaccg caacctgacc	1320
atcaaagcag ggaaaatgta ctttgctttc aatcccaa atgtgtgttc cgaaatttac	1380
cgcatggagg aagtgcggg gactaaaggc cgccaaagca aaggggacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg agagagcctc ctgtgaaagt gacgtcctgc atttcacctc caccaccacg	1500
tcgaagaatc gcatcatcat aacctggcac cggtagccgc cccctgacta cagggatctc	1560
atcagcttca ccgtttacta caaggaagca ccctttaaga atgtcacaga gtatgatggg	1620

caggatgcct gcggctccaa cagctggaac atggtggacg tggacctccc gcccaacaag	1680
gacgtggagc ccggcatctt actacatggg ctgaagccct ggactcagta cgccgtttac	1740
gtcaaggctg tgacctcac catggtggag aacgaccata tccgtggggc caagagttag	1800
atcttgtaga ttgcaccaa tgcttcagtt ccttcattc ccttgtagct tctttcagca	1860
tgaactcct cttctcagtt aatcgtgaag tggaaccctc cctctctgcc caacggcaac	1920
ctgagttact acattgtgcg ctggcagcgg cagcctcagg acggctacct ttaccggcac	1980
aattactgct ccaaagacaa aatccccatc aggaagtatg ccgacggcac catcgacatt	2040
gaggaggtca cagagaaccc caagactgag gtgtgtggtg gggagaaagg gccttgctgc	2100
gcctgcccc aactgaagc cgagaagcag gccgagaagg aggaggctga ataccgcaaa	2160
gtctttgaga atttcctgca caactccatc ttctgtccca gacctgaaag gaagcggaga	2220
gatgtcatgc aagtggccaa caccaccatg tccagccgaa gcaggaacac caccggccga	2280
gacacctaca acatcaccga cccggaagag ctggagacag agtacccttt ctttgagagc	2340
agagtggata acaaggagag aactgtcatt tctaaccttc ggcttttcac attgtaccgc	2400
atcgatatcc acagctgcaa ccacgaggct gagaagctgg gctgcagcgc ctccaacttc	2460
gtctttgcaa ggactatgcc cgcagaagga gcagatgaca ttcttgggcc agtgacctgg	2520
gagccaaggc ctgaaaactc catcttttta aagtggccgg aacctgagaa tccaatgga	2580
ttgattctaa tgtatgaaat aaaatacggg tcacaagttg aggatcagcg agaatgtgtg	2640
tccagacagg aatacaggaa gtatggaggg gccaagctaa accggctaaa cccggggaac	2700
tacacagccc ggattcaggc cacatctctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg	2760
ttcttctatg tccaggccaa aacaggatat gaaaacttca tccatctgat catcgctctg	2820
cccgtcgtg tctgttgat cgtgggaggg ttggtgatta tgctgtacgt cttccataga	2880
aagagaaata acagcaggct ggggaatgga gtgctgtatg cctctgtgaa cccggagtac	2940
ttcagcgtg ctgatgtgta cgttcctgat gagtgggagg tggctcggga gaagatcacc	3000

atgagccggg aacttgggca ggggtcgttt gggatggtct atgaaggagt tgccaagggt 3060
 gtggtgaaag atgaacctga aaccagagtg gccattaaaa cagtgaacga ggccgcaagc 3120
 atgcgtgaaa ggattgagtt tctcaacgaa gcttctgtga tgaaggagtt caattgtcac 3180
 catgtggtgc gattgctggg tgtggtgtcc caaggccagc caacactggg catcatggaa 3240
 ctgatgacac ggggcatct caaaagttat ctccggtctc tgaggccaga aatggagaat 3300
 aatccagtcc tagcacctcc aagcctgagc aagatgattc agatggccgg agagattgca 3360
 gacggcatgg catacctcaa cgccaataag ttctgccaca gagaccttgc tgcccgaat 3420
 tgcattgtag ccgaagattt cacagtcaaa atcggagatt ttggtatgac gcgagatctc 3480
 tatgagacag actattaccg gaaaggaggg aaagggtgc tgcccgctgc ctggatgtct 3540
 cctgagtccc tcaaggatgg agtcttcacc acttactcgg acgtctgggc cttcgggggc 3600
 gtccctctggg agatcgccac actggccgag cagccctacc agggcttgtc caacgagcaa 3660
 gtccctcgtc tcgtcatgga gggcggcctt ctggacaagc cagacaactg tctgacatg 3720
 ctgtttgaac tgatgcgcat gtgctggcag tataacccca agatgaggcc ttccttctg 3780
 gagatcatca gcagcatcaa agaggagatg gagcctggct tccgggaggt ctcttctac 3840
 tacagcgagg agaacaagct gcccagaccg gaggagctgg acctggagcc agagaacatg 3900
 gagagcgtcc ccttggaacc ctcggcctcc tcgtcctccc tgccactgcc cgacagacac 3960
 tcaggacaca aggccgagaa cgccccggc cctgggggtgc tggctcctccg cgccagcttc 4020
 gacgagagac agccttacgc ccacatgaac gggggccgca agaacgagcg ggccttgccg 4080
 ctgccccagt cttcgacctg cgattataag gatgacgatg acaagtag 4128

<210> 16

<211> 1367

<212> PRT

<213> Chuột lang nhà

<220>

<223> Thụ thể IGF-I ở chuột lang nhà

<400> 16

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Ser Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Leu Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Ala Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Tyr Gln Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225 230 235 240

Ala Pro Asp Asp Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Phe Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gly Ile Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val His Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ser Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe Thr
485 490 495

Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560

Asp Ala Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Ser Tyr
645 650 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Arg Arg Arg Asp Val Ala Gln Met Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ala Thr Asp Pro
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Ala Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Ser Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys Thr
915 920 925

Thr Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Ile
930 935 940

Leu Leu Ile Val Ala Gly Leu Ala Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
945 950 955 960

Lys Arg Asn Ser Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
965 970 975

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
980 985 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
995 1000 1005

Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
1010 1015 1020

Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
1025 1030 1035

Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
1040 1045 1050

Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
1055 1060 1065

Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
1070 1075 1080

Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Val
1085 1090 1095

Glu Asn Ser Pro Ile Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
1100 1105 1110

Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
1115 1120 1125

Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val
1130 1135 1140

Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg
1145 1150 1155

Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu
1160 1165 1170

Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val
1175 1180 1185

Phe Thr Thr His Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp
1190 1195 1200

Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn
1205 1210 1215

Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
1220 1225 1230

Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys
1235 1240 1245

Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile
1250 1255 1260

Ser Ser Val Lys Asp Glu Leu Glu Ala Gly Phe Arg Glu Val Ser
1265 1270 1275

Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Pro Pro Glu Pro Glu Glu Leu
 1280 1285 1290

Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser
 1295 1300 1305

Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Pro Pro Asp Arg His Ser Gly His
 1310 1315 1320

