



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

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



1-0045000

(51)<sup>2020.01</sup> C07K 16/28; A61P 25/28; A61K 39/00; (13) B  
A61K 39/395

(21) 1-2021-07402

(22) 29/06/2020

(86) PCT/JP2020/025465 29/06/2020

(87) WO2021/002312 07/01/2021

(30) 2019-122982 01/07/2019 JP

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/04/2022 409A

(71) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)

4-6-10 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo 1128088, Japan

(72) INOUE, Eiji (JP); YAMADA, Akio (JP); KAWAKATSU, Tomomi (JP); IMAI, Toshio (JP); DEGUCHI, Maki (JP); NAKATANI, Aki (JP).

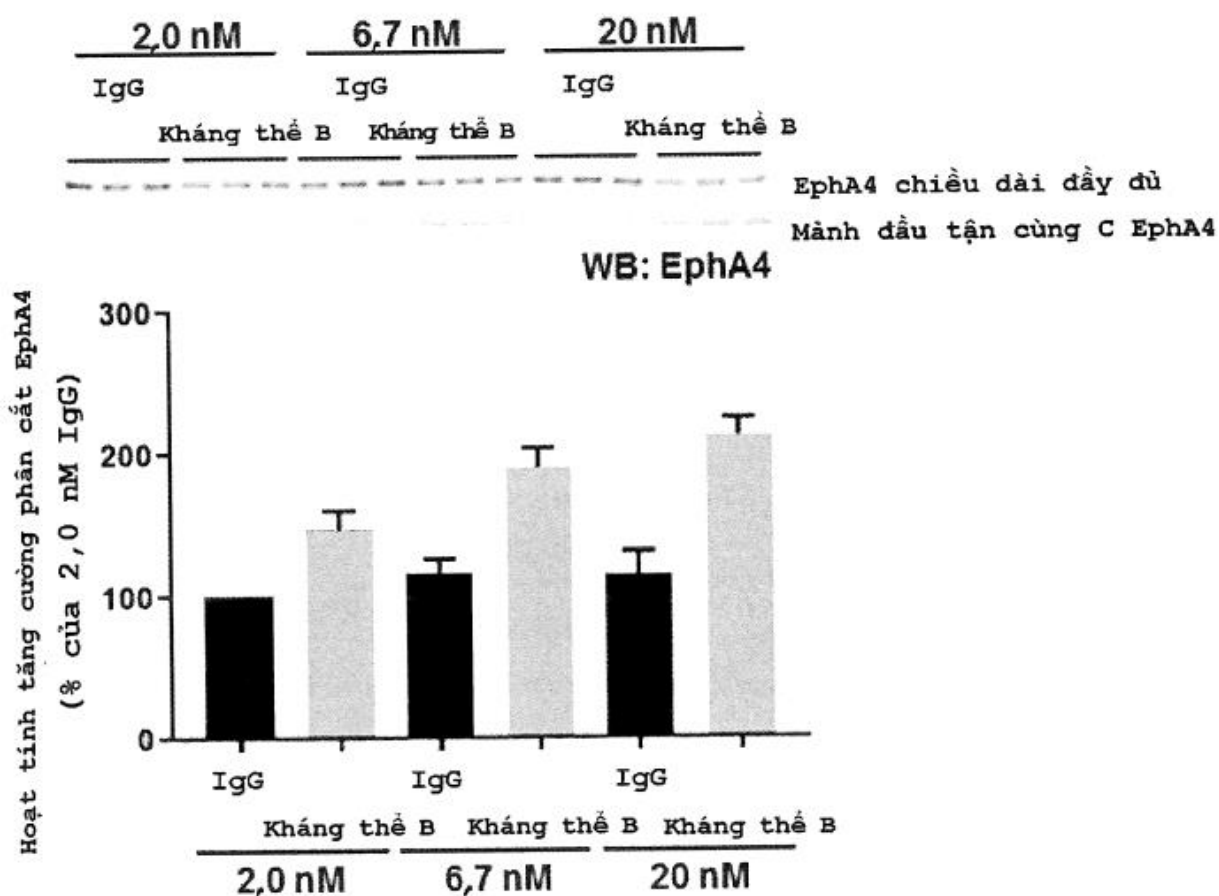
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG EPHA4 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2021-07402

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng EphA4 mà có thể liên kết với EphA4 và thúc đẩy sự phân cắt của EphA4; và được phẩm có chứa kháng thể này làm thành phần hoạt tính. Kháng thể kháng EphA4 của chuột nhắt có ái lực liên kết đối với EphA4 và có khả năng thúc đẩy sự phân cắt của EphA4 được thu lấy, và trình tự của vùng xác định tính bổ sung (complementarity-determining region - CDR) của kháng thể kháng EphA4 của chuột nhắt được xác định. Tiếp theo, kháng thể kháng EphA4 đã được nhắm đích được thu lấy bằng cách điều chế kháng thể được làm cho giống người của kháng thể kháng EphA4 của chuột nhắt.

FIG.13



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến kháng thể mà liên kết với EphA4, axit nucleic mà mã hóa cho kháng thể này, vectơ mà có chứa axit nucleic này, tế bào có chứa vectơ này, phương pháp sản xuất kháng thể, và được phẩm có chứa kháng thể.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

EphA4 là thành viên của họ thụ thể tyrosin kinaza. Ephrin týp A và týp B đã được biết là phối tử đối với EphA4, và khi EphA4 liên kết với ephrin mà là phối tử của chúng, tín hiệu khử dính được gây cảm ứng. Cho đến nay, sự tham gia của EphA4 trong bệnh học của bệnh Alzheimer (sau đây còn được đề cập đến dưới dạng "AD") đã được gợi ý (Các Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 1-4), và đã có báo cáo rằng sự ức chế của sự liên kết giữa EphA4 và ephrin giúp chữa rối loạn chức năng qua trung gian oligome amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ )<sub>(1-42)</sub> của sự dẫn truyền thần kinh (Tài Liệu Sáng Chế 1). Trong AD, người ta cho rằng khối kết tụ (đám rối thần kinh) tạo thành bởi tau bị phosphoryl hóa quá mức tham gia vào sự chết tế bào thần kinh (Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 5), và cũng đã có báo cáo rằng sự kìm hãm của sự phosphoryl hóa tau kìm hãm sự thoái hóa thần kinh của sự biến mất của xy-náp (Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 6 và Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 7), cũng như là cải thiện sự thiếu hụt trí nhớ hoặc rối loạn chức năng nhận thức (Các Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 8-11). Có các báo cáo gợi ý rằng sự hoạt hóa của CDK5 là nguyên nhân của sự phosphoryl hóa tau (Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 12 và Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 13). Chuột nhắt đã được cải biến di truyền biểu hiện đột biến P301L mà đã được phát hiện ở sa sút trí tuệ trán-thái dương thể gia đình (chuột nhắt rTg4510) là chuột nhắt mô hình AD, và tương tự với AD, sự phosphoryl hóa quá mức của tau và sự tích lũy bất thường của tau trong tế bào noron được phát hiện ở con chuột nhắt này. Ở chuột nhắt rTg4510, đám rối thần kinh, dấu hiệu bệnh lý của AD, được tạo thành và gây ra rối loạn chức năng nhận thức bởi sự teo não và sự mất noron (Tài Liệu

Không Phải Sáng Chế 14 và Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 5).

EphA4 được biểu hiện nhiều ở hồi hải mã hoặc vỏ não, và được phân cắt phụ thuộc hoạt tính thần kinh bằng metalloprotease nền (matrix metalloprotease - MMP), ADAM (disintegrin và metalloproteinaza), và  $\gamma$  selectaza. Đã biết rằng phản ứng phân cắt này của EphA4 làm ổn định gai mà là cấu trúc quan trọng trong chức năng thần kinh (Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 15). Đã có báo cáo rằng mật độ của gai bị giảm đi ở AD (Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 16), và do sự giảm đi của các mảnh được phân cắt của EphA4 cũng được xác nhận ở AD ở các giai đoạn NFT V và VI, người ta cho rằng phản ứng phân cắt EphA4 tham gia vào bệnh học của AD (Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 17).

Mặc dù peptit KYL và hợp chất 1 v.v. đã được biết là các thuốc ức chế EphA4 hiện có (Tài Liệu Sáng Chế 2, Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 18, và Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 19), không có báo cáo nào về kháng thể có hoạt tính mà làm tăng cường sự phân cắt của EphA4.

Danh mục viện dẫn

[Tài Liệu Sáng Chế 1] WO2016/019280A1

[Tài Liệu Sáng Chế 2] WO2012/156351A1

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 1] Vargas LM et al., PLoS One. 2014 Mar 21; 9 (3)

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 2] Fu AK et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jul 8; 111 (27): 9959-64

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 3] Rosenberger AF et al., Acta Neuropathol Commun. 2014 Jul 16; 2: 79

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 4] Huang TY et al., J Exp Med. 2017 Dec 4; 214 (12): 3669-3685.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 5] Santa Cruz et al., Science. 2005 Jul 15; 309 (5733):



476-81

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 6] Seo J et al., J Neurosci. 2017 Oct 11; 37 (41): 9917-9924

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 7] Patrick GN et al., Nature. 1999 Dec 9; 402 (6762): 615-22.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 8] Onishi T et al., J Neurochem. 2011 Dec; 119 (6): 1330-40

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 9] Belfiore R et al., Aging Cell. 2019 Feb; 18 (1): e12873.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 10] Webster SJ et al., Front Genet. 2014 Apr 23; 5: 88.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 11] Grayson B et al., Behav Brain Res. 2015 May 15; 285: 176-93.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 12] Cancino GI et al., Neurobiol Aging. 2011 Jul; 32 (7): 1249-61.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 13] Vargas LM et al., Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Apr; 1864: 1148-1159.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 14] Ramsden M et al., J Neurosci. 2005 Nov 16; 25 (46): 10637-47.

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 15] Inoue E et al., J Cell Biol. 2009 May 4; 185 (3): 551-64

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 16] Boros et al., Ann Neurol. 2017 Oct; 82 (4): 602-614

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 17] Matsui C et al., Brain Pathol. 2012 Nov; 22 (6): 776-87. doi: 10.1111/j.1750-3639

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 18] Goldshmit et al., PLoS one. 2011; 6 (9): e24636

[Tài Liệu Không Phải Sáng Chế 19] Van Hoecke et al., Nature Medicine. 2012 Sep; 18 (9): 1418-22,2012

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

#### **Các Vấn Đề Được Giải Quyết Bởi Sáng Chế**

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng EphA4 mà có thể liên kết với EphA4 và tăng cường sự phân cắt của EphA4, cũng như là được phẩm có chứa kháng thể làm thành phần hoạt tính.

#### **Giải Pháp Kỹ Thuật Để Giải Quyết Vấn Đề**

Kết quả của việc nghiên cứu bao quát để giải quyết các vấn đề nêu trên là, các tác giả sáng chế thu được kháng thể đơn dòng kháng EphA4 của chuột nhắt mà có thể liên kết với EphA4 và tăng cường sự phân cắt của EphA4, và tạo ra kháng thể được làm cho giống người của kháng thể này để nhờ đó tiến tới kháng thể hoàn chỉnh được quan tâm.

Sáng chế bao hàm các đặc điểm sau đây.

#### **(1) Kháng thể kháng EphA4, trong đó**

kháng thể kháng EphA4 này có chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và có chứa:

- (a) CDR1 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 44;
- (b) CDR2 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 27;
- (c) CDR3 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 28;
- (d) CDR1 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 29;
- (e) CDR2 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 30; và
- (f) CDR3 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 31.

(2) Kháng thể kháng EphA4 theo (1), trong đó kháng thể kháng EphA4 này được làm cho giống người.

(3) Kháng thể kháng EphA4 theo (1) hoặc (2), trong đó kháng thể kháng EphA4

này liên kết đặc hiệu với EphA4 và làm tăng cường sự phân cắt của EphA4.

(4) Kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (3), trong đó kháng thể kháng EphA4 này liên kết đặc hiệu với EphA4 và ức chế sự liên kết giữa EphA4 và ephrin.

(5) Kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (4), trong đó

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 45, và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 46.

(6) Kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (5), trong đó

vùng không đổi của chuỗi nặng và vùng không đổi của chuỗi nhẹ có chứa các trình tự axit amin có nguồn gốc từ kháng thể người.

(7) Kháng thể kháng EphA4 theo (6), trong đó

vùng không đổi của chuỗi nặng là vùng không đổi của IgG người.

(8) Kháng thể kháng EphA4 theo (7), trong đó

vùng không đổi của IgG người là vùng không đổi của IgG<sub>2</sub> người.

(9) Kháng thể kháng EphA4 theo (8), trong đó

vùng không đổi của IgG<sub>2</sub> người có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 47.

(10) Kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (6) - (9), trong đó

vùng không đổi của chuỗi nhẹ là vùng không đổi của IgG<sub>1</sub> người.

(11) Kháng thể kháng EphA4 theo (10), trong đó

vùng không đổi của Igk người có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 48.

(12) Kháng thể kháng EphA4, trong đó

kháng thể kháng EphA4 này có chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 59, và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 60.

(13) Kháng thể kháng EphA4 theo (12), trong đó

lysine ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng bị làm khuyết.

(14) Kháng thể kháng EphA4, trong đó

kháng thể kháng EphA4 này có chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 59, chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 60, và lysine ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng bị làm khuyết.

(15) Axit nucleic đã được phân lập mã hóa cho kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14).

(16) Vector có chứa axit nucleic theo (15).

(17) Tế bào chủ có chứa vector theo (16).

(18) Phương pháp sản xuất kháng thể kháng EphA4, có chứa bước nuôi cấy tế bào chủ theo (17).

(19) Dược phẩm có chứa kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14).

(20) Dược phẩm theo (19), trong đó dược phẩm này có chứa ít nhất là một chất mang dược dụng.

(21) Dược phẩm theo (19) hoặc (20), để điều trị bệnh Alzheimer.

(22) Kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14) để sử dụng trong việc điều trị bệnh Alzheimer.

(23) Phương pháp điều trị bệnh Alzheimer, bao gồm bước cho bệnh nhân cần chúng dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14).

(24) Sử dụng kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14) để sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh Alzheimer.

(25) Dược phẩm theo (19) hoặc (20), để điều trị bệnh do protein tau.

(26) Kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14) để sử dụng trong việc điều trị bệnh do protein tau.

(27) Phương pháp điều trị bệnh do protein tau, bao gồm bước cho bệnh nhân cần chúng dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14).

(28) Sử dụng kháng thể kháng EphA4 theo mục bất kỳ trong số các mục (1) - (14) để sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh do protein tau.