Lys Gly Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
 1325 1330 1335

Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
 1340 1345 1350

Thr Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
 1355 1360 1365

<210> 17

<211> 4128

<212> DNA

<213> Chuột lang nhà

<220>

<223> Thụ thể IGF-I ở chuột lang nhà

<400> 17

atgaagtctg gctccggagg aggggtccccg acctcgctgt gggggctcct gtttctctct	60
gctgcgctct cgctctggcc gacgagtgga gaaatctgtg ggccgggcat cgacatccgc	120
aatgactatc agcagctaaa acgcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac	180
atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gtttccccaa gctcaccgtc	240
atcaccgagt acttgctgct gttccgggtc gctggcctcg agagcctcgg agacctcttc	300
ccgaacctca ccgtcatccg cggctggaaa ctcttctata actacgccct ggtcatcttc	360
gagatgacca acctgaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcggggggcc	420

atcaggattg agaagaatgc tgacctgtgc tacctctcca cagtggactg gtcgctgac	480
ctggatgcgg tgtccaataa ctacattgtg gggaacaagt ccccaaagga atgtggagac	540
ctgtgtccag ggaccatgga ggagaaacca ttgtgcgaga agaccacat caacaatgag	600
tacaactacc gctgctggac cacaaatcgc tgccagaaaa tgtgcccaag tgctgcggg	660
aagcgtgcgt gcaccgagta ccaggagtgc tgccatcctg agtgccctggg cagctgccat	720
gcacccgacg acgacacggc ctgtgtggcc tgcagacact tctactatgc tggcatctgc	780
gtgccgcct gtccaccggg cacctaccgc ttcgagggtt ggcgctgtgt gcaccgagac	840
ttctgcgcca acatcccaa tgctgagagc agtgactccg agggcttcgt catccatgac	900
ggggagtgca tgcaggagtg tccctcgggc ttcacccgca acggcagcca gagcatgtac	960
tgcacccctt gtgaagggtc ttgcccaag gtctgcgagg aagaaaagaa gacgaaaacc	1020
attgactctg tgacttctgc tcagatgtc caaggggtgca ccatcttcaa gggcaacctg	1080
ctcattaata tccgacgggg caataacatt gcgtcggaac tggagaactt catggggctc	1140
attgaggtgg tgactggcta cgtgaagatc cgccattccc atgccttggg ctccttgctc	1200
ttcctgaaaa accttcgcct gatcctgggg gaggagcagc tggaaggga ctactccttc	1260
tacgtcctgg acaaccagaa cctgcagcag ctgtgggatt gggaccacg caacctcacc	1320
atcaaactctg ggaagatgta ctttgctttc aatcccaaac tgtgtgtctc tgaaatttac	1380
cgcatggaag aagtgcggg gacgaaagg cgccagagca aaggggacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg aacgagcctc ctgtgaaagt gacgtattgc gtttcacctc caccaccaca	1500
tcgaagaacc gcattatcat cacctggcac cggtagggc cccagacta cagggatctc	1560
atcagcttca ctgtttacta caaggaggca ccgtttaaaa atgtcaccga gtatgatggg	1620
caggatgctt gtggctcaa cagttggaac atgggtggacg tggacctgcc tcctaacaag	1680
gacgcggagc ctggcatcct actgcatggg ctgaagccct ggacacagta cgcggtctat	1740
gtcaaggccg tgaccctcac catggtagag aacgaccaca tccgtggggc caagagtgaa	1800

atcttgtaca ttgcaccaa tgcttcagtt ccttccattc ccctggatgt cctttcggca	1860
tccaactcct cttctcagct catcgtcaag tggaaccccc catctctgcc caacggaaac	1920
ctgagttatt atatcgtgcg gtggcagcgg cagcctcagg acagctacct ataccggcac	1980
aattactgot ccaaagacaa aatccccatc agaaagtatg cggatggcac catcgatgtc	2040
gaagaggtca ccgagaaccc caagactgaa gtatgtggtg gcgagaaagg gccttgctgc	2100
gcttgcccca aaaccgaagc cgagaagcag gccgagaagg aggaggccga gtaccggaaa	2160
gtgtttgaga atttctgca caactccatc ttcgtgccga ggctgaaag gaggcggcga	2220
gatgttgcg agatggccaa caccaccatg tccagccgca gcaggaacac cacggtggct	2280
gatacctaca atgccacaga tccagaggag ctagagaccg aatacccttt ctttgagagc	2340
agagtggata acaaggaaag aactgtaatt tcaaacctcc ggctttttac cttgtaccgc	2400
attgacatcc acagctgtaa ccatgaggct gagaagctgg gctgcagcgc ttctaacttt	2460
gtttttgcaa gaaccatgcc cgcagaagga gcagatgaca ttcttgcccc ggtgacgtgg	2520
gaagcaaggc ctgaaaactc catcttttta aagtggccag agcctgagaa tcctaattga	2580
ttgattctaa tgtacgaaat aaaatacgga tcacaagttg aggatcagcg agaattgtgtg	2640
tccagacagg aatacaggaa atacggaggg gccaagetta gccggctaaa cccagggaac	2700
tatacagccc ggattcaagc tacctcgctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg	2760
tttttctatg tcccagccaa aacaacgtat gaaaacttca tccatctgat catcgctctg	2820
ccagtcgcca tcctgttgat tgtggcaggc ttggcgataa tgctgtacgt cttccatagg	2880
aagagaaaca gcagcaggct ggggaatgga gtgttgtagc cctctgtgaa cccggagtac	2940
ttcagtgtg cggtatgtga cgttcctgat gaggggagg tagcgcgaga gaagatcacc	3000
atgagccggg agctggggca aggtcccttt gggatggtct acgaaggagt ggctaaaggt	3060
gtggtgaaag acgagcctga gacccgggta gccatcaaga cagtgaacga ggccgcaagc	3120
atgcgtgaaa ggatcgagtt tctcaatgag gcctctgtga tgaaggagtt caactgtcat	3180
catgtggtgc gactgctagg cgtggtgtcc cagggccagc ccacactggc catcatggag	3240

ctgatgacgc ggggggatct caagagctat ctcaggtctt tgaggccgga agtagagaat 3300
 agcccatcc tggcacctcc aagcctcagc aagatgatcc agatggccgg agagattgca 3360
 gatggcatgg catacctcaa cgccaacaag tttgtccaca gagaccttgc tgcccgaat 3420
 tgcattgtag ctgaagattt cacagtcaaa attggagatt ttgggatgac gcgagatatt 3480
 tacgagacag actactaccg gaaaggaggg aaagggtgc tgctgtgcg ctggatgtct 3540
 cctgagtccc tcaaggatgg agtcttcacc actcattcgg acgtctggtc cttcggggtc 3600
 gtctcttggg agatcgccac gctggctgag cagccatacc agggcttgtc caacgagcaa 3660
 gtccttcgct tcgtcatgga ggggtggctc ctggacaaac ccgacaactg ccagacatg 3720
 ctgtttgagc tgatgcgcat gtgctggcag tacaaccca agatgaggcc ttccttctg 3780
 gagatcatca gcagcgtcaa agacgagctg gaggcgggt tccgggaggt ctccttctac 3840
 tacagcgagg agaacaagcc gcccgagccg gaggagctgg acctggagcc cgagaacatg 3900
 gagagcgtcc cgctggaccc atcagcctcc tcgtcctccc tgccgcgcgc cgacagacac 3960
 tcaggacaca agggcgagaa cggcccgggc cccggcgtgc tgggtgctccg cgccagcttc 4020
 gacgagagac agccttacgc gcacatgaac ggaggccgca cgaacgagag ggccttgccg 4080
 ctgccccagt cgtcaacctg cgattataag gatgacgatg acaagtga 4128

<210> 18

<211> 1367

<212> PRT

<213> Khi đuôi dài

<220>

<223> Thụ thể IGF-I ở khi đuôi dài

<400> 18

Met Lys Ser Gly Ser Gly Glu Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu

1

5

10

15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Ala Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
385 390 395 400

Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
405 410 415

Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
420 425 430

Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
435 440 445

Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
450 455 460

Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
465 470 475 480

Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
485 490 495

Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
500 505 510

Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
515 520 525

Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
530 535 540

Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
545 550 555 560

Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
565 570 575

Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
580 585 590

His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
595 600 605

Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
610 615 620

Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
625 630 635 640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
645 650 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Leu
755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
930 935 940

Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
945 950 955 960

Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
965 970 975

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
980 985 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
995 1000 1005

Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
1010 1015 1020

Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
1025 1030 1035

Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
1040 1045 1050

Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
1055 1060 1065

Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
1070 1075 1080

Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met
1085 1090 1095

Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
1100 1105 1110

Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
1115 1120 1125

Asn Lys	Phe Val His Arg Asp	Leu Ala Ala Arg Asn	Cys Met Val
1130	1135	1140	
Ala Glu	Asp Phe Thr Val Lys	Ile Gly Asp Phe Gly	Met Thr Arg
1145	1150	1155	
Asp Ile	Tyr Glu Thr Asp Tyr	Tyr Arg Lys Gly Gly	Lys Gly Leu
1160	1165	1170	
Leu Pro	Val Arg Trp Met Ser	Pro Glu Ser Leu Lys	Asp Gly Val
1175	1180	1185	
Phe Thr	Thr Tyr Ser Asp Val	Trp Ser Phe Gly Val	Val Leu Trp
1190	1195	1200	
Glu Ile	Ala Thr Leu Ala Glu	Gln Pro Tyr Gln Gly	Leu Ser Asn
1205	1210	1215	
Glu Gln	Val Leu Arg Phe Val	Met Glu Gly Gly Leu	Leu Asp Lys
1220	1225	1230	
Pro Asp	Asn Cys Pro Asp Met	Leu Phe Glu Leu Met	Arg Met Cys
1235	1240	1245	
Trp Gln	Tyr Asn Pro Lys Met	Arg Pro Ser Phe Leu	Glu Ile Ile
1250	1255	1260	
Ser Ser	Ile Lys Asp Glu Met	Glu Pro Gly Phe Arg	Glu Val Ser
1265	1270	1275	
Phe Tyr	Tyr Ser Glu Glu Asn	Lys Leu Pro Glu Pro	Glu Glu Leu
1280	1285	1290	
Asp Leu	Glu Pro Glu Asn Met	Glu Ser Val Pro Leu	Asp Pro Ser
1295	1300	1305	

Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His
 1310 1315 1320

Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
 1325 1330 1335

Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
 1340 1345 1350

Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
 1355 1360 1365

<210> 19

<211> 4128

<212> DNA

<213> Khi đuôi dài

<220>

<223> Thụ thể IGF-I ở khi đuôi dài

<400> 19

atgaagtctg gctctggaga aggggtccccg acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc	60
gccgcgctct cgtcttgcc gacgagtga gaaatctgtg ggccgggcat cgacatccgc	120
aacgactatc agcagctgaa gcgcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac	180
atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gttccccaa gtcacggtc	240
atcaccgagt acttgctgtt gttccgagtg gctggcctag agagcctcgg agacctgttc	300
cccaacctca cggtaatccg cggctggaaa ctcttctaca actacgccct ggtcatcttt	360
gagatgacca atctcaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcggggggcc	420
atcaggattg agaaaaatgc tgacctctgt tacctctcca ctgtggactg gtccctgatc	480
ctggatgcag tgtccaataa ctacattgtg gggaataagc ccccaaagga atgcggggac	540
ctgtgtccgg ggaccatgga ggagaagccg atgtgcgaga agaccaccat caacaatgag	600
tacaactacc gctgctggac cacaaccgc tgccagaaaa tgtgcccgag tgctgtggg	660

aagagggcat gcaccgagaa caacgagtgc tgccaccccg agtgccctggg cagctgcagc	720
gcgcttgaca acgacacggc ctgtgtagct tgccgccact actactacgc cgggtgtctgc	780
gtgcctgcct gcccgcccaa cacctacagg ttgagggct ggcgctgtgt ggaccgtgac	840
ttctgcgcca acatcctcag tgccgagagc agcgactccg agggtttcgt gatccacgac	900
ggcgagtgca tgcaggagtg cccctcaggc ttcacccgca acggcagcca gagcatgtac	960
tgcacccctt gtgaagggtcc ttgcccgaag gtctgtgagg aagaaaagaa aacaaagacc	1020
attgattctg ttactttctgc tcagatgctt caaggatgca ccatcttcaa gggcaatttg	1080
ctcattaaca tccgacgggg gaataacatt gcttcagaac tggagaactt catggggctc	1140
atcgaggtgg tgacgggcta cgtgaagatc cgccattccc atgccttggt ctccctgtcc	1200
ttcctaataa accttcgcct catcttagga gaggagcagc tagaaggga ttactccttc	1260
tacgtcctcg acaaccagaa cttgcagcaa ctatgggact gggaccaccg caacctgacc	1320
atcaaagcag ggaaaatgta ctttgctttc aatcccaa atgtgtgtttc ggaaatttac	1380
cgcattggagg aagtgcggg gactaaagg cgccaaagca aaggggacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg aaagagcctc ctgtgaaagt gacgtcctgc atttcacctc caccaccagc	1500
tggaagaatc gcatcatcat aacctggcac cggtaaccgg cccctgacta cagggatctc	1560
atcagcttca ccgtttacta caaggaagca ccttttaaga atgtcacgga gtatgatggg	1620
caggatgcct gcggctccaa cagctggaac atgggtggacg tggacctccc gcccaacaag	1680
gacgtggagc ccggcatctt actgcatggg ctgaagccct ggactcagta cgccgtttac	1740
gtcaaggctg tgacctcac catggtggag aacgaccata tccgtggggc caagagtgag	1800
atcttgtaga ttgcaccaa tgcttcagtt ccttccattc ccttggacgt tctttcagca	1860
tcgaactcct cttctcagtt aatcgtgaag tggaaccctc cctctctgcc caacggcaac	1920
ctgagttact acattgtgcg ctggcagcgg cagcctcagg acggctacct ttaccggcac	1980
aattactgct ccaaagacaa aatccccatc aggaagtatg ccgacggcac cattgacatt	2040