(29) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo mục bất kỳ trong số các mục (25) - (28), trong đó bệnh do protein tau là bệnh Alzheimer hoặc bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau.

(30) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (29), trong đó bệnh do protein tau là bệnh Alzheimer.

(31) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (29), trong đó bệnh do protein tau là bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau.

(32) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (31), trong đó bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau là bệnh liệt trên

nhân tiến triển, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền, sa sút trí tuệ hạt ưa bạc, sa sút trí tuệ lão suy thuộc kiểu đám rối thần kinh, hoặc bệnh Pick.

(33) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (32), trong đó bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau là bệnh liệt trên nhân tiến triển.

(34) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (32), trong đó bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau là bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền.

(35) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (32), trong đó bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau là sa sút trí tuệ hạt ưa bạc.

(36) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (32), trong đó bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau là sa sút trí tuệ lão suy thuộc kiểu đám rối thần kinh.

(37) Dược phẩm, kháng thể kháng EphA4, phương pháp điều trị, hoặc sử dụng theo (32), trong đó bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau là bệnh Pick.

### Hiệu Quả Của Sáng Chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng EphA4 mà có thể liên kết với EphA4 và tăng cường sự phân cắt của EphA4, axit nucleic mà mã hóa cho kháng thể này, vectơ mà có chứa axit nucleic này, tế bào có chứa vectơ này, phương pháp sản xuất kháng thể, và dược phẩm có chứa kháng thể làm thành phần hoạt tính.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A) chống lại EphA4 của chuột nhắt và người.

Hình 2 thể hiện hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A) sử dụng noron hồi hải mã.

Hình 3 thể hiện hoạt tính ức chế liên kết EphA4 chuột nhất-phối tử chuột nhất của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A).

Hình 4 thể hiện hoạt tính ức chế liên kết EphA4 người-phối tử người của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A).

Hình 5 thể hiện tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A) chống lại mỗi thụ thể Eph người.

Hình 6 thể hiện tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A) chống lại mỗi thụ thể Eph chuột nhất.

Hình 7 thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A) chống lại EphA4 chuột nhất, chuột công, khỉ, và người.

Hình 8 thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A) chống lại vùng ngoại bào (extracellular region - ECD) của EphA4 người, miền liên kết phối tử (ligand binding domain - LBD), miền 1 fibronectin týp III (FN1), và miền 2 fibronectin týp III (FN2).

Hình 9 thể hiện tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (kháng thể A) lên việc làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã.

Hình 10 thể hiện tác dụng kìm hãm sự phosphoryl hóa tau của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 *in vivo*.

Hình 11A thể hiện các axit amin của Miền Liên Kết Phối Tử EphA4 (EphA4-LBD) trên trục nằm ngang, và vùng cấu trúc của kháng thể A-Fab trên trục thẳng đứng. Bit màu đen thể hiện điểm giao nhau của các dạng kết hợp có sự tương tác.

Hình 11B thể hiện cấu trúc bề mặt của Miền Liên Kết Phối Tử EphA4 (EphA4-LBD). Trên Hình 11B, tên axit amin và số lượng gốc chứa trong vùng liên kết được thể

hiện tại các vị trí tương ứng, và các CDR của chuỗi H và chuỗi L của kháng thể liên kết A-Fab được thể hiện trong mô hình ruy băng.

Hình 12 thể hiện ái lực của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) chống lại EphA4 người.

Hình 13 thể hiện hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) ở noron hồi hải mã.

Hình 14 thể hiện hoạt tính ức chế liên kết EphA4 người-phối tử người của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B).

Hình 15 thể hiện hoạt tính ức chế liên kết EphA4 chuột nhất-phối tử chuột nhất của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B).

Hình 16 thể hiện tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) chống lại thụ thể Eph người.

Hình 17 thể hiện tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) chống lại thụ thể Eph chuột nhất.

Hình 18 thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) chống lại EphA4 chuột nhất, chuột cống, khỉ, và người.

Hình 19 thể hiện khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) chống lại vùng ngoại bào (ECD) của EphA4 người, miền liên kết phối tử (LBD), miền 1 fibronectin tít III (FN1), và miền 2 fibronectin tít III (FN2).

Hình 20 thể hiện tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) lên việc làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã.

Hình 21 thể hiện hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 người của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) ở noron hồi hải mã.



Hình 22 thể hiện tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) thông qua MMP và ADAM lên việc làm tăng số lượng gai ở neuron hồi hải mã.

Hình 23 thể hiện tác dụng kìm hãm sự phosphoryl hóa tau của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người (kháng thể B) *in vivo*.

### Mô tả chi tiết các phương án thực hiện sáng chế

Các vùng được xác định hoặc được mã hóa bởi các SEQ ID NO. dùng trong bản mô tả này như sau:

| SEQ No. | Vùng Trình Tự                                                         | SEQ No | Vùng Trình Tự                                              |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------|
| 1       | EphA4 chuột nhắt (trình tự axit amin)                                 | 32     | EphA4 khỉ (trình tự axit amin)                             |
| 2       | Vùng ngoại bào của EphA4 chuột nhắt (trình tự axit amin)              | 33     | Vùng ngoại bào của EphA4 khỉ (trình tự axit amin)          |
| 3       | Protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His (trình tự axit amin) | 34     | Trình tự tín hiệu của EphA4 người (trình tự axit amin)     |
| 4       | Trình tự tín hiệu của EphA4 chuột nhắt (trình tự axit amin)           | 35     | Trình tự tín hiệu của preprotrypsin (trình tự axit amin)   |
| 5       | EphA4 người (trình tự axit amin)                                      | 36     | Vùng ngoại bào của EphA4 người (trình tự axit amin)        |
| 6       | Vùng ngoại bào của EphA4 người(trình tự axit amin)                    | 37     | Miền liên kết phối tử của EphA4 người (trình tự axit amin) |

|    |                                                                             |    |                                                                      |
|----|-----------------------------------------------------------------------------|----|----------------------------------------------------------------------|
| 7  | OligoDNA ad29S (trình tự axit nucleic)                                      | 38 | Miền 1 fibronectin tít III của EphA4 người (trình tự axit amin)      |
| 8  | OligoDNA ad29AS (trình tự axit nucleic)                                     | 39 | Miền 2 fibronectin tít III của EphA4 người (trình tự axit amin)      |
| 9  | Đoạn mồi xuôi 5' (trình tự axit nucleic)                                    | 40 | FR chuỗi nhẹ IGKV1-17*01 của kháng thể người (trình tự axit amin)    |
| 10 | Đoạn mồi ngược 3' đối với chuỗi nặng IgG chuột nhắt (trình tự axit nucleic) | 41 | FR chuỗi nhẹ JK4 của kháng thể người (trình tự axit amin)            |
| 11 | Đoạn mồi ngược 3' đối với chuỗi nhẹ Igk chuột nhắt (trình tự axit nucleic)  | 42 | FR chuỗi nặng IGHV3-33*03 của kháng thể người (trình tự axit amin)   |
| 12 | Trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit amin)           | 43 | FR chuỗi nặng JH6 của kháng thể người (trình tự axit amin)           |
| 13 | Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit amin)               | 44 | CDR1 chuỗi nặng của kháng thể B (trình tự axit amin)                 |
| 14 | Trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể A (trình tự axit amin)            | 45 | Vùng biến đổi chuỗi nặng HK2-42 của kháng thể B (trình tự axit amin) |
| 15 | Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể A (trình tự axit amin)                | 46 | Vùng biến đổi chuỗi nhẹ L1-8 của kháng thể B (trình tự axit amin)    |

|    |                                                                          |    |                                                                                       |
|----|--------------------------------------------------------------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                                                          |    | amin)                                                                                 |
| 16 | Trình tự tín hiệu chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit nucleic)     | 47 | Vùng không đổi chuỗi nặng IgG <sub>2</sub> người của kháng thể B (trình tự axit amin) |
| 17 | Vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit nucleic)         | 48 | Vùng không đổi chuỗi nhẹ Igκ người của kháng thể B (trình tự axit amin)               |
| 18 | Trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ của kháng thể A (trình tự axit nucleic)      | 49 | CDR1 chuỗi nặng của kháng thể B (trình tự axit nucleic)                               |
| 19 | Vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể A (trình tự axit nucleic)          | 50 | CDR2 chuỗi nặng của kháng thể B (trình tự axit nucleic)                               |
| 20 | Đoạn nối xuôi 5' đối với chuỗi nặng kháng thể A (trình tự axit nucleic)  | 51 | CDR3 chuỗi nặng của kháng thể B (trình tự axit nucleic)                               |
| 21 | Đoạn nối xuôi 5' đối với chuỗi nhẹ kháng thể A (trình tự axit nucleic)   | 52 | CDR1 chuỗi nhẹ của kháng thể B (trình tự axit nucleic)                                |
| 22 | Đoạn nối ngược 3' đối với chuỗi nặng kháng thể A (trình tự axit nucleic) | 53 | CDR2 chuỗi nhẹ của kháng thể B (trình tự axit nucleic)                                |
| 23 | Đoạn nối ngược 3' đối với chuỗi                                          | 54 | CDR3 chuỗi nhẹ của kháng thể B                                                        |

|    |                                                                |    |                                                                                          |
|----|----------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | nhẹ kháng thể A (trình tự axit nucleic)                        |    | (trình tự axit nucleic)                                                                  |
| 24 | Vùng không đổi chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit amin) | 55 | Vùng biến đổi chuỗi nặng HK2-42 của kháng thể B (trình tự axit nucleic)                  |
| 25 | Vùng không đổi chuỗi nhẹ của kháng thể A (trình tự axit amin)  | 56 | Vùng biến đổi chuỗi nhẹ L1-8 của kháng thể B (trình tự axit nucleic)                     |
| 26 | CDR1 chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit amin)           | 57 | Vùng không đổi chuỗi nặng IgG <sub>2</sub> người của kháng thể B (trình tự axit nucleic) |
| 27 | CDR2 chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit amin)           | 58 | Vùng không đổi chuỗi nhẹ IgG <sub>1</sub> người của kháng thể B (trình tự axit nucleic)  |
| 28 | CDR3 chuỗi nặng của kháng thể A (trình tự axit amin)           | 59 | Trình tự chiều dài đầy đủ chuỗi nặng của kháng thể B (trình tự axit amin)                |
| 29 | CDR1 chuỗi nhẹ của kháng thể A (trình tự axit amin)            | 60 | Trình tự chiều dài đầy đủ chuỗi nhẹ của kháng thể B (trình tự axit amin)                 |
| 30 | CDR2 chuỗi nhẹ của kháng thể A (trình tự axit amin)            | 61 | Trình tự chiều dài đầy đủ chuỗi nặng của kháng thể B (trình tự axit nucleic)             |

|    |                                                        |    |                                                                                   |
|----|--------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 31 | CDR3 chuỗi nhẹ của kháng thể A<br>(trình tự axit amin) | 62 | Trình tự chiều dài đầy đủ chuỗi<br>nhẹ của kháng thể B (trình tự axit<br>nucleic) |
|----|--------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------|

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng EphA4 mà liên kết với EphA4.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế là kháng thể mà có thể nhận diện và liên kết với EphA4, và như được mô tả dưới đây, kháng thể có thể là kháng thể nguyên vẹn, hoặc có thể là kháng thể tổng hợp (chẳng hạn như kháng thể tái tổ hợp, kháng thể khảm, kháng thể được làm cho giống người, và dạng tương tự), miễn là nó có ái lực liên kết với EphA4. EphA4 ở đây có thể được hiểu là đề cập đến EphA4 có nguồn gốc từ người, chuột nhắt, chuột cống, và khỉ. EphA4 có nguồn gốc từ người, chuột nhắt, chuột cống, và khỉ có thể được thu lấy từ cơ sở dữ liệu công khai trong đó thông tin trình tự được đăng ký, chẳng hạn như Genbank được cung cấp bởi Trung Tâm Thông Tin Công Nghệ Sinh Học Quốc Gia Hoa Kỳ (the United States National Center for Biotechnology Information), hoặc thông tin trình tự gen EphA4 có thể được thu lấy bằng cách thiết kế các đoạn mồi dựa trên thông tin trình tự cơ sở của EphA4 của loài động vật có quan hệ gần, và sau đó tách dòng từ ARN được chiết từ loài động vật mong muốn. Ví dụ như, thông tin trình tự cơ sở của EphA4 người, chuột nhắt, chuột cống, và khỉ được đăng ký trong cơ sở dữ liệu lần lượt dưới dạng Mã Số Truy Cập Genbank Số NM\_004438.5, NM\_007936.3, NM\_001162411.1, và NM\_001260870.1.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng EphA4 là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với EphA4. Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" là thuật ngữ đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, và phương pháp xác định sự liên kết đặc hiệu giữa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng và kháng nguyên hoặc epitop cũng được biết rõ. Theo một phương án, "liên kết đặc hiệu" được hiểu là kháng thể kháng EphA4 có thể liên kết với EphA4 bằng phản ứng miễn dịch với ái lực liên kết và hoạt tính liên kết cao hơn, nhanh hơn, và/hoặc trong khoảng thời gian

dài hơn so với khi liên kết với phân tử đích khác. Điều này không có nghĩa là kháng thể mà liên kết đặc hiệu với EphA4 không liên kết với phân tử đích khác. Theo phương án khác, "liên kết đặc hiệu" có thể được thể hiện bằng kháng thể có KD chống lại EphA4 bằng ít nhất là khoảng  $10^{-7}$  M, hoặc ít nhất là khoảng  $10^{-8}$  M, hoặc ít nhất là khoảng  $10^{-9}$  M, hoặc thấp hơn. Hơn nữa, theo phương án khác nữa, "liên kết đặc hiệu" được hiểu là sự liên kết với EphA4 bằng phản ứng miễn dịch nhưng không liên kết đáng kể với các phân tử họ khác của thụ thể Eph.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng EphA4 là kháng thể mà liên kết với vùng ngoại bào của EphA4. Theo một phương án, kháng thể kháng EphA4 là kháng thể mà liên kết với miền liên kết phối tử (LBD) trong số các vùng ngoại bào của EphA4.

Theo một phương án, kháng thể kháng EphA4 có thể liên kết đặc hiệu với EphA4 và tăng cường sự phân cắt của EphA4. Theo phương án cụ thể, kháng thể kháng EphA4 có thể liên kết đặc hiệu với EphA4 và tăng cường sự phân cắt của miền ngoại bào EphA4 bằng metalloproteasea nền (MMP) hoặc ADAM (disintegrin và metalloproteinaza).

Theo một phương án, kháng thể kháng EphA4 có thể liên kết đặc hiệu với EphA4 và ức chế sự liên kết giữa EphA4 và ephrin mà là phối tử của chúng.

Theo phương án khác, kháng thể kháng EphA4 có thể liên kết đặc hiệu với EphA4 và làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã hoặc làm ổn định các gai ở noron hồi hải mã.

Theo một phương án, sáng chế bao hàm kháng thể kháng EphA4 mà có thể liên kết đặc hiệu với ít nhất là một trong số EphA4 người, EphA4 chuột nhắt, EphA4 chuột cống, và EphA4 khỉ và ức chế sự liên kết với phối tử của chúng. Theo phương án khác, sáng chế bao hàm kháng thể kháng EphA4 mà có thể liên kết đặc hiệu với hai hoặc hơn hai trong số EphA4 người, EphA4 chuột nhắt, EphA4 chuột cống, và EphA4 khỉ và ức chế sự liên kết với phối tử của chúng. Theo phương án khác nữa, sáng chế bao hàm

kháng thể kháng EphA4 mà có thể liên kết đặc hiệu với tất cả EphA4 người, EphA4 chuột nhắt, EphA4 chuột cống, và EphA4 khi và ức chế sự liên kết với phối tử của chúng.

Đối với phương pháp đo tính chất liên kết kháng nguyên (chẳng hạn như ái lực liên kết và khả năng phản ứng chéo loài) của kháng thể kháng EphA4, phương pháp đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan có thể được sử dụng. Ví dụ như, ái lực liên kết có thể được đo bằng cách sử dụng, nhưng không giới hạn ở, cảm biến sinh học Biacore™, cảm biến sinh học KinExA, thử nghiệm lân cận nhấp nháy, ELISA, thử nghiệm miễn dịch ORIGIN (IGEN), đếm tế bào theo dòng, dập tắt huỳnh quang, di căn huỳnh quang, hiển thị nấm men, và/hoặc nhuộm màu miễn dịch. Hoạt tính trung hòa của kháng thể kháng EphA4 chống lại sự liên kết giữa EphA4 và phối tử của chúng có thể được đo bằng cách sử dụng, nhưng không giới hạn ở, cảm biến sinh học Biacore™, ELISA, và/hoặc đếm tế bào theo dòng.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể là kháng thể đơn dòng miễn là nó liên kết với EphA4.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể thuộc lớp bất kỳ chẳng hạn như IgG, IgA, hoặc IgM (hoặc phân lớp của chúng), và không bị giới hạn ở lớp cụ thể. Globulin miễn dịch được phân loại thành các lớp khác nhau phụ thuộc vào trình tự axit amin kháng thể của vùng không đổi của chuỗi nặng (có thể được đề cập đến dưới dạng chuỗi H). Có năm lớp globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một số trong số chúng có thể được chia tiếp thành các phân lớp (isotyp) ví dụ như IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, và IgA<sub>2</sub>. Vùng không đổi của chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của globulin miễn dịch lần lượt được gọi là  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , và  $\mu$ . Hơn nữa, các loại của chuỗi nhẹ (có thể được đề cập đến dưới dạng chuỗi L) của kháng thể là chuỗi  $\lambda$  và chuỗi  $\kappa$ . Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể là kháng thể IgG, ví dụ như có thể là kháng thể IgG<sub>1</sub> hoặc kháng thể IgG<sub>2</sub>, và dạng tương tự. Hơn nữa, kháng thể kháng

EphA4 theo sáng chế có thể trong một số trường hợp ở dạng monome, dime, hoặc multime.

Vùng biến đổi của kháng thể theo sáng chế có thể có nghĩa là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kháng thể và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng kháng thể, và vùng không đổi của kháng thể có thể có nghĩa là vùng không đổi của chuỗi nhẹ kháng thể và/hoặc vùng không đổi của chuỗi nặng kháng thể. Mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ gồm có bốn vùng khung (FR) được nối bằng ba CDR còn được gọi là vùng xác định tính bổ sung. CDR trong mỗi chuỗi được giữ trong khoảng cách gần bằng FR, và cùng với CDR trong chuỗi khác, đóng góp vào sự tạo thành của vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể. Công nghệ để xác định CDR bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ như, (1) phương pháp dựa trên độ biến đổi trình tự chéo loài (ví dụ như Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); và (2) phương pháp dựa trên nghiên cứu cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể (Al-lazikani et al., 1997 J. Molec. Biol. 273: 927-948). Các phương pháp này và các phương pháp khác có thể được sử dụng kết hợp.

Kháng thể đơn dòng ở đây có thể có nghĩa là kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản đồng nhất. Nói cách khác, các kháng thể riêng lẻ chứa trong quần thể giống nhau ngoại trừ đối với các thể đột biến tự nhiên mà có thể có khả năng có mặt ở lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng chống lại vị trí kháng nguyên đơn lẻ, và rất đặc hiệu. Hơn nữa, trái ngược với kháng thể đa dòng thông thường mà nhắm đích các kháng nguyên khác nhau hoặc các epitop khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng nhắm đích epitop đơn lẻ của kháng nguyên. Từ bỏ nghĩa "đơn dòng" chỉ ra tính chất của kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về cơ bản đồng nhất, và không được hiểu theo cách giới hạn là đòi hỏi sự sản xuất của kháng thể bằng phương pháp cụ thể.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể là kháng thể chuột nhất, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được làm cho giống người. Kháng thể khảm ví dụ như là



kháng thể trong đó vùng biến đổi của kháng thể không phải của người (chẳng hạn như chuột nhắt hoặc chuột cống) được dung hợp với vùng không đổi của kháng thể người, và ví dụ như có thể dùng để chỉ kháng thể trong đó vùng biến đổi có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người và vùng không đổi có nguồn gốc từ kháng thể người. Kháng thể được làm cho giống người ví dụ như là kháng thể trong đó vùng xác định tính bổ sung (CDR (có thể còn được đề cập đến dưới dạng vùng siêu biến)) của kháng thể không phải của người được đưa vào trong kháng thể người, và ví dụ như có thể dùng để chỉ kháng thể trong đó CDR có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người và các vùng còn lại của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể người. Lưu ý rằng ranh giới giữa kháng thể khảm và kháng thể được làm cho giống người không nhất thiết phải rõ ràng, và kháng thể có thể ở trạng thái mà có thể được gọi là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm cho giống người. Hơn nữa, trong kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm cho giống người, vùng kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể người (FR, vùng không đổi) không nhất thiết phải đều gồm có các axit amin có nguồn gốc từ kháng thể người, và có thể có chứa một hoặc nhiều axit amin có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người, miễn là nó có thể được sử dụng bình thường ở đối tượng người. Một phương án của kháng thể được làm cho giống người là kháng thể trong đó CDR có nguồn gốc từ kháng thể động vật gặm nhấm và các vùng còn lại của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể người. Phương án cụ thể của kháng thể được làm cho giống người là kháng thể trong đó CDR có nguồn gốc từ kháng thể chuột nhắt và các vùng còn lại của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể người. Trong các phương án này, CDR có thể có chứa một hoặc nhiều axit amin có nguồn gốc từ kháng thể không phải của động vật gặm nhấm hoặc một hoặc nhiều axit amin có nguồn gốc từ kháng thể không phải của chuột nhắt, và vùng kháng thể không phải là CDR có thể có chứa một hoặc nhiều axit amin có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người. Ở đây, "nhiều" là, nhưng không giới hạn ở, 2 - 20, hoặc 2 - 15, chẳng hạn như 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, hoặc 2, hoặc trong vòng 10%,

trong vòng 9%, trong vòng 8%, trong vòng 7%, trong vòng 6%, trong vòng 5%, trong vòng 4%, trong vòng 3%, trong vòng 2%, hoặc trong vòng 1% của số lượng axit amin trong trình tự axit amin. Sự làm cho giống người có thể được thực hiện bằng phương pháp ghép CDR (Kontermann and Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001) và Tsurushita et al., *Methods* 36: 69-83 (2005)), và ngoài ra cũng có thể được thực hiện bằng cách thay thế trình tự CDR bằng trình tự tương ứng trong kháng thể người bằng phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan (xem ví dụ như Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); và Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534-1536 (1988)).

Để làm giảm tính kháng nguyên, có thể quan trọng là chọn sử dụng vùng biến đổi của người trong cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng khi điều chế kháng thể được làm cho giống người. Theo phương pháp "phù hợp nhất", trình tự vùng biến đổi của kháng thể động vật gặm nhấm được sàng lọc trên toàn bộ thư viện của trình tự FR người đã biết. Sau đó, trình tự của người mà gần gũi nhất với trình tự của động vật gặm nhấm được chấp nhận làm FR người của kháng thể được làm cho giống người. Xem ví dụ như Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296-2308 (1993) và Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987). Theo phương pháp khác, khung cụ thể có nguồn gốc từ trình tự phổ biến ở tất cả các kháng thể người của nhóm con cụ thể của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng được sử dụng. Cùng một khung có thể được sử dụng cho một vài kháng thể được làm cho giống người khác nhau. Xem ví dụ như Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Set USA* 89: 4285-4289 (1992) và Presta et al., *J. Immunol.* 151: 2623-2632 (1993).

Hơn nữa, nhìn chung, mong muốn rằng kháng thể được làm cho giống người giữ lại ái lực liên kết cao đối với kháng nguyên và các tính chất sinh học được ưu tiên khác. Để đạt được điều này, theo một phương pháp, kháng thể được làm cho giống người được điều chế bằng bước phân tích trình tự gốc và các sản phẩm được làm cho giống người khái niệm khác nhau bằng cách sử dụng mô hình ba chiều của trình tự gốc và

trình tự được làm cho giống người. Nhìn chung, mô hình globulin miễn dịch ba chiều có sẵn và đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Các chương trình máy tính mà minh họa và thể hiện các hình dạng ba chiều hứa hẹn của các trình tự globulin miễn dịch ứng viên được chọn có sẵn. Việc khảo sát các hình biểu diễn này sẽ cho phép phân tích vai trò có thể có của các gốc trong chức năng của các trình tự globulin miễn dịch ứng viên, tức là phân tích của các gốc mà ảnh hưởng đến khả năng của các globulin miễn dịch ứng viên để liên kết với kháng nguyên của chúng. Với phương pháp này, các gốc FR có thể được chọn từ các trình tự nhận và được nhập và được sử dụng kết hợp sao cho các tính chất kháng thể mong muốn chẳng hạn như sự tăng lên của ái lực liên kết với một hoặc nhiều (các) kháng nguyên đích (chẳng hạn như EphA4 hoặc mảnh của chúng) được hoàn thành.

Không cần phải nói, kháng thể với sự thay đổi thích hợp (chẳng hạn như sự cải biến của kháng thể, hoặc sự thế, sự thêm và/hoặc sự làm khuyết một phần của trình tự axit amin của kháng thể) trong kháng thể khảm hoặc được làm cho giống người được lấy ví dụ ở trên trong khi giữ lại chức năng của kháng thể (hoặc để bổ sung hoặc cải thiện chức năng của kháng thể) cũng được bao hàm trong kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế. Cụ thể hơn, kháng thể có sự thay đổi trong trình tự axit amin của vùng không đổi để cải biến chức năng tác động của kháng thể cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ như, kháng thể có valin (Val) ở vị trí 234 (cách đánh số Eu) của kháng thể IgG<sub>2</sub> người được thế thành alanin (Ala) và có glyxin (Gly) ở vị trí 237 được thế thành alanin (Ala) để làm giảm hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC) và/hoặc hoạt tính thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular phagocytosis - ADCP) v.v. cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, kháng thể đặc hiệu kép mà có vị trí liên kết kháng thể có trình tự CDR của kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế cùng với vị trí liên kết kháng nguyên mà liên kết với kháng nguyên khác (Kontermann (2012), mAbs 4, 182-

97) cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể được cải biến như mong muốn. Sự cải biến của kháng thể kháng EphA4 có thể là sự cải biến mà làm thay đổi (a) cấu trúc ba chiều của trình tự axit amin trong vùng cần được cải biến, chẳng hạn như hình dạng tấm hoặc xoắn v.v.; (b) trạng thái tích điện hoặc kỵ nước của phân tử tại vị trí đích; hoặc (c) tác dụng của sự cải biến lên sự duy trì của thể tích chuỗi bên, hoặc có thể là sự cải biến trong đó các thay đổi này không được quan sát thấy rõ ràng.

Sự cải biến của kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể được thực hiện bằng ví dụ như sự thế, sự làm khuyết, sự thêm, và dạng tương tự của các gốc axit amin cấu thành.

Axit amin ở đây được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó, và không chỉ bao gồm các axit amin tự nhiên, chẳng hạn như serin (Ser), asparagin (Asn), valin (Val), leuxin (Leu), isoleuxin (Ile), alanin (Ala), tyrosin (Tyr), glyxin (Gly), lysin (Lys), arginin (Arg), histidin (His), axit aspartic (Asp), axit glutamic (Glu), glutamin (Gln), threonin (Thr), xystein (Cys), methionin (Met), phenylalanin (Phe), tryptophan (Trp), và prolin (Pro), mà còn bao gồm các axit amin không tự nhiên chẳng hạn như các biến thể và dẫn xuất axit amin. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ tự nhiên hiểu được dựa trên định nghĩa rộng này rằng ví dụ như L-axit amin; D-axit amin; axit amin được cải biến hóa học chẳng hạn như biến thể axit amin và dẫn xuất axit amin; axit amin mà không phải là thành phần protein trong cơ thể chẳng hạn như norloxin,  $\beta$ -alanin, và ornithin; và hợp chất được tổng hợp hóa học có tính chất axit amin đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực, và dạng tương tự được bao gồm làm các axit amin theo sáng chế. Ví dụ về axit amin không tự nhiên có thể bao gồm, ví dụ như, axit  $\alpha$ -metylamin (chẳng hạn như  $\alpha$ -metyllalanin), D-axit amin (chẳng hạn như D-axit aspartic và D-axit glutamic), axit amin giống histidin (chẳng hạn như 2-amino-histidin,  $\beta$ -hydroxy-histidin, homohistidin,  $\alpha$ -flometyl-histidin, và  $\alpha$ -metyl-histidin), axit amin có

metylen dư trên chuỗi bên ("homo" axit amin), và axit amin trong đó axit amin nhóm chức carboxylat trong chuỗi bên được thế bằng nhóm sulfonat (chẳng hạn như axit xysteic).