gaggaggtca cagagaaccc gaagactgag gtgtgtggtg gagagaaagg gccttgctgc	2100
gcctgcccc aactgaagc tgagaagcag gccgagaagg aggaggctga gtaccgcaaa	2160
gtctttgaga atttcctgca caactccatc tttgtgcccc gacctgaaag gaagcggaga	2220
gatgtcatgc aagtggccaa caccaccatg tccagccgaa gcaggaacac cacggtggca	2280
gacacctaca acatcacaga tctggaagag ctagagacag agtacccttt ctttgagagc	2340
agagtggata ataaggagag aactgtcatt tctaaccttc ggcctttcac attgtaccgc	2400
attgatatcc acagctgcaa ccacgaggct gagaaactgg gctgcagcgc ctccaacttt	2460
gtctttgcaa ggactatgcc tgcagaagga gcagatgaca ttcttgggcc agtgacctgg	2520
gagccaaggc ctgaaaactc catcttttta aagtggccag aacctgagaa tcccaatgga	2580
ttgattctaa tgtatgaaat aaaatacggg tcacaagttg aggatcagcg agaatgtgtg	2640
tccagacagg aatacaggaa gtatggaggg gccaaagctaa accgggctaaa cccggggaac	2700
tacacagccc ggattcaggc tacatctctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg	2760
ttctttctatg tccaggccaa aacaggatac gaaaacttca tccatctgat catcgctctg	2820
cccgtcgctg tctgtttgat cgtgggaggg ttggtgatca tgctgtacgt cttccataga	2880
aagagaaata acagcaggct ggggaatgga gtgctgtacg cgtctgtgaa cccggagtac	2940
ttcagcgctg cggatgtgta cgttctctgat gagtgggagg tggctcgga gaagatcacc	3000
atgagccggg aacttgggca ggggtcgttt gggatggtct atgaaggagt tgccaagggt	3060
gtggtgaaag acgaacctga aaccagagtg gccattaaaa cagtgaacga ggccgcgagc	3120
atgcgtgaaa ggatcgagtt tctcaacgag gcttctgtga tgaaggagtt caattgtcac	3180
catgtggtgc ggttgctggg tgtggtgtcc cagggccagc caacgctggt catcatggaa	3240
ctgatgacgc ggggcgatct caaaagttat ctccggtctc tgaggccaga aatggagaat	3300
aatccagtcc tagcacctcc aagcctaagc aagatgattc agatggctgg agagattgca	3360
gacggcatgg catacctcaa cgccaacaag ttctgtccaca gagaccttgc tgcccggaat	3420
tgcatggtag ccgaggattt cacagtcaaa attggagatt ttgggatgac gcgagatatc	3480

tatgagacag actattaccg gaaaggaggg aaagggctgt tgcccgtgcg ctggatgtct 3540
 cccgagtccc tcaaggatgg agtcttcacc acttactcgg acgtctggtc cttcgggggtt 3600
 gtccctctggg agatcgccac actggccgag cagccctacc agggcttgtc caacgagcaa 3660
 gtccttcgct tcgtcatgga gggcggcctt ctggacaagc cagacaactg ccccgacatg 3720
 ctgtttgaat tgatgcgcat gtgctggcag tacaacccca agatgaggcc ttccttcctg 3780
 gagatcatca gcagcatcaa agacgagatg gagcctggct tccgggaggt ctccttctac 3840
 tacagtgagg agaacaagct gcccgagccg gaggagctgg acctggagcc agagaacatg 3900
 gagagcgtcc ccctggaccc ctcggcctcc tcgtcctccc tgccactgcc cgacagacac 3960
 tcaggacaca aggccgagaa cggccccggc cctggagtgc tggtgctccg cgccagcttc 4020
 gatgagagac agccttacgc acacatgaac ggtggccgca agaacgagcg ggccttgccg 4080
 ctgccccagt cttcgacctg cgattataag gatgacgatg acaagtga 4128

<210> 20

<211> 1370

<212> PRT

<213> Chuột nâu

<220>

<223> Thụ thể IGF-I ở chuột nâu

<400> 20

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15

Val Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Phe Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Ile Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Leu Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Val Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys His
225 230 235 240

Thr Pro Asp Asp Asn Thr Thr Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Lys Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Pro Asn Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Asp Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Ser Thr Gln Ser Met Tyr
305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Gly Asp Glu Glu
325 330 335

Lys Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln
340 345 350

Gly Cys Thr Ile Leu Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly
355 360 365

Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val
370 375 380

Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu
385 390 395 400

Ser Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu
405 410 415

Gly Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu
420 425 430

Trp Asp Trp Asn His Arg Asn Leu Thr Val Arg Ser Gly Lys Met Tyr
435 440 445

Phe Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu
450 455 460

Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr
465 470 475 480

Arg Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu Arg Phe
485 490 495

Thr Ser Thr Thr Thr Trp Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
500 505 510

Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr
515 520 525

Lys Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala
530 535 540

Cys Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn
545 550 555 560

Lys Glu Gly Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr
565 570 575

Gln Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn
580 585 590

Asp His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn
595 600 605

Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser
610 615 620

Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Thr Leu Pro Asn Gly
625 630 635 640

Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly
645 650 655

Tyr Leu Phe Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg
660 665 670

Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Val Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro
675 680 685

Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly Asp Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro
690 695 700

Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
705 710 715 720

Lys Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro
725 730 735

Glu Arg Arg Arg Arg Asp Val Leu Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser
740 745 750

Ser Arg Ser Arg Asn Thr Thr Val Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp
755 760 765

Pro Glu Glu Phe Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp
770 775 780

Asn Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr
785 790 795 800

Arg Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys
805 810 815

Ser Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala
820 825 830

Asp Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser
835 840 845

Ile Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu
850 855 860

Met Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys
865 870 875 880

Val Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg
885 890 895

Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
900 905 910

Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Pro Ala Lys
915 920 925

Thr Thr Tyr Glu Asn Phe Met His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala
930 935 940

Ile Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His
945 950 955 960

Arg Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser
965 970 975

Val Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu
980 985 990

Trp Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Asn Arg Glu Leu Gly Gln
 995 1000 1005

Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val
 1010 1015 1020

Lys Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu
 1025 1030 1035

Ala Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser
 1040 1045 1050

Val Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly
 1055 1060 1065

Val Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met
 1070 1075 1080

Thr Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu
 1085 1090 1095

Val Glu Asn Asn Leu Val Leu Ile Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met
 1100 1105 1110

Ile Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn
 1115 1120 1125

Ala Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met
 1130 1135 1140

Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr
 1145 1150 1155

Arg Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly
 1160 1165 1170

Leu Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly
1175 1180 1185

Val Phe Thr Thr His Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu
1190 1195 1200

Trp Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser
1205 1210 1215

Asn Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp
1220 1225 1230

Lys Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met
1235 1240 1245

Cys Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile
1250 1255 1260

Ile Gly Ser Ile Lys Asp Glu Met Glu Pro Ser Phe Gln Glu Val
1265 1270 1275

Ser Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Pro Pro Glu Pro Glu Glu
1280 1285 1290

Leu Glu Met Glu Leu Glu Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val
1295 1300 1305

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Leu Pro Glu
1310 1315 1320

Arg His Ser Gly His Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Val Leu Val
1325 1330 1335

Leu Arg Ala Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn
1340 1345 1350

Gly Gly Arg Ala Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser
 1355 1360 1365

Thr Cys
 1370

<210> 21
 <211> 4140
 <212> DNA
 <213> Chuột nâu

<220>
 <223> Thụ thể IGF-I ở chuột nâu

<400> 21

```

atgaagtctg gctccggagg aggggtccccg acctcgctgt gggggctcgt gtttctctcc      60
gcgcgcctct cgctctggcc gacgagtgga gaaattttgtg ggcccggcat tgacatccgc      120
aacgactatc agcagctgaa gcgcctggaa aactgcacgg tgatcgaggg cttcctccac      180
atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgaagctacc gtttccccaa gtcacagtc      240
atcaccgagt acttgctgct gtttcgagtg gcgggcctcg agagcctggg agacctcttc      300
ccgaacctca cagtcatccg tggctggaaa ctcttctaca attacgcact ggtcatcttc      360
gagatgacca atctcaagga tattgggctt tataatctga ggaacattac tcggggggcc      420
atcaggattg agaaaaacgc tgacctctgt tacctctcca ccatagactg gtctctcatc      480
ttggatgcgg tgtccaataa ctacattgtg gggaacaagc ccccaaagga atgtggggac      540
ctgtgtccag ggaccttgga ggagaagccc atgtgtgaga agaccaccat caacaatgag      600
tacaactacc gctgctggac caaaaatgc tgccagaaaa tgtgcccaag tgtgtgtggg      660
aagcgagcct gcaccgagaa caatgagtgc tgccaccgag agtgcctagg cagctgccac      720
acaccggacg acaacacaac ctgctgtggc tgccgacact actactacaa aggcgtgtgc      780
gtgcctgcct gccgcctgg cacctacagg ttcgagggct ggcgctgtgt ggaccgggat      840