Các gốc axit amin có trong tự nhiên có thể được phân loại thành ví dụ như các nhóm dưới đây dựa trên tính chất chuỗi bên chung:

- (1) Kị nước: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Ưa nước trung tính: Asn, Gln, Cys, Ser, Thr;
- (3) Có tính axit: Asp, Glu;
- (4) Có tính axit: His, Lys, Arg;
- (5) Gốc mà ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi: Gly, Pro; và
- (6) Thơm: Trp, Tyr, Phe.

Sự thế không bảo toàn của trình tự axit amin cấu thành kháng thể có thể được thực hiện bằng cách trao đổi axit amin thuộc một trong các nhóm này bằng axit amin thuộc nhóm khác. Sự thế bảo toàn hơn có thể được thực hiện bằng cách trao đổi axit amin thuộc vào một trong các nhóm này bằng axit amin khác trong cùng một nhóm. Tương tự, sự làm khuyết hoặc sự thế của trình tự axit amin có thể được thực hiện một cách thích hợp.

Sự cải biến của các axit amin định hình kháng thể có thể là ví dụ như sự glycosyl hóa bằng carbohydrat hoặc sự cải biến sau dịch mã chẳng hạn như sự axetyl hóa hoặc sự phosphoryl hóa. Kháng thể có thể được glycosyl hóa ở vị trí duy trì trong vùng không đổi của nó. Sự glycosyl hóa của kháng thể thường được liên kết N hoặc được liên kết O. Được liên kết N có nghĩa là sự liên kết của phần carbohydrat vào chuỗi bên của gốc asparagin. Các trình tự tripeptit asparagin-X-serin, asparagin-X-threonin, và asparagin-X-xystein (trong đó X là axit amin bất kỳ không phải là prolin) là trình tự nhận diện để bổ sung bằng enzym phần carbohydrat vào chuỗi bên asparagin. Khi một trong số các

trình tự tripeptit này có mặt trong kháng thể, thì vị trí glycosyl hóa tiềm năng có mặt. Sự glycosyl hóa được liên kết O có thể là sự liên kết của N-acetylgalactosamin, galactosa, hoặc xyloza vào axit amin hydroxy (chẳng hạn như serin hoặc threonin), và trong một số trường hợp có thể là sự liên kết với 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể chọn một cách phù hợp điều kiện glycosyl hóa (chẳng hạn như loại tế bào chủ hoặc môi trường tế bào và độ pH v.v., khi sự glycosyl hóa được thực hiện bằng phương thức sinh học) tùy theo mục đích.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể được cải biến thêm bằng các phương pháp cải biến khác, một mình hoặc kết hợp, dựa trên hiểu biết kỹ thuật thông thường đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ như, kháng thể có thể được tạo ra bằng cách tích hợp axit nucleic mã hóa cho kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế vào vector biểu hiện, đưa vector biểu hiện vào trong tế bào chủ, và nuôi cấy tế bào chủ. Theo đó, sáng chế bao hàm axit nucleic mã hóa cho kháng thể kháng EphA4, vector mà có chứa axit nucleic này, tế bào chủ có chứa vector này, và phương pháp sản xuất kháng thể kháng EphA4 có chứa bước nuôi cấy tế bào chủ.

Axit nucleic mã hóa cho kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể có ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu, hoặc có thể có ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu tại đầu tận cùng 5' của ADN mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nặng và ADN mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Trình tự tín hiệu là gốc axit amin có mặt tại đầu tận cùng N của protein mà cần thiết cho protein tiết hoặc protein tích hợp màng để đi qua lớp kép lipid sau khi được tổng hợp trên ribosom, và trong sáng chế, không bị giới hạn cụ thể miễn là nó là trình tự có chức năng này. Các trình tự tín hiệu mà có thể được chứa trong kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế bao gồm các trình tự tín hiệu có nguồn gốc từ người, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, lừa, dê, ngựa, chim, chó, mèo, nấm men, và động vật tương

tự. Cụ thể là, trong sáng chế, peptit có chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 12 hoặc 16 có thể được bao gồm dưới dạng trình tự tín hiệu liên quan đến chuỗi nặng, và peptit có chứa trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 14 hoặc 18 có thể được bao gồm dưới dạng trình tự tín hiệu liên quan đến chuỗi nhẹ. Hơn nữa, miễn là nó tương đương về mặt chức năng, trình tự tín hiệu có thể có sự thể, sự thêm, và/hoặc sự làm khuyết của một hoặc nhiều (chẳng hạn như 2, 3, 4, hoặc 5) axit amin trong trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 12 hoặc 16 và trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO. 14 hoặc 18.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể là kháng thể đã được phân lập hoặc được tinh chế theo phương pháp đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực.

"Đã được phân lập" hoặc "đã được tinh chế" ở đây có nghĩa là đã được phân lập hoặc đã được tinh chế nhân tạo từ trạng thái tự nhiên. Nếu phân tử hoặc hợp phần có trong tự nhiên, nó là "đã được phân lập" hoặc "đã được tinh chế" khi nó được thay đổi hoặc được lấy ra từ môi trường ban đầu, hoặc cả hai. Ví dụ về phương pháp phân lập hoặc tinh chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp đục lỗ điện, sinh học phân tử, miễn dịch học, hoặc sắc ký, và phương pháp tương tự, cụ thể là, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kị nước, sắc ký HPLC pha đảo, tập trung đẳng điện, hoặc phương pháp chiết kiềm, và phương pháp tương tự.

Theo một phương án, kháng thể kháng EphA4 có chứa các CDR sau đây:

- (a) CDR1 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 44;
- (b) CDR2 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 27;
- (c) CDR3 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 28;
- (d) CDR1 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 29;
- (e) CDR2 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 30; và

(f) CDR3 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 31.

[0077]

Theo một phương án, kháng thể kháng EphA4 là kháng thể được làm cho giống người hoặc kháng thể khảm, và theo phương án cụ thể là kháng thể được làm cho giống người.

Theo phương án khác, kháng thể kháng EphA4 có chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, vùng biến đổi của chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 45, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 46. Lưu ý rằng trong phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có thể có chứa trình tự axit amin có một hoặc nhiều axit amin được thế, được thêm, và/hoặc được làm khuyết trong trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 45 và/hoặc trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 46. Ở đây, "nhiều" không bị giới hạn miễn là nó giữ lại ái lực liên kết đối với EphA4 và làm tăng cường sự phân cắt của EphA4, và bằng 2 - 15, hoặc 2 - 10, chẳng hạn như 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, hoặc 2, hoặc trong vòng 10%, chẳng hạn như trong vòng 9%, trong vòng 8%, trong vòng 7%, trong vòng 6%, trong vòng 5%, trong vòng 4%, trong vòng 3%, trong vòng 2%, hoặc trong vòng 1% của số lượng axit amin trong trình tự axit amin.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể kháng EphA4 có chứa vùng không đổi của IgG<sub>2</sub> người.

Theo phương án cụ thể, vùng không đổi của IgG<sub>2</sub> người có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 47.

Theo một phương án, chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4 có chứa vùng không đổi của Igk người.

Theo phương án cụ thể, vùng không đổi của Igk người có chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO. 48.

Theo một phương án, kháng thể kháng EphA4 có chứa chuỗi nặng có chứa trình



tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 59 và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 60.

Theo phương án khác, ví dụ như, vì lí do chẳng hạn như làm giảm sự không đồng nhất của các kháng thể được tạo ra bằng tế bào sản xuất kháng thể (Công Bố Đơn Sáng Chế Mỹ Số 2010/0297697 hoặc Liu H et al., MAbs. 2014 Sep-Oct; 6 (5): 1145-1154), kháng thể kháng EphA4 có lysin nằm ở đầu tận cùng C (đầu tận cùng carboxy) của chuỗi nặng được làm khuyết. Trong sáng chế, kháng thể kháng EphA4 có lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng được làm khuyết cũng bao gồm kháng thể kháng EphA4 có lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng được làm khuyết bằng sự cải biến di truyền hoặc kháng thể kháng EphA4 có lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng được phân cắt sau dịch mã bằng carboxypeptidaza v.v., và dạng tương tự. Hơn nữa, trong sáng chế, kháng thể kháng EphA4 có lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng được làm khuyết không chỉ bao gồm kháng thể kháng EphA4 có lysin ở đầu tận cùng C được làm khuyết trong cả hai chuỗi nặng, mà còn bao gồm kháng thể kháng EphA4 có lysin ở đầu tận cùng C được làm khuyết ở chỉ một chuỗi nặng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến axit nucleic đã được phân lập mã hóa cho kháng thể kháng EphA4. Axit nucleic đã được phân lập mã hóa cho kháng thể kháng EphA4 dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa cho chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4. Theo một phương án, axit nucleic theo sáng chế mã hóa cho chuỗi nặng của kháng thể kháng EphA4. Theo phương án khác, axit nucleic theo sáng chế mã hóa cho chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4. Theo phương án khác nữa, axit nucleic theo sáng chế mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4. Axit nucleic theo sáng chế cũng bao gồm phân tử axit nucleic thứ nhất mã hóa cho chuỗi nặng của kháng thể kháng EphA4 và phân tử axit nucleic thứ hai mã hóa cho chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vector có chứa axit nucleic đã được

phân lập mã hóa cho kháng thể kháng EphA4. Vector theo sáng chế dùng để chỉ một hoặc nhiều vector có chứa axit nucleic đã được phân lập mã hóa cho kháng thể kháng EphA4. Theo một phương án, vector theo sáng chế là vector có chứa axit nucleic mã hóa cho chuỗi nặng của kháng thể kháng EphA4 và axit nucleic mã hóa cho chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4. Theo phương án khác, vector theo sáng chế là vector có chứa axit nucleic mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4. Theo phương án khác nữa, vector theo sáng chế có chứa vector thứ nhất có chứa axit nucleic mã hóa cho chuỗi nặng của kháng thể kháng EphA4 và vector thứ hai có chứa axit nucleic mã hóa cho chuỗi nhẹ của kháng thể kháng EphA4. Vector theo sáng chế có thể là, nhưng không giới hạn ở, plasmid, cosmid, virut, phagơ, và dạng tương tự. Ví dụ như, để làm vector virut, các vector retrovirut, lentivirut, adenovirut, virut kết hợp adeno, hoặc virut herpes simplex, và dạng tương tự cũng được bao gồm trong vector theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác nữa, tế bào chủ có chứa vector theo sáng chế, và phương pháp sản xuất kháng thể kháng EphA4 có chứa bước nuôi cấy tế bào chủ cũng được bao gồm trong sáng chế. Tế bào chủ theo sáng chế có thể là, nhưng không giới hạn ở, tế bào *E. coli*, tế bào COS khi, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO), tế bào NS0, và tế bào tương tự. Theo một phương án, phương pháp sản xuất kháng thể kháng EphA4 có chứa bước nuôi cấy tế bào chủ, và bước thu hồi kháng thể kháng EphA4 được tiết từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy của tế bào chủ).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm có chứa kháng thể kháng EphA4. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sản xuất theo phương pháp đã biết chẳng hạn như phương pháp được mô tả trong Dược Điển Nhật Bản (JP), Dược Điển Hoa Kỳ (USP), hoặc Dược Điển Châu Âu (EP), và dạng tương tự.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể hữu dụng để điều trị bệnh Alzheimer. Nói cách khác, theo các khía cạnh khác, sáng chế bao hàm phương pháp điều trị bệnh Alzheimer có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng

EphA4 cho đối tượng mắc bệnh Alzheimer. Hơn nữa, theo các khía cạnh khác, sáng chế bao hàm việc sử dụng kháng thể kháng EphA4 để sản xuất thuốc điều trị đối với bệnh Alzheimer. Theo các khía cạnh khác, sáng chế bao hàm kháng thể kháng EphA4 để sử dụng trong việc điều trị bệnh Alzheimer.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể hữu dụng để điều trị bệnh do protein tau. Nói cách khác, theo các khía cạnh khác, sáng chế bao hàm phương pháp điều trị bệnh do protein tau có chứa bước dùng lượng hữu hiệu để điều trị của kháng thể kháng EphA4 cho đối tượng mắc bệnh do protein tau. Hơn nữa, theo các khía cạnh khác, sáng chế bao hàm việc sử dụng kháng thể kháng EphA4 để sản xuất thuốc điều trị đối với bệnh do protein tau. Theo các khía cạnh khác, sáng chế bao hàm kháng thể kháng EphA4 để sử dụng trong việc điều trị bệnh do protein tau. Bệnh do protein tau của sáng chế bao gồm bệnh Alzheimer hoặc bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau (FTLD-tau). Hơn nữa, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương với bệnh lý tau bao gồm bệnh liệt trên nhân tiền triển (PSP), bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), sa sút trí tuệ hạt ưa bạc (AGD), sa sút trí tuệ lão suy thuộc kiểu đám rối thần kinh (SD-NFT), bệnh Pick (PiD), và bệnh tương tự.

Kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị một mình hoặc kết hợp với tác nhân hoặc hợp phần khác. Ví dụ như, kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể được dùng cùng lúc hoặc vào thời gian khác so với tác nhân khác. Liệu pháp kết hợp này bao gồm việc dùng kết hợp (hai hoặc hơn hai tác nhân được bao gồm trong cùng một chế phẩm hoặc chế phẩm riêng rẽ) và việc dùng riêng rẽ (chẳng hạn như đồng thời hoặc tuần tự). Khi hai hoặc hơn hai tác nhân được dùng riêng rẽ, việc dùng kháng thể kháng EphA4 theo sáng chế có thể được thực hiện trước hoặc sau phương pháp điều trị kèm theo.

Đối tượng để dùng được phẩm theo sáng chế không bị giới hạn, và có thể được sử dụng cho ví dụ như người hoặc động vật có vú không phải của người (chẳng hạn như

khỉ, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, bò, ngựa, và dê).

Phương pháp dùng được phẩm theo sáng chế cho đối tượng (chẳng hạn như đường dùng, liều lượng, số lần dùng mỗi ngày, và thời gian dùng) không bị giới hạn, và có thể được quyết định hợp lý bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực (chẳng hạn như bác sĩ) theo tình trạng sức khỏe của đối tượng, phạm vi của bệnh, loại tác nhân được sử dụng kết hợp, và dạng tương tự.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng miễn là không mâu thuẫn về mặt kỹ thuật, sáng chế có thể được thực hiện ở dạng kết hợp thích hợp của một hoặc nhiều khía cạnh bất kỳ trong số bất kỳ và tất cả các khía cạnh được mô tả trong bản mô tả này. Hơn nữa, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng miễn là không mâu thuẫn về mặt kỹ thuật, ưu tiên là sáng chế được thực hiện ở dạng kết hợp thích hợp của bất kỳ và tất cả các khía cạnh được ưu tiên hoặc có lợi được mô tả trong bản mô tả này.

Tất cả sự bộc lộ của các tài liệu được viện dẫn ở đây cần được coi là được viện dẫn rõ ràng ở đây để tham khảo, và người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể hiểu được nội dung bộc lộ liên quan trong các tài liệu này bằng cách viện dẫn chúng dưới dạng một phần của bản mô tả này theo ngữ cảnh ở đây mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Các tài liệu được viện dẫn ở đây được nêu ra chỉ nhằm mục đích bộc lộ công nghệ liên quan trước ngày nộp đơn của đơn này, và không được hiểu là sự công nhận của các tác giả sáng chế rằng sáng chế không giữ quyền ưu tiên đối với bản bộc lộ này do các sáng chế trước đó hoặc vì bất kỳ lý do nào khác. Tất cả phần mô tả của tất cả các tài liệu này đều dựa trên thông tin có sẵn đối với người nộp đơn, và không thiết lập theo bất kỳ cách nào sự xác nhận rằng nội dung mô tả này là chính xác.

Các thuật ngữ dùng trong bản mô tả này được dùng để mô tả các phương án cụ thể, và không dự định là làm giới hạn sáng chế.

Thuật ngữ "có chứa" như dùng trong bản mô tả này, trừ khi nội dung chỉ ra rõ ràng là cần được hiểu theo cách khác, muốn nói đến sự có mặt của các hạng mục được mô tả (chẳng hạn như các thành phần, các bước, các phần tử, hoặc các số), và không loại trừ sự có mặt của các hạng mục khác (chẳng hạn như các thành phần, các bước, các phần tử, và các số). Thuật ngữ "gồm có" bao hàm các khía cạnh được mô tả bằng các thuật ngữ "gồm có" và/hoặc "về cơ bản gồm có."

Thuật ngữ "hoạt tính trung hòa" như dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hoạt tính để ức chế sự liên kết giữa EphA4 và phối tử của chúng, và/hoặc hoạt tính để ức chế sự truyền tín hiệu hoặc đáp ứng biểu hiện phân tử hoặc sự thay đổi chức năng của tế bào mà được gây cảm ứng bằng EphA4 do sự liên kết với phối tử của chúng trong cơ thể người.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các thuật ngữ dùng trong bản mô tả này (bao gồm các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật) có cùng nghĩa như các thuật ngữ được hiểu rộng rãi bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực công nghệ mà sáng chế thuộc về. Các thuật ngữ dùng trong bản mô tả này, trừ khi được chỉ ra rõ ràng là có nghĩa khác, cần được hiểu là có nghĩa thống nhất với nghĩa trong bản mô tả này và trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, và không được hiểu là có nghĩa hình thức được lý tưởng hóa hoặc nói quá.

Các thuật ngữ chẳng hạn như thứ nhất và thứ hai được dùng để diễn tả các phần tử khác nhau, và cần được hiểu là các phần tử này không bị giới hạn bởi các thuật ngữ này về bản chất. Các thuật ngữ này được dùng chỉ nhằm mục đích phân biệt phần tử này với phần tử khác, và ví dụ như có thể để mô tả phần tử thứ nhất như phần tử thứ hai, và tương tự, để mô tả phần tử thứ hai như phần tử thứ nhất mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Các giá trị bằng số được dùng ở đây để chỉ ra hàm lượng thành phần hoặc khoảng giá trị bằng số và dạng tương tự, trừ khi được chỉ ra rõ ràng, cần được hiểu là

được bỏ nghĩa bằng thuật ngữ "khoảng." Ví dụ như, "4°C," trừ khi được chỉ ra rõ ràng, được hiểu là có nghĩa là "khoảng 4°C," và hiển nhiên là người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có thể hiểu một cách hợp lý độ lớn của chúng theo nghĩa kỹ thuật thông thường và nghĩa của các đoạn trong bản mô tả này.

Cần được hiểu là trừ khi được chỉ ra rõ ràng là có nghĩa khác trong ngữ cảnh, khi được sử dụng trong bản mô tả và các yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này, mỗi khía cạnh được thể hiện ở dạng số ít cũng có thể là dạng số nhiều miễn là không mâu thuẫn về mặt kỹ thuật, và ngược lại.

Bây giờ sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn có tham chiếu đến các Ví dụ. Tuy nhiên, sáng chế có thể được lập phương án bằng các khía cạnh khác nhau, và không được hiểu là bị giới hạn ở các Ví dụ được mô tả trong bản mô tả này. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan có thể thực hiện sáng chế với các cải biến, bổ sung, bỏ bớt, thay thế, và dạng tương tự khác nhau mà không làm thay đổi tinh thần hoặc phạm vi của sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Ví Dụ Tham Chiếu 1: Điều chế kháng thể đơn dòng kháng EphA4**

##### **(A) Điều chế kháng thể đơn dòng kháng EphA4 của chuột nhắt**

Để điều chế kháng thể đơn dòng mà liên kết với EphA4 chuột nhắt (Mã Số Truy Cập Genbank NP\_031962.2, SEQ ID NO. 1), protein có phosphatase kiềm tiết (SEAP) và đuôi histidin được dung hợp vào vùng ngoại bào của EphA4 chuột nhắt (các vị trí 20-547) (SEQ ID NO. 2) (sau đây được đề cập đến dưới dạng "protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His," SEQ ID NO. 3) được điều chế bằng các bước sau.

Trước hết, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu (SEQ ID NO. 4) và vùng ngoại bào (SEQ ID NO. 2) của EphA4 chuột nhắt được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ não chuột nhắt, và được tách dòng vào vị trí Sal I/Not I của vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) có trình tự ADN mã hóa cho SEAP

và đuôi histidin. Tiếp theo, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của EphA4 chuột nhắt, SEAP, và đuôi histidin được chuyển vào vector pcDNA 3.1\_rfcB bằng phản ứng LR của Gateway System (Invitrogen/LifeTechnologies) để tạo cấu trúc vector biểu hiện pcDNA 3.1-vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His. Vector biểu hiện pcDNA 3.1-vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His đã được tạo cấu trúc được chuyển nạp vào tế bào HEK293 EBNA (Invitrogen/LifeTechnologies) bằng TransIT-LT1 (TAKARA). Sau khi ủ 6 ngày ( $\text{CO}_2$  5%,  $37^\circ\text{C}$ ), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi. Từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy đã được thu hồi, protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His (SEQ ID NO. 3) được tinh chế bằng cột Protino (MACHEREY-NAGEL).

Hai mươi microgam protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His được trộn với lượng giống như vậy của tá dược TiterMax Gold (TiterMax USA) hoặc tá dược GERBU (GERBU Biotechnik GmbH), và được tiêm dưới da vào gan bàn chân của chuột nhắt Balb/c. Sau đó protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His được dùng theo cách tương tự vào các Ngày 3, 7, và 10. Ở đây, tá dược TiterMax Gold (TiterMax USA) được sử dụng chỉ vào Ngày 10, và tá dược GERBU (GERBU Biotechnik GmbH) được sử dụng vào các Ngày 3, 7, và 10. Các con chuột nhắt bị giết chết vào Ngày 13, và hạch bạch huyết ngoại vi được thu hồi để điều chế tế bào hạch bạch huyết. Tế bào hạch bạch huyết đã được điều chế và tế bào u tủy P3U1 (được cung cấp từ Kyoto University) được dung hợp ở tỉ lệ 5:1 trong sự có mặt của GenomeONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.). Các tế bào dung hợp được nuôi cấy trong đĩa nhựa 96 giếng. Sau khi ủ 7 ngày ( $\text{CO}_2$  5%,  $37^\circ\text{C}$ ), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi.

Bằng cách sử dụng dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được, các giếng có khả năng phản ứng chống lại EphA4 chuột nhắt, chuột cống, và người được nhắt ra.

Khả năng phản ứng chống lại EphA4 chuột nhắt, chuột cống, và người được đánh giá bằng ELISA với các protein có vùng Fc của IgG<sub>1</sub> người và đuôi histidin được

dung hợp vào vùng ngoại bào của EphA4 chuột nhắt, vùng ngoại bào (các vị trí 20-547) của EphA4 chuột cống (Mã Số Truy Cập Genbank NP\_001155883.1), hoặc vùng ngoại bào (các vị trí 20-547) (SEQ ID NO. 6) của EphA4 người (Mã Số Truy Cập Genbank NP\_004429.1, SEQ ID NO. 5) (sau đây lần lượt được gọi là "protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-Fc-His," "protein vùng ngoại bào EphA4 chuột cống-Fc-His," hoặc "protein vùng ngoại bào EphA4 người-Fc-His").

Protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, hoặc người-Fc-His được điều chế bằng các bước sau đây. Ban đầu, vector biểu hiện pcDNA 3.1-vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, hoặc người-Fc-His được tạo cấu trúc. Trước hết, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của EphA4 chuột nhắt, chuột cống, hoặc người được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ não chuột nhắt, chuột cống, hoặc người, và được tách dòng vào vị trí Sal I/Not I của vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) có trình tự ADN mã hóa cho Fc và đuôi histidin. Tiếp theo, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của EphA4 chuột nhắt, chuột cống, hoặc người, Fc, và đuôi histidin được chuyển vào vector pcDNA 3.1\_rfcB bằng phản ứng LR của Gateway System (Invitrogen/LifeTechnologies) để tạo cấu trúc vector biểu hiện pcDNA 3.1-vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, hoặc người-Fc-His. Các vector biểu hiện đã được tạo cấu trúc được chuyển nạp vào tế bào HEK293 EBNA (Invitrogen/LifeTechnologies) bằng TransIT-LT1 (TAKARA). Sau khi ủ 6 ngày (CO<sub>2</sub> 5%, 37°C), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi.

ELISA sử dụng protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, hoặc người-Fc-His được thực hiện theo các bước sau đây. Kháng thể kháng IgG người (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng 1 x Block ACE (Dainippon Seiyaku). Sau khi rửa



ba lần bằng Tween 20/PBS 0,02% (Nacalai Tesque), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy có chứa protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, hoặc người-Fc-His được bổ sung vào mỗi giếng (nồng độ cuối cùng 1 nM), và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dịch nổi nuôi cấy của các tế bào đã được dung hợp được bổ sung vào mỗi giếng. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ và rửa ba lần, kháng thể kháng IgG chuột nhắt được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào mỗi giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5-20 phút. Lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào mỗi giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Các tế bào lai được tách dòng từ các giếng được nhặt ra thông qua các bước nêu trên bằng phương pháp pha loãng giới hạn, và các dòng tế bào lai biểu hiện kháng thể kháng EphA4 của chuột nhắt có hoạt tính liên kết chống lại EphA4 chuột nhắt, chuột cống, và người cuối cùng được thu lấy.

Các dòng tế bào lai thu được được nuôi cấy, và kháng thể đơn dòng kháng EphA4 của chuột nhắt được tinh chế từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy với Protein A (GE Healthcare).

#### (B) Đánh giá hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4

Việc điều chế noron hồi hải mã chuột cống được thực hiện theo các bước sau đây. Thai được lấy ra khỏi chuột cống vào Ngày 18 của quá trình mang thai (Charles River Laboratories Nhật Bản), và đầu được cắt mở ra để lấy não ra. Vùng hồi hải mã được cắt ra dưới kính hiển vi soi nổi, được đặt trong dung dịch phân giải ( $\text{NaCl}$  137 mM (Wako Pure Chemical),  $\text{KCl}$  5 mM (Wako Pure Chemical),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7 mM (Wako Pure Chemical), HEPES 25 mM (DOJINDO), ADNaza 0,5 mg/ml (Sigma), và trypsin 0,25%

(Life technologies)), và được lắc ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 10 phút. Dung dịch được loại bỏ, và huyết thanh thai bò/chất đệm Hanks 20% (Sigma) được bổ sung. Sau khi loại bỏ dung dịch và rửa hai lần trong chất đệm Hanks, mô hồi hải mã được lấy bằng pipet trong chất đệm Hanks để điều chế huyền phù tế bào. Tế bào được cấy trong đĩa 96 giếng (Falcon) được phủ bằng dịch nuôi cấy chứa poly-L-lysine (môi trường Neurobasal (Life technologies), 1 x chất bổ sung B-27 (Life technologies), và L-glutamine 0,5 mM (Life technologies)).

Việc đánh giá hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 bằng cách sử dụng neuron hồi hải mã được thực hiện theo các bước sau đây. Neuron hồi hải mã chuột cống đã cấy trong đĩa 96 giếng (Falcon) được xử lý bằng kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (67 nM) và thuốc ức chế  $\gamma$  selectaza Hợp chất E (50 nM, Enzo Life Sciences). Mười sáu giờ sau, nó được rửa bằng PBS (Wako Pure Chemical), chất đệm mẫu SDS (chất đệm mẫu Laemmli (Bio-Rad) và 2-mercaptoetanol 5% (Bio-Rad)) được bổ sung để thu hồi tế bào, và nó được đun sôi trong thời gian 5 phút. SDS-PAGE được thực hiện với mẫu này, thẩm tách western với kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (Abnova) được thực hiện, cường độ băng được định lượng, và giá trị của mảnh đầu tận cùng C EphA4/EphA4 chiều dài đầy đủ được tính.

Kháng thể đơn dòng kháng EphA4 của chuột nhắt có hoạt tính mà làm tăng cường sự phân cắt của EphA4 (kháng thể A) được thu lấy. Isotyp của kháng thể A được xác định bằng bộ kit xác định isotyp kháng thể đơn dòng (Serotec) là IgG<sub>1</sub> đối với chuỗi nặng và  $\kappa$  đối với chuỗi nhẹ.