```

ttctgcgcca acatcccca cgccgagagc agtgactcag atggcttcgt catccacgat	900
ggcgagtgca tgcaggagtg tccatcaggc ttcatccgca acagcaccca gagcatgtac	960
tgtatcccct gtgaaggccc ctgcccgaag gtctgcggcg atgaagaaaa gaaaacgaaa	1020
accatcgatt ctgtgacgtc tgcccagatg ctccaagggt gcaccatttt gaagggaat	1080
ctgcttatta acatccggcg aggcaataac attgcctcgg aattggagaa cttcatgggg	1140
ctcatcgagg tggtgactgg ctacgtgaag atccgccatt cccatgcctt ggtctccttg	1200
tccttctga agaaccttcg tctcatctta ggagaggagc agctagaagg aaactactcc	1260
ttctatgtcc tggacaacca gaacttgcag cagctgtggg actggaacca ccggaacctg	1320
accgtcaggt cagggaaaat gtacttcgct ttcaatccca agctgtgtgt ctctgaaatt	1380
taccgaatgg aggaggtgac aggaacaaag ggacggcaga gcaaaggaga cataaacacc	1440
aggaacaacg gagagcgagc ttctgtgaa agtgatgttc tccgtttcac ctccaccacc	1500
acctggaaga accgcatcat cataacgtgg caccggtacc ggccgccgga ctaccgggat	1560
ctcatcagtt tcacagtcta ctacaaggag gcacccttta aaaacgtcac ggaatacgac	1620
gggcaggatg cctgtggctc caacagctgg aacatgggtgg acgtggacct gctccgaac	1680
aaggaggggg agcctggcat ttgtctgcat gggctgaagc cctggacca gtatgcagtc	1740
tatgtcaagg ctgtgacct caccatggtg gaaaacgacc acatccgtgg ggccaaaagt	1800
gaaatcttgt acattcgac caacgcttca gttccttcca ttctctaga tgtcctctcg	1860
gcatcaaact cctcctctca gctgacgtg aagtggaacc cccaactct gccaatggt	1920
aacttgagtt actacattgt gaggtggcag cggcagccgc aggatggcta tctgttccgg	1980
cacaactact gctccaaaga caaaataccc atcagaaagt acgccgatgg taccatcgat	2040
gtggaggagg tgacagaaaa tccaagaca gaagtgtgcg gtggtgataa agggccgtgc	2100
tgtgcctgtc ctaaaaccga agctgagaag caggctgaga aggaggaggc tgagtaccgt	2160
aaagtctttg agaatttcct tcacaactcc atctttgtgc ccagacctga gaggaggcgg	2220
agagatgtcc tgcaggtggc taacaccacc atgtccagcc gaagcaggaa caccacggta	2280

gctgacacct acaatatcac agaccggaa gaggtcgaga cagaataccc tttctttgag	2340
agcagagtgg ataacaagga gaggactgtc atttccaacc tccggccttt cactctgtac	2400
cgtatcgata tccacagctg caaccacgag gctgagaagc tgggctgcag cgctccaac	2460
tttgtctttg caagaacat gccagcagaa ggagcagatg acattcctgg ccagtgacc	2520
tgggagccaa gacctgaaaa ctccatcttt ttaaagtggc cagaaccga gaacccaac	2580
ggattgattc taatgtatga aataaaatac ggatcgcaag tcgaggatca gcgggaatgt	2640
gtgtccagac aggagtacag gaagtatgga ggggccaaac ttaaccgtct aaaccaggg	2700
aactatacgg ccggattca ggctacctcc ctctctggga atgggtcgtg gacagatcct	2760
gtgttcttct atgtcccagc caaaacaacg tatgagaatt tcatgcatct gatcattgct	2820
ctgccggttg ccatcctgct gattgtgggg ggctggtaa tcatgctgta tgtcttccat	2880
agaaagagga ataacagcag attgggcaac ggggtgctgt acgctctgt gaaccccgag	2940
tatttcagcg cagctgatgt gtacgtgcct gatgaatggg aggtagctcg ggagaagatc	3000
accatgaacc gggagctcgg acaagggctc ttcgggatgg tctatgaagg agtggccaag	3060
ggcgtggtca aggacgagcc tgaaaccaga gtggccatca agacagtga tgaggctgca	3120
agtatgctg agagaattga gtttctcaac gaggcctcag tgatgaagga gttcaactgt	3180
cacatgtgg tccggttgct ggggtgtagta tccaaggcc agcccacct ggtcatcatg	3240
gaactaatga cacgtggcga tctcaaaagt tatctccggt ctctaaggcc agaggtggag	3300
cagaataatc tagtcctgat tcctccgagc ttaagcaaga tgatccagat ggctggagag	3360
attgcagatg gcatggccta cctcaatgcc aacaagtctg tccacagaga cctggctgct	3420
cggaactgca tggtagctga agatttcaca gtcaaaattg gagattttg tatgacacga	3480
gacatctacg agacggacta ctaccgaaa ggcgggaagg gcttgctgcc tgtgcgctgg	3540
atgtctcccg agtcctcaa ggatggcgtc ttcaccactc attccgatgt ctggctcttt	3600
ggggtcgtcc tctgggagat cgccactctg gctgagcagc cgtaccaggg cctgtccaac	3660

gagcaagttc ttcgtttcgt catggagggc ggccttctgg acaagccgga taactgcccc 3720
 gatatgctgt ttgaacttat gcgcatgtgc tggcagtaca accccaagat gcggccctcc 3780
 ttcttgagaga tcatcggaag catcaaggat gagatggagc ccagtttcca ggaggtctcc 3840
 ttctactaca gcgaggagaa caagcctcca gagccggagg agctggagat ggagctggag 3900
 ctggagcccg agaacatgga gagcgtcccg ctggaccctt cggcctcctc agcctccctg 3960
 cctctgcttg aaagacactc aggacacaag gctgagaacg gccctggcgt gctgggttctc 4020
 cgtgccagtt ttgatgagag acagccttac gctcacatga atgggggacg cgccaacgag 4080
 agggccttgc ctctgcccc a gtcctcaacc tgcgattata aggatgacga tgacaagtga 4140