### (C) Phân tích trình tự của kháng thể A

Trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể A được khuếch đại bằng phương pháp 5'-RACE (sự khuếch đại nhanh 5' của các đầu cADN). ARN tổng số được điều chế từ tế bào lai bằng RNeasy (QIAGEN), và được xử lý bằng ADNaza (QIAGEN, bộ ADNaza không chứa ARNaza).

cADN sợi kép được điều chế từ ARN tổng số bằng bộ kit tổng hợp cADN (TAKARA). Bộ thích ứng 5' thu được bằng cách ủ oligoDNA ad29S (ACATCACTCCGT) (SEQ ID NO. 7) và oligoDNA ad29AS (ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT) (SEQ ID NO. 8) được bổ sung vào cADN. cADN thu được được khuếch đại bằng đoạn mồi xuôi 5' (đoạn mồi 5'-PCR4, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG) (SEQ ID NO. 9) và đoạn mồi ngược 3' (GCCAGTGGATAGACTGATGG (SEQ ID NO. 10) được dùng để khuếch đại chuỗi nặng IgG chuột nhắt, và GATGGATACAGTTGGTGCAGC (SEQ ID NO. 11) được dùng để khuếch đại chuỗi nhẹ Igκ chuột nhắt). cADN đã được khuếch đại được cài xen vào vector pCR2.1 (Invitrogen/LifeTechnologies). Trình tự gen của kháng thể A được phân tích bằng ABI 3130XL. Khi trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự gen của kháng thể A được xác định bằng phân tích này, trình tự tín hiệu chuỗi nặng là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 12, vùng biến đổi chuỗi nặng là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 13, trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 14, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 15. Khi trình tự nucleotit mã hóa trình tự gen của kháng thể A, trình tự tín hiệu chuỗi nặng là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 16, vùng biến đổi chuỗi nặng là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 17, trình tự tín hiệu chuỗi nhẹ là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 18, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 19.

Trình tự chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể A được thu lấy bằng các bước sau đây. ARN tổng số được điều chế từ tế bào lai bằng RNeasy (QIAGEN), và được xử lý bằng ADNaza (QIAGEN, bộ ADNaza không chứa ARNaza). Sản phẩm phiên mã ngược được điều chế từ ARN tổng số bằng bộ kit PCR ARN (TAKARA). Bằng cách sử dụng sản phẩm phiên mã ngược thu được làm khuôn, trình tự gen mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể A được khuếch đại bằng PCR

với đoạn mỗi xuôi 5' (GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTGTCCTGGTGCTGCTCC (đoạn mỗi ID 7455) (SEQ ID NO. 20) được sử dụng để khuếch đại chuỗi nặng, và GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGACATGAGGGTTCCTGCTCACG (đoạn mỗi ID 7453) (SEQ ID NO. 21) được sử dụng để khuếch đại chuỗi nhẹ) và đoạn mỗi ngược 3' (GCGGAATTCATCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC (đoạn mỗi ID 7257) (SEQ ID NO. 22) được sử dụng để khuếch đại chuỗi nặng, và CGCGAATTCACCTAACAATCCTGTTGAAGCTCTTGAC (đoạn mỗi ID 7249) (SEQ ID NO. 23) được sử dụng để khuếch đại chuỗi nhẹ), và lần lượt được tách dòng vào các vector pEE6.4 và pEE12.4 (Lonza). Trình tự gen được phân tích bằng ABI3130XL. Khi các trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự gen của kháng thể A được xác định bằng phân tích này, vùng không đổi chuỗi nặng là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 24, và vùng không đổi chuỗi nhẹ là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 25.

CDR của kháng thể A được xác định bằng phương pháp sau đây. Trình tự axit amin của kháng thể A được đánh số theo hệ thống đánh số Kabat bằng phần mềm Abysis (UCL). Dựa trên cách đánh số này, quyết định được đưa ra theo định nghĩa Kabat để xác định CDR. Trình tự axit amin của CDR của kháng thể A được thể hiện trong Bảng 1.

[Bảng 1]

Các trình tự axit amin của CDR của kháng thể A

| Tên             | Trình tự                           |
|-----------------|------------------------------------|
| CDR1 chuỗi nặng | RYGVH (SEQ ID NO. 26)              |
| CDR2 chuỗi nặng | VIWRGGSTDYNAAFMS (SEQ ID NO. 27)   |
| CDR3 chuỗi nặng | ESLFGVYYDYGYYSM DY (SEQ ID NO. 28) |

|                |                             |
|----------------|-----------------------------|
| CDR1 chuỗi nhẹ | RASQEISGYLS (SEQ ID NO. 29) |
| CDR2 chuỗi nhẹ | AASTLDS (SEQ ID NO. 30)     |
| CDR3 chuỗi nhẹ | LQYASYPLT (SEQ ID NO. 31)   |

Ví Dụ Tham Chiếu 2: Ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 chống lại EphA4 của chuột nhắt và người

Ái lực liên kết của kháng thể A chống lại EphA4 của chuột nhắt và người được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (phương pháp SPR) sử dụng Biacore T200 (GE Healthcare). Trước hết, kháng thể kháng His (GE Healthcare, 28-9950-56) được cố định lên trên chip cảm biến CM5. Sự cố định được thực hiện bằng phương pháp ghép nối amin sử dụng N-hydroxysuccinimide (NHS) và N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), và ethanolamine được dùng để phong bế (chip cảm biến và chất phản ứng cố định đều là từ GE Healthcare). Nó được pha loãng đến 3,5 µg/ml với chất đệm cố định (natriacetat 10 mM, độ pH 4,5), và được cố định trên chip cảm biến theo quy trình gắn với Biacore T200. Vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt hoặc người-SEAP-His10 được pha loãng bằng chất đệm chạy HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), và dung dịch này được đưa lên trên bề mặt dòng chảy trong thời gian 120 giây để bắt giữ (lượng được bắt giữ là khoảng 10 RU). Tiếp đó, kháng thể A đã pha loãng theo dãy đến khoảng giá trị 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,2, 1,6, và 0 nM với HBS-EP được bổ sung vào chip cảm biến trong thời gian 120 giây, và đường cong phản ứng liên kết vào lúc bổ sung (pha liên kết, 120 giây) và sau khi hoàn thành việc bổ sung (pha phân ly, 600 giây) được quan sát tuần tự. Sau khi hoàn thành mỗi lần quan sát,  $MgCl_2$  4 M (60 giây, Wako Pure Chemical) được bổ sung để tái tạo chip cảm biến. Phân tích làm khớp bằng mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm đánh giá BIA gắn với hệ thống được thực hiện trên đường cong phản ứng liên kết thu được, và ái lực liên kết ( $KD = k_d/k_a$ ) đối với EphA4 của chuột nhắt và người được tính.

Ái lực liên kết của kháng thể A chống lại EphA4 của chuột nhắt và người (giá trị KD) lần lượt là  $1,32 \times 10^{-9}$  M và  $1,19 \times 10^{-9}$  M (Hình 1). Các thông số liên kết khác chống lại EphA4 của chuột nhắt và người có độ lớn gần như bằng nhau. Theo đó, người ta cho rằng kháng thể A có cùng mức độ của ái lực liên kết đối với EphA4 của chuột nhắt và người.

Ví Dụ Tham Chiếu 3: Hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 ở noron hồi hải mã

Đối với kháng thể A, việc đánh giá hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 sử dụng noron hồi hải mã được thực hiện theo các bước sau đây. Noron hồi hải mã chuột cống đã cấy trong đĩa 96 giếng (Falcon) được xử lý bằng kháng thể A (2,0, 6,7, và 20 nM) và thuốc ức chế  $\gamma$  selectaza Hợp chất E (50 nM, Enzo Life Sciences). Hai mươi tư giờ sau, nó được rửa bằng PBS (Wako Pure Chemical), chất đệm mẫu SDS (chất đệm mẫu Laemmli (Bio-Rad) và 2-mercaptoethanol 5% (Bio-Rad)) được bổ sung để thu hồi tế bào, và nó được đun sôi trong thời gian 5 phút. SDS-PAGE được thực hiện với mẫu này, thẩm tách western với kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (Abnova) được thực hiện, cường độ băng được định lượng, và giá trị của mảnh đầu tận cùng C EphA4/EphA4 chiều dài đầy đủ được tính.

Kháng thể A làm tăng cường theo cách phụ thuộc nồng độ phản ứng phân cắt EphA4 ở noron hồi hải mã (Hình 2).

Ví Dụ Tham Chiếu 4: Hoạt tính ức chế liên kết EphA4 của chuột nhắt-phối tử của chuột nhắt của kháng thể đơn dòng kháng EphA4

Đối với kháng thể A, việc đánh giá hoạt tính ức chế của sự liên kết giữa EphA4 chuột nhắt và phối tử chuột nhắt được thực hiện theo các bước sau đây. Kháng thể kháng phosphatase kiềm (Thermo SCIENTIFIC) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi

rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,02% (Thermo SCIENTIFIC), protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His được bổ sung vào các giếng (nồng độ cuối cùng 10 nM), và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, phối tử và kháng thể A (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, và 3000 nM) được bổ sung vào các giếng. Lưu ý rằng thể khảm Ephrin A1 chuột nhắt-Fc đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 6 nM) và thể khảm Ephrin B2 chuột nhắt-Fc đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 2,5 nM) được dùng làm phối tử. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ và rửa ba lần, streptavidin đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (GE Healthcare) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút. Lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Kháng thể A tìm hãm theo cách phụ thuộc nồng độ sự liên kết giữa EphA4 chuột nhắt và phối tử chuột nhắt, và giá trị  $\text{IC}_{50}$  chống lại sự liên kết Ephrin A1 và Ephrin B2 chuột nhắt lần lượt là khoảng 5,9 nM và 3,1 nM (Hình 3). Theo đó, điều đó chứng tỏ rằng kháng thể A ức chế mạnh mẽ sự liên kết giữa EphA4 chuột nhắt và phối tử chuột nhắt.

#### Ví Dụ Tham Chiếu 5: Hoạt tính ức chế liên kết EphA4 người-phối tử người của kháng thể đơn dòng kháng EphA4

Đối với kháng thể A, việc đánh giá hoạt tính ức chế của sự liên kết giữa EphA4 người và phối tử người được thực hiện theo các bước sau đây. Kháng thể kháng phosphatase kiềm (Thermo SCIENTIFIC) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi

rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), protein vùng ngoại bào EphA4 người-SEAP-His được bổ sung vào các giếng (nồng độ cuối cùng 10 nM), và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, phối tử và kháng thể A đã được pha loãng theo dãy (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, và 3000 nM) được bổ sung vào các giếng. Lưu ý rằng thể khảm Ephrin A5 người-Fc đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 0,7 nM) và thể khảm Ephrin B3 người-Fc đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 2,3 nM) được dùng làm phối tử. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ và rửa ba lần, streptavidin đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (GE Healthcare) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2-5 phút. Lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (Molecular Devices hoặc PerkinElmer).

Kháng thể A kìm hãm theo cách phụ thuộc nồng độ sự liên kết giữa EphA4 người và phối tử người, và giá trị  $\text{IC}_{50}$  chống lại sự liên kết Ephrin A5 và Ephrin B3 người lần lượt là khoảng 2,8 nM và 1,4 nM (Hình 4). Theo đó, điều đó chứng tỏ rằng kháng thể A cũng ức chế mạnh mẽ sự liên kết giữa EphA4 người và phối tử người.

#### Ví Dụ Tham Chiếu 6: Tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 chống lại thụ thể Eph người

Sau phương pháp điều chế protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt-SEAP-His được mô tả trong Ví Dụ Tham Chiếu 1, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của người (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, và EphB6) được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ mô, và được tách dòng vào vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) có trình tự ADN mã hóa cho SEAP



và đuôi histidin. Tiếp theo, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của người, SEAP, và đuôi histidin được chuyển vào vectơ pcDNA 3.1\_rfcB bằng phản ứng LR của Gateway System (Invitrogen/LifeTechnologies) để tạo cấu trúc vectơ (được đề cập đến dưới dạng "vectơ biểu hiện protein vùng ngoại bào thụ thể Eph-SEAP-His") biểu hiện protein có SEAP và đuôi His được dung hợp vào vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của người (được đề cập đến dưới dạng "protein vùng ngoại bào thụ thể Eph-SEAP-His.")

Tiếp theo, mỗi vectơ biểu hiện protein vùng ngoại bào thụ thể Eph của người-SEAP-His được đưa vào trong tế bào Expi293F (Gibco/ThermoFisher) với hệ thống biểu hiện Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Sau khi nuôi cấy 5 ngày (CO<sub>2</sub> 5%, 37°C, 120 vòng/phút), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi, và nó được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng, ở tốc độ 1500 vòng/phút, và trong thời gian 5 phút. Dịch nổi bề mặt đã được ly tâm được lọc bằng bộ lọc 0,45 µm (Millipore).

Đối với kháng thể A, việc đánh giá hoạt tính liên kết của thụ thể Eph người được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng 6-His của thỏ (Bethyl Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), mỗi protein vùng ngoại bào thụ thể Eph của người-SEAP-His (nồng độ cuối cùng 1 nM) được cấy trong mỗi giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch IgG người (100 µg/ml, Mitsubishi Pharma Corporation) và kháng thể A (10 µg/ml) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Kháng thể kháng IgG chuột nhắt của lừa đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch

TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Trong họ thụ thể Eph người, kháng thể A có hoạt tính liên kết đặc hiệu chỉ với EphA4 người (Hình 5).

#### Ví Dụ Tham Chiếu 7: Tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 chống lại thụ thể Eph chuột nhắt

Sau phương pháp điều chế protein vùng ngoại bào EphA4-Fc-His theo Ví Dụ Tham Chiếu 1, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của chuột nhắt (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, và EphB6) được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ mô, và được tách dòng vào vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) có trình tự ADN mã hóa cho vùng Fc của IgG<sub>1</sub> người và đuôi histidin. Tiếp theo, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của chuột nhắt, Fc, và đuôi histidin (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, và EphB6) được chuyển vào vector pcDNA 3.1\_rfcB bằng phản ứng LR của Gateway System (Invitrogen/LifeTechnologies) để tạo cấu trúc vùng ngoại bào của mỗi vector biểu hiện protein thụ thể Eph của chuột nhắt-Fc-His. Trong việc tạo cấu trúc của vector biểu hiện protein vùng ngoại bào của EphA2 chuột nhắt-Fc-His, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của EphA2 chuột nhắt được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ mô, và được tách dòng vào vector pcDNA 3.1 có trình tự ADN mã hóa cho Fc và đuôi histidin để tạo cấu trúc vector biểu hiện protein vùng ngoại bào EphA2 chuột nhắt-Fc-His.

Tiếp theo, mỗi vector biểu hiện protein vùng ngoại bào thụ thể Eph của chuột

nhất-Fc-His được đưa vào trong tế bào Expi293F (Gibco/ThermoFisher) với hệ thống biểu hiện Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Sau khi nuôi cấy 5 ngày (CO<sub>2</sub> 5%, 37°C, 120 vòng/phút), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi, và nó được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng, ở tốc độ 1500 vòng/phút, và trong thời gian 5 phút. Dịch nổi bề mặt đã được ly tâm được lọc bằng bộ lọc 0,45 µm (Millipore).

Đối với kháng thể A, việc đánh giá hoạt tính liên kết của thụ thể Eph chuột nhất được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng 6-His của thỏ (Betyl Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), mỗi protein vùng ngoại bào thụ thể Eph của chuột nhất-Fc-His (nồng độ cuối cùng 1 nM) được cấy trong mỗi giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch IgG người (100 µg/ml, Sigma) và kháng thể A (10 µg/ml) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Kháng thể kháng IgG chuột nhất của lừa đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Trong họ thụ thể Eph chuột nhất, kháng thể A có hoạt tính liên kết đặc hiệu chỉ với EphA4 chuột nhất (Hình 6).

Ví Dụ Tham Chiếu 8: Khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 chống lại EphA4 chuột nhất, chuột cống, khỉ, và người

Việc điều chế protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người-Fc-His được thực hiện theo các bước sau đây. Trước hết, sau phương pháp điều chế protein vùng ngoại bào EphA4-Fc-His theo Ví Dụ Tham Chiếu 1, vector biểu hiện protein vùng ngoại bào EphA4 khỉ-Fc-His được tạo cấu trúc. Trình tự axit amin của EphA4 khỉ dùng trong việc tạo cấu trúc vector được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO. 32, và vùng ngoại bào của chúng được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO. 33. Các protein vùng ngoại bào EphA4-Fc-His khác nhau được điều chế bằng cách sử dụng vector biểu hiện protein vùng ngoại bào EphA4 khỉ-Fc-His cũng như là vector biểu hiện protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, và người-Fc-His được mô tả trong Ví Dụ Tham Chiếu 1.

Đối với kháng thể A, việc đánh giá hoạt tính liên kết với các vùng ngoại bào EphA4 khác nhau được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng IgG người của lừa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người-Fc-His (nồng độ cuối cùng 1 nM) được cấy trong các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch IgG người (100 µg/ml, Mitsubishi Pharma Corporation) và kháng thể A (0, 0,00013, 0,00064, 0,0032, 0,016, 0,08, 0,4, 2, và 10 µg/ml) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Kháng thể kháng IgG chuột nhắt của lừa đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N,

Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Kháng thể A có hoạt tính liên kết tương đương trong tất cả EphA4 chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người (Hình 7).

Ví Dụ Tham Chiếu 9: Khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 chống lại vùng ngoại bào EphA4 người, miền liên kết phối tử, miền 1 fibronectin típ III, miền 2 fibronectin típ III

Việc điều chế các protein có vùng ngoại bào (ECD), miền liên kết phối tử (LBD), miền 1 fibronectin típ III (FN1), hoặc miền 2 fibronectin típ III (FN2) của EphA4 người dung hợp với protein liên kết maltoza (MBP) và đuôi histidin (sau đây được đề cập đến dưới dạng "protein vùng ngoại bào EphA4 người-MBP-His," "protein miền liên kết phối tử EphA4 người-MBP-His," "protein miền 1 fibronectin típ III EphA4 người-MBP-His," và "protein miền 2 fibronectin típ III EphA4 người-MBP-His") được thực hiện theo các bước sau đây. Ban đầu, vector biểu hiện pcDNA 3.4-vùng ngoại bào EphA4 người, miền liên kết phối tử, miền 1 fibronectin típ III, hoặc miền 2 fibronectin típ III-MBP-His được tạo cấu trúc. Trước hết, trình tự tín hiệu của EphA4 người (SEQ ID NO. 34) hoặc trình tự tín hiệu của preprotrypsin (SEQ ID NO. 35) và trình tự ADN mã hóa cho mỗi miền của EphA4 người được khuếch đại bằng PCR, và được tách dòng vào vector pcDNA 3.4 có trình tự ADN mã hóa cho MBP và đuôi histidin (Invitrogen/LifeTechnologies) để tạo cấu trúc các vector biểu hiện protein vùng ngoại bào EphA4 người-MBP-His, protein miền liên kết phối tử EphA4 người-MBP-His, protein miền 1 fibronectin típ III EphA4 người-MBP-His, và protein miền 2 fibronectin típ III EphA4 người-MBP-His. Trình tự axit amin của EphA4 người dùng trong việc tạo cấu trúc vector được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO. 5, vùng ngoại bào của chúng dưới dạng SEQ ID NO. 36, miền liên kết phối tử dưới dạng SEQ ID NO. 37, miền 1 fibronectin típ III dưới dạng SEQ ID NO. 38, và miền 2 fibronectin típ III dưới dạng

SEQ ID NO. 39. Các vector biểu hiện nêu trên được chuyển nạp vào tế bào Expi293F (Thermo SCIENTIFIC) với hệ thống biểu hiện Expi293 (Thermo SCIENTIFIC). Bốn ngày sau, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi, và được cho đi qua bộ lọc 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Sự tinh chế thô được thực hiện với nhựa Amyloza (NEB), và chất đệm được thay thế cho PBS (Wako Pure Chemical) với cột Zeba Spin Desalting (Thermo SCIENTIFIC). Phân đoạn monome được tinh chế vi sai bằng Superdex 200 10/300 (GE Healthcare).

Đối với kháng thể A, việc đánh giá hoạt tính liên kết với các miền khác nhau trong EphA4 người được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng 6-His của thỏ (Bethyl Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa hai lần bằng Tween 20/PBS 0,02% (Nacalai Tesque), protein vùng ngoại bào EphA4 người-MBP-His, protein miền liên kết phối tử EphA4 người-MBP-His, protein miền 1 fibronectin tít III EphA4 người-MBP-His, và protein miền 2 fibronectin tít III EphA4 người-MBP-His (nồng độ cuối cùng 10 nM) được cấy trong các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, kháng thể A (nồng độ cuối cùng 10 nM) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Mẫu kháng thể kháng Fc $\gamma$  IgG chuột nhắt của dê đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa năm lần, dung dịch TMB (KPL) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng. Độ hấp thụ ở 450 nm và 650 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Kháng thể A có hoạt tính liên kết đối với vùng ngoại bào (ECD) của EphA4

người và miền liên kết phối tử (LBD) (Hình 8). Không có phản ứng đối với miền 1 fibronectin tít III (FN1) và miền 2 fibronectin tít III (FN2). Theo đó, đã phát hiện ra rằng kháng thể A liên kết đặc hiệu với miền liên kết phối tử của vùng ngoại bào EphA4 người.

Ví Dụ Tham Chiếu 10: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 lên việc làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã

Việc điều chế noron hồi hải mã chuột cống được thực hiện như được mô tả trong Ví Dụ Tham Chiếu 1 (B) ở trên. Noron hồi hải mã chuột cống được đưa gen EGFP vào bằng cách sử dụng Nucleofector (Lonza), được trộn với noron hồi hải mã chuột cống mà không có sự đưa gen vào, và được cấy trong đĩa 24 giếng (Falcon) chứa kính đáy (Matsunami Glass Industries) được phủ bằng poly-L-lysine.

Việc đếm gai sử dụng noron hồi hải mã được thực hiện theo các bước sau đây. Noron hồi hải mã chuột cống đã được đưa EGFP vào vào Ngày nuôi cấy 13 đã cấy trong đĩa 24 giếng (Falcon) chứa kính đáy (Matsunami Glass Industries) được phủ bằng poly-L-lysine được xử lý bằng kháng thể đối chứng (IgG<sub>1</sub> chuột nhắt; BioLegend) hoặc kháng thể A (6,7 và 20 nM) trong thời gian 24 giờ. Sau đó kính đáy được chuyển vào PFA 2% (Wako Pure Chemical)/sucroza 4% (Wako Pure Chemical)/PBS, và nó được để yên trong thời gian 20 phút để cố định tế bào. Sau khi loại bỏ dung dịch cố định và rửa tế bào ba lần bằng PBS, Triton X-100 0,25% (Wako Pure Chemical)/PBS được bổ sung, và việc làm cho tế bào có thể thấm được thực hiện trong thời gian 15 phút. Dung dịch được loại bỏ, kính đáy được chuyển vào BSA 2% (Sigma)/Triton X-100 0,25%/Opti-MEM (GIBCO) và được đưa đi phong bế một giờ, sau đó kháng thể kháng GFP (Nacalai Tesque) được để cho phản ứng trong thời gian 1,5 giờ. Sau khi loại bỏ dung dịch kháng thể sơ cấp và rửa ba lần bằng PBS, kháng thể thứ cấp được để cho phản ứng trong thời gian một giờ. Sau khi loại bỏ dung dịch kháng thể thứ cấp và rửa ba lần bằng PBS, chất phản ứng Prolong Gold antifade (Molecular probes) được bổ sung để lắp ghép, và việc

quan sát được thực hiện với LSM800 (ZEISS). Thí nghiệm được mô tả ở trên được thực hiện ba lần, và đối với mỗi thí nghiệm, noron được chiết từ hai kính đây, các gai trên mỗi sợi nhánh được đếm bằng phần mềm phân tích hình ảnh Imaris® (Bitplane), và số lượng gai trong mỗi 10  $\mu\text{m}$  đối với mỗi noron được tính.

Kháng thể A làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã (Hình 9). Kết quả này cho thấy rằng kháng thể A có hoạt tính để làm ổn định các gai ở noron hồi hải mã.

#### Ví Dụ Tham Chiếu 11: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 để tìm hiểu sự phosphoryl hóa tau *in vivo*

Việc đánh giá tác dụng để tìm hiểu sự phosphoryl hóa tau *in vivo* bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen tau (rTg4510) được thực hiện theo các bước sau đây. Chuột nhắt chuyển gen tau (rTg4510) được dùng dưới da hai lần một tuần từ 20 đến 26 tuần tuổi với kháng thể A hoặc kháng thể đối chứng được điều chế bằng phương pháp thông thường bằng cách gây miễn dịch chuột nhắt bằng dinitrophenol (kháng thể kháng dinitrophenol chuột nhắt) ở liều lượng bằng 100 mg/kg (10 ml/kg) mỗi lần. Vào 3,5 ngày sau khi dùng lần cuối cùng, việc gây mê được thực hiện bằng isofluran 2% (Intervet) và hỗn hợp của ba loại thuốc gây mê (4,0 mg/kg của Dormicum (Astellas Pharma), 0,3 mg/kg của Domitor (Nippon Zenyaku Kogyo), và 5,0 mg/kg của Vetorphale (Meiji Seika Pharma)), việc truyền được thực hiện ở tình trạng gây mê bằng PBS (Wako Pure Chemical) chứa 3 đơn vị/ml của heparin (Ajinomoto) và hỗn hợp chất ức chế phosphatase 1% (Nacalai Tesque), và bán cầu não được cắt ra. Bán cầu não đã được thu lấy được cố định ở nhiệt độ 4°C trong khi lắc qua đêm trong paraformaldehyt 2% (TAAB)/chất đệm photphat 0,1 M (Wako Pure Chemical). Bán cầu não được thay thế bằng sucroza 20% (Wako Pure Chemical)/chất đệm photphat 0,1 M (Wako Pure Chemical) và tiếp đó sucroza 25%/chất đệm photphat 0,1 M (Wako Pure Chemical), và sau đó được nhúng trong Hộp chất Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek Nhật Bản)/sucroza 25%, và được kết đông bằng nitơ lỏng. Các lát cắt được tạo ra ở độ dày



bằng 7  $\mu\text{m}$  với máy điều lạnh CM1860 (Leica), được dính trên lam kính (Muto Pure Chemicals), được làm khô trong không khí bằng không khí lạnh, và sau đó được đặt trong túi kín và được lưu trữ ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$ . Lam kính dùng để nhuộm màu miễn dịch được rửa đông, được làm khô trong không khí bằng không khí lạnh, và sau đó được rửa bằng PBS (Wako Pure Chemical), được nhúng trong dung dịch BSA 1% (Sigma)/huyết thanh lừa bình thường 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratories)/Triton X-100 0,5% (Wako Pure Chemical)/PBS, và được đưa đi phong bế một giờ, sau đó kháng thể kháng tau đã được phosphoryl hóa AT8 (Fujirebio Europe N.V.) được để cho phản ứng qua đêm ở nhiệt độ bình thường. Sau khi rửa ba lần bằng PBS, kháng thể thứ cấp được để cho phản ứng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần bằng PBS, chất phản ứng Prolong Gold antifade (Molecular probes) được đặt trên lam kính và được lắp, và việc quan sát được thực hiện với LSM700 (ZEISS). Diện tích dương tính tín hiệu AT8 ở lớp tia CA1 hồi hải mã được đo bằng phần mềm phân tích hình ảnh ImageJ, và tỉ lệ của diện tích tín hiệu AT8-dương với tổng diện tích được tính.

Kháng thể A làm giảm tín hiệu của tau đã được phosphoryl hóa ở vùng CA1 hồi hải mã (Hình 10). Kết quả này cho thấy rằng kháng thể A có hoạt tính để kìm hãm sự tiến triển của bệnh lý protein tau ở chuột nhắt chuyển gen tau (rTg4510).

#### Ví Dụ Tham Chiếu 12: Lập bản đồ epitop của miền liên kết phối tử EphA4 (EphA4-LBD) bằng phân tích cấu trúc tinh thể Tia X

Việc điều chế kháng thể A-Fab được thực hiện theo các bước sau đây. Kháng thể A ở 101,1 mg được hòa tan trong chất đệm natri photphat 0,1 M (độ pH 7,0) có chứa 30 mM L-xystein và 2 mM EDTA ở nồng độ bằng 15 mg/ml. Vào dung dịch kháng thể này, papain (Sigma) được bổ sung ở lượng bằng 1/200 so với kháng thể, và sự phân cắt bằng enzym được thực hiện ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 18 giờ. Dịch phân cắt bằng enzym của kháng thể A được thẩm tách chống lại PBS, và chất kết tủa được lấy ra bằng cách ly tâm (chất kết tủa tạo ra được hòa tan lại trong PBS và được trộn với dịch nổi bề

mặt ly tâm). Tiếp theo, các bước sau đây được thực hiện nhằm mục đích loại bỏ tạp chất không phải là kháng thể A-Fab.

### 1) Tinh chế bằng cột Protein A

Dung dịch phân giải bằng enzym này được cho vào 2 ml ProSep vA High Capacity (Millipore) đã được làm cân bằng bằng PBS, và phân đoạn đi qua và phân đoạn rửa PBS được thu hồi.