<210> 22

<211> 4142

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hIGF-1R_FLAG

<400> 22

gaattcatga agtctggctc cggaggaggg tccccgacct cgctgtgggg gctcctgttt 60
 ctctccgccg cgctctcgct ctggccgacg agtggagaaa tctgcgggcc aggcacgac 120
 atccgcaacg actatcagca gctgaagcgc ctggagaact gcacggtgat cgagggctac 180
 ctccacatcc tgctcatctc caaggccgag gactaccgca gctaccgctt cccaagctc 240
 acggtcatta ccgagtactt gctgctgttc cgagtggctg gcctcgagag cctcggagac 300
 ctcttcccca acctcacggt catccgcggc tggaaactct tctacaacta cgccctggtc 360
 atcttcgaga tgaccaatct caaggatatt gggctttaca acctgaggaa cattactcgg 420
 ggggccatca ggattgagaa aaatgctgac ctctgttacc tctccactgt ggactgggtc 480
 ctgatcctgg atgcggtgtc caataactac attgtgggga ataagcccc aaaggaatgt 540
 ggggacctgt gtccaggac catggaggag aagccgatgt gtgagaagac caccatcaac 600

aatgagtaca actaccgctg ctggaccaca aaccgctgcc agaaaatgtg cccaagcacg	660
tgtgggaagc gggcgtgcac cgagaacaat gagtgtgcc accccgagtg cctgggcagc	720
tgcagcgcgc ctgacaacga cacggcctgt gtagcttgcc gccactacta ctatgccggt	780
gtctgtgtgc ctgcctgccc gcccaacacc tacaggtttg agggctggcg ctgtgtggac	840
cgtgacttct gcgccaacat cctcagcgcc gagagcagcg actccgaggg gtttgtgatc	900
cacgacggcg agtgcattga ggagtgtccc tcgggcttca tccgcaacgg cagccagagc	960
atgtactgca tcccttgtga aggtccttgc ccgaaggtct gtgaggaaga aaagaaaaca	1020
aagaccattg attctgttac ttctgtcag atgtccaag gatgcacat cttcaagggc	1080
aatttgctca ttaacatccg acgggggaat aacattgctt cagagctgga gaacttcag	1140
gggctcatcg aggtggtgac gggctacgtg aagatccgcc attctcatgc cttggtctcc	1200
ttgtccttcc taaaaaacct tcgctcatc ctaggagagg agcagctaga aggaattac	1260
tccttctacg tctcgacaa ccagaacttg cagcaactgt gggactggga ccaccgcaac	1320
ctgaccatca aagcagggaa aatgtacttt gctttcaatc ccaaattatg tgtttccgaa	1380
atttaccgca tggaggaagt gacggggact aaagggcgcc aaagcaaagg ggacataaac	1440
accaggaaca acggggagag agcctcctgt gaaagtgacg tctgcattt cacctccacc	1500
accacgtcga agaatcgcat catcataacc tggcaccggt accggcccc tgactacagg	1560
gatctcatca gttcacctt ttactacaag gaagcaccct ttaagaatgt cacagagtat	1620
gatgggcagg atgcctgogg ctccaacagc tggacatgg tggacgtgga cctcccgccc	1680
aacaaggacg tggagcccg catcttacta catgggctga agcctggac tcagtacgcc	1740
gtttacgtca aggtgtgac cctcaccatg gtggagaacg accatatccg tggggccaag	1800
agtgagatct tgtacattcg caccaatgct tcagttcctt ccattccctt ggacgttctt	1860
tcagcatcga actcctcttc tcagttaatc gtgaagtgga accctccctc tctgccaac	1920
ggcaacctga gttactacat tgtgcgctgg cagcggcagc ctcaggacgg ctacctttac	1980
cggcacaatt actgtccaa agacaaaatc cccatcagga agtatgccga cggcaccatc	2040

gacattgagg aggtcacaga gaacccaag actgaggtgt gtggtggga gaaagggcct 2100
tgctgcgcct gccccaaac tgaagccgag aagcaggccg agaaggagga ggctgaatac 2160
cgcaaagtct ttgagaatct cctgcacaac tccatcttcg tgcccagacc tgaaaggaag 2220
cggagagatg tcatgcaagt ggccaacacc accatgtcca gccgaagcag gaacaccacg 2280
gccgcagaca cctacaacat caccgacccg gaagagctgg agacagagta ccctttcttt 2340
gagagcagag tggataacaa ggagagaact gtcatttcta accttcggcc tttcacattg 2400
taccgcatcg atatccacag ctgcaaccac gaggtgaga agctgggctg cagcgcctcc 2460
aacttcgtct ttgcaaggac tatgcccgca gaaggagcag atgacattcc tgggccagtg 2520
acctgggagc caaggcctga aaactccatc tttttaaaagt ggccggaacc tgagaatccc 2580
aatggattga ttctaattga tgaaataaaa tacggatcac aagttgagga tcagcgagaa 2640
tgtgtgtcca gacaggaata caggaagtat ggaggggcca agctaaaccg gctaaaccg 2700
gggaactaca cagcccgat tcaggccaca tctctctctg ggaatgggtc gtggacagat 2760
cctgtgttct tctatgtcca ggccaaaaca ggatatgaaa acttcatcca tctgatcatc 2820
gctctgcccg tcgtgtcct gttgatctg ggaggggttg tgattatgct gtacgtcttc 2880
catagaaaga gaaataacag caggctgggg aatggagtgc tgtatgcctc tgtgaaccg 2940
gagtacttca gcgctgctga tgtgtacgtt cctgatgagt gggaggtggc tcgggagaag 3000
atcaccatga gccgggaact tgggcagggg tcgtttggga tgggtctatga aggagttgcc 3060
aagggtgtgg tgaaagatga acctgaaacc agagtggcca ttaaaacagt gaacgaggcc 3120
gcaagcatgc gtgagaggat tgagtttctc aacgaagctt ctgtgatgaa ggagttcaat 3180
tgtcaccatg tgggtgcgatt gctgggtgtg gtgtcccaag gccagccaac actggtcac 3240
atggaactga tgacacgggg cgatctcaaa agttatctcc ggtctctgag gccagaaatg 3300
gagaataatc cagtcctagc acctccaagc ctgagcaaga tgattcagat ggccggagag 3360
attgcagacg gcatggcata cctcaacgcc aataagttcg tccacagaga ctttgcctgc 3420

cggaattgca tggtagccga agatttcaca gtcaaaatcg gagattttgg tatgacgcga 3480
 gatattctatg agacagacta ttaccggaaa ggaggggaaag ggctgctgcc cgtgcgctgg 3540
 atgtctcctg agtccctcaa ggatggagtc ttcaccactt actcggacgt ctggtccttc 3600
 ggggtcgtcc tctgggagat cgccacactg gccgagcagc cctaccaggg cttgtccaac 3660
 gagcaagtcc ttcgcttcgt catggagggc ggccttctgg acaagccaga caactgtcct 3720
 gacatgctgt ttgaactgat gcgcatgtgc tggcagtata accccaagat gaggccttcc 3780
 ttcttgagga tcatcagcag catcaaagag gagatggagc ctggcttccg ggaggtctcc 3840
 ttctactaca gcgaggagaa caagctgccc gagccggagg agctggacct ggagccagag 3900
 aacatggaga gcgtccccct ggaccctcgt gcctcctcgt cctccctgcc actgcccagc 3960
 agacactcag gacacaaggc cgagaacggc cccggccctg ggggtgctggc cctccgcgcc 4020
 agcttcgacg agagacagcc ttacgcccac atgaacgggg gccgcaagaa cgagcggggc 4080
 ttgccgctgc cccagtcttc gacctgcgac taaaagacg atgacgacaa gtgagcggcc 4140
 gc 4142

<210> 23

<211> 4142

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hIGF1R-D245N-A247T-E294D_FLAG

<400> 23

gaattcatga agtctggctc cggaggaggg tccccgacct cgctgtgggg gctcctgttt 60
 ctctccgccg cgctctcgct ctggccgacg agtggagaaa tctgcggggc aggcacgac 120
 atccgcaacg actatcagca gctgaagcgc ctggagaact gcacggtgat cgagggctac 180
 ctccacatcc tgctcatctc caaggccgag gactaccgca gctaccgctt cccaagctc 240
 acggtcatta ccgagtactt gctgctgttc cgagtggctg gcctcgagag cctcggagac 300

cttttccccca acctcacggt catccgcggc tggaaactct tctacaacta cgccctggtc	360
atcttcgaga tgaccaatct caaggatatt gggctttaca acctgaggaa cattactcgg	420
ggggccatca ggattgagaa aaatgctgac ctctgttacc tctccactgt ggactgggtcc	480
ctgatcctgg atgcggtgtc caataactac attgtgggga ataagcccc aaaggaatgt	540
ggggacctgt gtccagggac catggaggag aagccgatgt gtgagaagac caccatcaac	600
aatgagtaca actaccgctg ctggaccaca aaccgctgcc agaaaatgtg cccaagcacg	660
tgtgggaagc gggcgtgcac cgagaacaat gagtgtgcc accccgagtg cctgggcagc	720
tgcagcgcgc ctgacaacaa cagacctgt gtagcttgcc gccactacta ctatgccggt	780
gtctgtgtgc ctgcctgccc gcccaacacc tacaggtttg agggctggcg ctgtgtggac	840
cgtgacttct ggcccaacat cctcagcgcc gagagcagcg actccgacgg gtttgtgatc	900
cacgacggcg agtgcattga ggagtgtccc tcgggcttca tccgcaacgg cagccagagc	960
atgtactgca tcccttgtga aggtccttgc ccgaaggtct gtgaggaaga aaagaaaaca	1020
aagaccattg attctgttac ttctgtcag atgtccaag gatgcaccat cttcaagggc	1080
aatttgctca ttaacatccg acgggggaat aacattgctt cagagctgga gaacttcatg	1140
gggctcatcg aggtggtgac gggctacgtg aagatccgcc attctcatgc cttggtctcc	1200
ttgtccttcc taaaaaacct tcgcctcatc ctaggagagg agcagctaga agggaattac	1260
tccttctacg tcctcgacaa ccagaacttg cagcaactgt gggactggga ccaccgcaac	1320
ctgaccatca aagcaggga aatgtacttt gctttcaatc ccaaattatg tgtttccgaa	1380
atttaccgca tggaggaagt gacggggact aaagggcgcc aaagcaaagg ggacataaac	1440
accaggaaca acggggagag agcctcctgt gaaagtgacg tcctgcattt cacctccacc	1500
accacgtcga agaatcgcat catcataacc tggcaccggt accggcccc tgactacagg	1560
gatctcatca gcttcaccgt ttactacaag gaagcaccct ttaagaatgt cacagagtat	1620
gatgggcagg atgcctgcgg ctccaacagc tggaacatgg tggacgtgga cctcccgccc	1680
aacaaggacg tggagcccgg catcttacta catgggctga agccctggac tcagtacgcc	1740

gtttacgtca aggctgtgac cctcaccatg gtggagaacg accatatccg tggggccaag 1800
agtgagatct tgtacattcg caccaatgct tcagttcctt ccattccctt ggacgttctt 1860
tcagcatcga actcctcttc tcagttaatc gtgaagtgga accctccctc tctgccaac 1920
ggcaacctga gttactacat tgtgcgctgg cagcggcagc ctcaggacgg ctacctttac 1980
cggcacaatt actgctccaa agacaaaatc cccatcagga agtatgccga cggcaccatc 2040
gacattgagg aggtcacaga gaacccaag actgaggtgt gtggtgggga gaaagggcct 2100
tgctgcgcct gccccaaaac tgaagccgag aagcaggccg agaaggagga ggctgaatac 2160
cgcaaagtct ttgagaatct cctgcacaac tccatcttcg tgcccagacc tgaaaggaag 2220
cggagagatg tcatgcaagt ggccaacacc accatgtcca gccgaagcag gaacaccacg 2280
gccgcagaca cctacaacat caccgacccg gaagagctgg agacagagta ccttttcttt 2340
gagagcagag tggataacaa ggagagaact gtcatttcta accttcggcc ttacacattg 2400
taccgcatcg atatccacag ctgcaaccac gaggctgaga agctgggctg cagcgcctcc 2460
aacttcgtct ttgcaaggac tatgcccgca gaaggagcag atgacattcc tgggccagtg 2520
acctgggagc caaggcctga aaactccatc tttttaaaagt ggccggaacc tgagaatccc 2580
aatggattga ttctaattga tgaaataaaa tacggatcac aagttgagga tcagcgagaa 2640
tgtgtgtcca gacaggaata caggaagtat ggaggggcca agctaaaccg gctaaaccg 2700
gggaactaca cagcccgat tcaggccaca tctctctctg ggaatgggtc gtggacagat 2760
cctgtgttct tctatgtcca ggccaaaaca ggatatgaaa acttcatcca tctgatcatc 2820
gctctgcccg tcgctgtcct gttgatcgtg ggagggttgg tgattatgct gtacgtcttc 2880
catagaaaga gaaataacag caggctgggg aatggagtgc tgtatgcctc tgtgaaccgg 2940
gagtacttca gcgctgctga tgtgtacgtt cctgatgagt gggaggtggc tcgggagaag 3000
atcaccatga gccgggaact tgggcagggg tcgtttggga tggcttatga aggagttgcc 3060
aaggggtgtg tgaaagatga acctgaaacc agagtggcca ttaaaacagt gaacgaggcc 3120

gcaagcatgc gtgagaggat tgagtttctc aacgaagctt ctgtgatgaa ggagttcaat 3180
 tgtcaccatg tgggtgcgatt gctgggtgtg gtgtcccaag gccagccaac actgggtcatc 3240
 atggaactga tgacacgggg cgatctcaaa agttatctcc ggtctctgag gccagaaatg 3300
 gagaataatc cagtcctagc acctccaagc ctgagcaaga tgattcagat ggccggagag 3360
 attgcagacg gcatggcata cctcaacgcc aataagttcg tccacagaga ccttgctgcc 3420
 cggaattgca tggtagccga agatttcaca gtcaaaatcg gagattttgg tatgacgcga 3480
 gatatctatg agacagacta ttaccggaaa ggagggaaaag ggctgctgcc cgtgcgctgg 3540
 atgtctctg agtccctcaa ggatggagtc ttcaccactt actcggacgt ctggtccttc 3600
 ggggtcgtcc tctgggagat cgccacactg gccgagcagc cctaccaggg cttgtccaac 3660
 gagcaagtcc ttcgcttcgt catggagggc ggccttctgg acaagccaga caactgtcct 3720
 gacatgctgt ttgaactgat gcgcatgtgc tggcagtata accccaagat gaggccttcc 3780
 ttcttgagaga tcatcagcag catcaaagag gagatggagc ctggcttccg ggaggtctcc 3840
 ttctactaca gcgaggagaa caagctgcc gagccggagg agctggacct ggagccagag 3900
 aacatggaga gcgtccccct ggacccctcg gcctcctcgt cctccctgcc actgcccagc 3960
 agacactcag gacacaaggc cgagaacggc cccggccctg gggtgctggc cctccgcgcc 4020
 agcttcgacg agagacagcc ttacgcccac atgaacgggg gccgcaagaa cgagcggggc 4080
 ttgccgctgc ccagtccttc gacctgcgac taaaagacg atgacgacaa gtgagcggcc 4140
 gc 4142

<210> 24

<211> 4142

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hIGF1R-G315S-S316T_FLAG

<400> 24

gaattcatga agtctggctc cggaggaggg tccccgacct cgctgtgggg gctcctgttt	60
ctctccgccg cgctctcgct ctggccgacg agtggagaaa tctgcgggcc aggcacgcac	120
atccgcaacg actatcagca gctgaagcgc ctggagaact gcacggtgat cgagggctac	180
ctccacatcc tgctcatctc caaggccgag gactaccgca gctaccgctt cccaagctc	240
acggtcatta ccgagtactt gctgctgttc cgagtggctg gcctcgagag cctcggagac	300
ctcttcccca acctcacggt catccgcggc tggaaactct tctacaacta cgccctggtc	360
atcttcgaga tgaccaatct caaggatatt gggctttaca acctgaggaa cattactcg	420
ggggccatca ggattgagaa aaatgctgac ctctgttacc tctccactgt ggactggctc	480
ctgatcctgg atgcggtgtc caataactac attgtgggga ataagcccc aaaggaatgt	540
ggggacctgt gtccaggac catggaggag aagccgatgt gtgagaagac caccatcaac	600
aatgagtaca actaccgctg ctggaccaca aaccgctgcc agaaaatgtg cccaagcacg	660
tgtgggaagc gggcgtgcac cgagaacaat gagtgtgcc accccgagt cctgggcagc	720
tgcagcgcg ctgacaacga caggcctgt gtagcttgcc gccactacta ctatgccggt	780
gtctgtgtgc ctgcctgccc gcccaacacc tacaggtttg agggctggcg ctgtgtggac	840
cgtgacttct gcgccaacat cctcagcgcc gagagcagcg actccgagg gtttgtgatc	900
cacgacggcg agtgcattga ggagtgcgcc tcgggcttca tccgcaacag caccagagc	960
atgtactgca tcccttgtga aggtccttgc ccgaaggctc gtgaggaaga aaagaaaaca	1020
aagaccattg attctgttac ttctgctcag atgtccaag gatgcacat cttcaagggc	1080
aatttgctca ttaacatccg acgggggaat aacattgctt cagagctgga gaacttcatg	1140
gggctcatcg aggtggtgac gggctacgtg aagatccgcc attctcatgc cttggctctc	1200
ttgtccttcc taaaaaacct tcgcctcatc ctaggagagg agcagctaga agggaattac	1260
tccttctacg tcctcgacaa ccagaacttg cagcaactgt gggactggga ccaccgcaac	1320
ctgaccatca aagcaggga aatgtacttt gctttcaatc ccaaattatg tgtttccgaa	1380
atttaccgca tggaggaagt gacggggact aaagggcgcc aaagcaaagg ggacataaac	1440

accaggaaca acggggagag agcctcctgt gaaagtgacg tcctgcattt cacctccacc	1500
accacgtcga agaatcgcat catcataacc tggcacccgg accggccccc tgactacagg	1560
gatctcatca gcttcaccgt ttactacaag gaagcaccct ttaagaatgt cacagagtat	1620
gatgggcagg atgcttgctg ctccaacagc tggaacatgg tggacgtgga cctccccgcc	1680
aacaaggacg tggagccccg catcttacta catgggctga agccctggac tcagtacgcc	1740
gtttacgtca aggctgtgac cctcaccatg gtggagaacg accatatccg tggggccaag	1800
agtgagatct tgtacattcg caccaatgct tcagttcctt ccattccctt ggacgttctt	1860
tcagcatcga actcctcttc tcagttaatc gtgaagtgga accctccctc tctgccaac	1920
ggcaacctga gttactacat tgtgcgtgg cagcggcagc ctcaggacgg ctacctttac	1980
cggcacaatt actgctcaa agacaaaatc cccatcagga agtatgccga cggcaccatc	2040
gacattgagg aggtcacaga gaaccccaag actgaggtgt gtggtgggga gaaagggcct	2100
tgtgctgcct gccccaaaac tgaagccgag aagcaggccg agaaggagga ggctgaatac	2160
cgcaaagtct ttgagaattt cctgcacaac tccatcttcg tgcccagacc tgaaaggaag	2220
cggagagatg tcatgcaagt ggccaacacc accatgtcca gccgaagcag gaacaccacg	2280
gccgcagaca cctacaacat caccgaccg gaagagctgg agacagagta ccctttcttt	2340
gagagcagag tggataacaa ggagagaact gtcattttcta accttcggcc ttacacattg	2400
taccgcatcg atatccacag ctgcaaccac gaggtgaga agctgggctg cagcgcctcc	2460
aacttcgtct ttgcaaggac tatgcccga gaaggagcag atgacattcc tgggccagtg	2520
acctgggagc caaggcctga aaactccatc tttttaagt ggccggaacc tgagaatccc	2580
aatggattga ttctaagtga tgaaataaaa tacggatcac aagttgagga tcagcgagaa	2640
tgtgtgtcca gacaggaata caggaagtat ggaggggcca agctaaaccg gctaaaccg	2700
gggaactaca cagcccggat tcaggccaca tctctctctg ggaatgggtc gtggacagat	2760
cctgtgttct tctatgtcca ggccaaaaca ggatatgaaa acttcatcca tctgatcatc	2820

gctctgccccg tcgctgtcct gttgatcgtg ggaggggttg tgattatgct gtacgtcttc	2880
catagaaaga gaaataacag caggctgggg aatggagtgc tgtatgcctc tgtgaacccg	2940
gagtacttca gcgctgctga tgtgtacgtt cctgatgagt gggaggtggc tcgggagaag	3000
atcaccatga gccgggaact tgggcagggg tcgtttggga tggctctatga aggagttgcc	3060
aaggggtgtgg tgaaagatga acctgaaacc agagtggcca ttaaaacagt gaacgaggcc	3120
gcaagcatgc gtgagaggat tgagtttctc aacgaagctt ctgtgatgaa ggagttcaat	3180
tgtcaccatg tgggtgcgatt gctgggtgtg gtgtcccaag gccagccaac actggtcatc	3240
atggaactga tgacacgggg cgatctcaaa agttatctcc ggtctctgag gccagaaatg	3300
gagaataatc cagtcctagc acctccaagc ctgagcaaga tgattcagat ggccggagag	3360
attgcagacg gcatggcata cctcaacgcc aataagttcg tccacagaga ccttgctgcc	3420
cggaattgca tggtagccga agatttcaca gtcaaaatcg gagattttgg tatgacgcga	3480
gatatctatg agacagacta ttaccggaaa ggagggaaaag ggctgctgcc cgtgcgctgg	3540
atgtctcctg agtccctcaa ggatggagtc ttcaccactt actcggacgt ctggtccttc	3600
ggggtcgtcc tctgggagat cgccacactg gccgagcagc cctaccaggg cttgtccaac	3660
gagcaagtcc ttcgcttcgt catggagggc ggccttctgg acaagccaga caactgtcct	3720
gacatgctgt ttgaactgat gcgcatgtgc tggcagtata accccaagat gaggccttcc	3780
ttcctggaga tcatcagcag catcaaagag gagatggagc ctggcttccg ggaggtctcc	3840
ttctactaca gcgaggagaa caagctgccc gagccggagg agctggacct ggagccagag	3900
aacatggaga gcgtccccct ggacccctcg gcctcctcgt cctccctgcc actgcccgac	3960
agacactcag gacacaaggc cgagaacggc cccggccctg ggggtgctggc cctccgcgcc	4020
agcttcgacg agagacagcc ttacgcccac atgaacgggg gccgcaagaa cgagcggggc	4080
ttgccgctgc cccagtcttc gacctgcgac taaaagacg atgacgacaa gtgagcggcc	4140
gc	4142