### 2) Tinh chế ái lực sử dụng kháng thể kháng Fc $\gamma$ IgG người

Cột ái lực có kháng thể kháng Fc $\gamma$  IgG người (Jackson ImmunoResearch Laboratories) liên kết cộng hóa trị với NHS-Activated Sepharose 4FF (GE Healthcare) được điều chế theo sách hướng dẫn của Sepharose này. Dung dịch đã được thu hồi trong mục 1) ở trên được nạp vào cột ái lực này, và dung dịch đi qua và dung dịch rửa PBS của chúng được thu hồi.

### 3) Tinh chế bằng cách lọc gel

Phân đoạn đi qua thu được trong mục 2) ở trên được cô bằng màng siêu lọc. Superose 12 (GE Healthcare) được làm cân bằng bằng PBS, mẫu đã cô được cho vào và được tách và được tinh chế. Một phần của phân đoạn đã được tách và tinh chế được phân tích bằng SDS-PAGE, và phân đoạn có chứa kháng thể A-Fab với độ tinh khiết cao được thu hồi và được gom lại. Mẫu đã được tinh chế theo cách này được đặt làm kháng thể A-Fab.

EphA4-LBD được điều chế để điều chế phức hợp của kháng thể A-Fab và kháng nguyên EphA4-LBD (Qin H. et al., J. Biol. Chem., 283: 29473-29484 (2008)). EphA4-LBD ở 0,68  $\mu$ mol (200  $\mu$ M, 3,4 ml) và kháng thể A-Fab ở 0,45  $\mu$ mol (300  $\mu$ M, 1,5 ml) được trộn sao cho EphA4-LBD có tỉ lệ mol bằng khoảng 1,5 lần so với kháng thể A-Fab. Tiếp theo, dung dịch đã trộn được cho vào HILOAD 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare), và được rửa giải bằng chất đệm để sắc ký (Tris/HCl 25 mM (độ pH 7,5), NaCl 100 mM). Phân đoạn có chứa phức hợp này được phân tích bằng SDS

PAGE, các phân đoạn có độ tinh khiết cao được gộp lại và được cô đến khoảng 40,8 mg/ml, và nó được dùng để kết tinh.

Sự kết tinh của phức hợp được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán hơi giọt đặt với thiết bị kết tinh tự động Hydra II Plus One System (Matrix Technologies Corp., Ltd.). MRC-2 (Molecular Dimensions) được sử dụng làm đĩa. Hợp phần của dung dịch dự trữ là HEPES 100 mM (độ pH 7,5), Polyetylen Glycol 8000 10%, và Etylen Glycol 8%, và dung dịch dự trữ này và dung dịch phức hợp nêu trên được trộn sao cho tỉ lệ thể tích là 1:1 để tạo ra giọt kết tinh. Đĩa kết tinh đã được tạo ra được để yên ở nhiệt độ 20°C.

Khi kết tinh trong điều kiện nêu trên, tinh thể có nhóm không gian P212121, các hằng số mạng tương hỗ  $a = 71,0$  Å,  $b = 84,5$  Å, và  $c = 116,1$  Å được thu lấy. Ánh sáng bức xạ Tia X (1,0 Å) được chiếu tới tinh thể thu được để thu được dữ liệu nhiễu xạ 1,79 Å. Dữ liệu nhiễu xạ được xử lý bằng HKL2000 (HKL Research Inc.), và sự xác định pha được thực hiện bằng phương pháp thay thế phân tử. Chương trình PHASER (phiên bản 2.5.0, McCoy A. J. et al., J. Appl. Cryst. 40: 658-674 (2007)) được bao gồm trong Bộ Phần Mềm CCP4 (Collaborative computational project number 4, [CCP4] phiên bản 6.5.0, Acta Cryst. D 67: 235-242 (2011)) được dùng cho phương pháp thay thế phân tử. Cấu trúc tinh thể của EphA4-LBD (PDBID:3CKH) và cấu trúc tinh thể của vùng Fab của IgG (PDBID:2VXT (chuỗi L) và 1FGN (chuỗi H)) được dùng làm mô hình tra cứu của phương pháp thay thế phân tử. Mô hình phân tử được tạo cấu trúc bằng chương trình COOT (Emsley P. et al., Acta Cryst. D 60: 2126-2132n (2004)) nhờ đó làm khớp mật độ điện tử thu được từ pha đã được xác định, và sự chính xác hóa cấu trúc được thực hiện với chương trình REFMAC (Murshudov G.N., Acta Cryst. D 53: 240-255 (1997)).

Cấu trúc tinh thể phức hợp của độ phân giải 2,0 Å được thu lấy bằng sự tính toán cấu trúc ( $R = 0,212$ ,  $R_{\text{free}} = 0,258$ ).

Cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng thể A-Fab/EphA4-LBD thu được được phân tích bằng công cụ phát hiện tương tác được lắp đặt trong hệ thống hóa học điện toán MOE 2018.0101 (Chemical Computing Group Inc.), và các gốc axit amin trên EphA4-LBD mà tiếp xúc trực tiếp với kháng thể A-Fab được xác định (Hình 11A). Các gốc axit amin đã được xác định là Glu51, Gly52, Ile59, Gln71, Cys73, Asn74, Val75, Met76, Glu77, Thr104, Arg106, Leu111, Pro112, Met115, Arg162, Met164, Cys191, Ala193, và Val195. Hình 11B thể hiện cấu trúc bề mặt của EphA4-LBD đã được tạo ra với Maestro (phiên bản 11.0, Schrodinger, LLC). Kết quả là, các tác giả sáng chế kết luận rằng vùng trong đó các gốc axit amin này có mặt là vùng liên kết kháng thể A-Fab trong EphA4-LBD.

#### Ví dụ 1: Điều chế kháng thể được làm cho giống người của kháng thể A

##### Điều chế kháng thể kháng EphA4 được làm cho giống người

Vùng biến đổi của kháng thể được làm cho giống người được thiết kế. Dựa trên độ tương đồng cao đối với vùng khung (FR) của kháng thể A, trong số các FR của kháng thể người, IGHV3-33\*03 (SEQ ID NO. 42) và JH6 (SEQ ID NO. 43) đối với chuỗi nặng và IGKV1-17\*01 (SEQ ID NO. 40) và JK4 (SEQ ID NO. 41) đối với chuỗi nhẹ được chọn làm các FR cho kháng thể được làm cho giống người. Sau đó các axit amin trong FR mà tương tác với các axit amin của CDR được dự đoán bằng cách sử dụng mô hình dự đoán cấu trúc 3D của kháng thể chuột nhất A, chúng được ghép cùng với CDR của kháng thể A có đột biến Y32F trong CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO. 44, 27, 28, và 29-31), và HK2-42 (SEQ ID NO. 45) được thiết kế làm vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm cho giống người và L1-8 (SEQ ID NO. 46) được thiết kế làm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm cho giống người. Trình tự axit amin của CDR đã được ghép được thể hiện trong Bảng 2, và trình tự axit nucleic được thể hiện trong Bảng 3.

Vùng không đổi của IgG<sub>2</sub> người (SEQ ID NO. 47) được dùng làm vùng không

đổi chuỗi nặng. Igκ người (SEQ ID NO. 48) được dùng làm vùng không đổi chuỗi nhẹ. Vector biểu hiện (pcDNA 3.4) có chứa trình tự gen mã hóa cho trình tự axit amin của kháng thể được làm cho giống người được chuyển nạp vào tế bào Expi293F (Gibco/ThermoFisher) với hệ thống biểu hiện Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Khi trình tự gen mã hóa cho trình tự axit amin của kháng thể được làm cho giống người, lần lượt trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO. 55 được dùng làm vùng biến đổi chuỗi nặng, trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO. 56 được dùng làm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO. 57 được dùng làm vùng không đổi chuỗi nặng, và trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO. 58 được dùng làm vùng không đổi chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng (không bao gồm trình tự tín hiệu) của kháng thể được làm cho giống người là trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 59, trình tự axit amin của chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ (không bao gồm trình tự tín hiệu) là trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 60. Trình tự axit nucleic mã hóa cho chiều dài đầy đủ của chuỗi nặng của kháng thể được làm cho giống người là trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO. 61, và trình tự axit nucleic mã hóa cho chiều dài đầy đủ của chuỗi nhẹ là trình tự axit nucleic được thể hiện trong SEQ ID NO. 62. Dịch nổi bề mặt được thu hồi, và kháng thể được làm cho giống người của kháng thể A (kháng thể B) được tinh chế bằng MabSelectSuRe (GE Healthcare).

[Bảng 2]

Các trình tự axit amin của CDR của kháng thể B

| Tên             | Trình tự                         |
|-----------------|----------------------------------|
| CDR1 chuỗi nặng | RFGVH (SEQ ID NO. 44)            |
| CDR2 chuỗi nặng | VIWRGGSTDYNAAFMS (SEQ ID NO. 27) |

|                 |                                    |
|-----------------|------------------------------------|
| CDR3 chuỗi nặng | ESLFGVYYDYGYYSM DY (SEQ ID NO. 28) |
| CDR1 chuỗi nhẹ  | RASQEISGYLS (SEQ ID NO. 29)        |
| CDR2 chuỗi nhẹ  | AASTLDS (SEQ ID NO. 30)            |
| CDR3 chuỗi nhẹ  | LQYASYPLT (SEQ ID NO. 31)          |

[Bảng 3]

Trình tự axit nucleic của CDR của kháng thể B

| Tên             | Trình tự                                                                |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| CDR1 chuỗi nặng | AGATTTGGAGTGCAT (SEQ ID NO. 49)                                         |
| CDR2 chuỗi nặng | GTGATCTGGAGGGGAGGATCCACCGACTACAACG<br>CTGCTTTTATGAGC (SEQ ID NO. 50)    |
| CDR3 chuỗi nặng | GAGAGCCTGTTCGGCGTGTACTATGACTACGGCTA<br>CTATTCTATGGATTAT (SEQ ID NO. 51) |
| CDR1 chuỗi nhẹ  | CGCGCCTCCCAGGAGATCTCTGGCTACCTGTCC<br>(SEQ ID NO. 52)                    |
| CDR2 chuỗi nhẹ  | GCTGCCTCCACCCTGGACTCT (SEQ ID NO. 53)                                   |
| CDR3 chuỗi nhẹ  | CTGCAGTACGCTTCCTATCCACTGACC (SEQ ID<br>NO. 54)                          |

Ví dụ 2: Ái lực của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người chống lại EphA4 người

Ái lực liên kết của kháng thể B thu được trong Ví dụ 1 chống lại EphA4 người được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (phương pháp SPR) bằng cách sử dụng

Biacore T200 (GE Healthcare). Trước hết, kháng thể kháng His (GE Healthcare, 28-9950-56) được cố định lên trên chip cảm biến CM5. Sự cố định được thực hiện bằng phương pháp ghép nối amin sử dụng N-hydroxysuccinimide (NHS) và N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), và ethanolamine được dùng để phong bế (chip cảm biến và chất phản ứng cố định đều là từ GE Healthcare). Nó được pha loãng đến 3,5 µg/ml với chất đệm cố định (sodium acetate 10 mM, độ pH 4,5), và được cố định trên chip cảm biến theo quy trình gắn với Biacore T200. Vùng ngoại bào EphA4 người-SEAP-His10 được pha loãng bằng chất đệm chạy HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), và dung dịch này được đưa lên trên bề mặt dòng chảy trong thời gian 120 giây để bắt giữ (lượng được bắt giữ là khoảng 10 RU). Tiếp đó, kháng thể B đã pha loãng theo dãy đến khoảng giá trị 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,2, 1,6, và 0 nM với HBS-EP được bổ sung vào chip cảm biến trong thời gian 120 giây, và đường cong phản ứng liên kết vào lúc bổ sung (pha liên kết, 120 giây) và sau khi hoàn thành việc bổ sung (pha phân ly, 600 giây) được quan sát tuần tự. Sau khi hoàn thành mỗi lần quan sát,  $MgCl_2$  4 M (60 giây, Wako Pure Chemical) được bổ sung để tái tạo chip cảm biến. Phân tích làm khớp bằng mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm đánh giá BIA gắn với hệ thống được thực hiện trên đường cong phản ứng liên kết thu được, và ái lực ( $KD = k_d/k_a$ ) chống lại EphA4 người được tính.

Ái lực liên kết của kháng thể B chống lại EphA4 người (giá trị  $KD$ ) là  $1,34 \times 10^{-9}$  M (Hình 12). Điều đó chứng tỏ rằng kháng thể B thể hiện ái lực gần như tương đương như kháng thể A mà là kháng thể trước khi làm cho giống người.

Ví dụ 3: Hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người ở neuron hồi hải mã

Đối với kháng thể B thu được trong Ví dụ 1, việc đánh giá hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 sử dụng neuron hồi hải mã được thực hiện theo các bước sau đây.

Neuron hồi hải mã chuột cống đã cấy trong đĩa 96 giếng (Falcon) được xử lý

bằng kháng thể B (2,0, 6,7, và 20 nM) và thuốc ức chế  $\gamma$  selectaza Hợp chất E (50 nM, Enzo Life Sciences). Hai mươi tư giờ sau, nó được rửa bằng PBS (Wako Pure Chemical), chất đệm mẫu SDS (chất đệm mẫu Laemmli (Bio-Rad) và 2-mercaptoetanol 5% (Bio-Rad)) được bổ sung để thu hồi tế bào, và nó được đun sôi trong thời gian 5 phút. SDS-PAGE được thực hiện với mẫu này, thẩm tách western với kháng thể đơn dòng kháng EphA4 (Abnova) được thực hiện, cường độ băng được định lượng, và giá trị của mảnh đầu tận cùng C EphA4/EphA4 chiều dài đầy đủ được tính.

Kháng thể B tăng cường theo cách phụ thuộc nồng độ phản ứng phân cắt EphA4 ở neuron hồi hải mã (Hình 13)

Ví dụ 4: Hoạt tính ức chế liên kết EphA4 người-phôi tử người của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người

Đối với kháng thể B thu được trong Ví dụ 1, việc đánh giá hoạt tính ức chế của sự liên kết giữa EphA4 người và phôi tử người được thực hiện theo các bước sau đây. Kháng thể kháng phosphataza kiềm (Thermo SCIENTIFIC) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), protein vùng ngoại bào EphA4 người-SEAP-His (nồng độ cuối cùng 10 nM) được cấy trong các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, phôi tử và kháng thể B đã được pha loãng theo dãy (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, và 3000 nM) được bổ sung vào các giếng. Lưu ý rằng thể khảm Ephrin A5-Fc người đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 0,7 nM) và thể khảm Ephrin B3 người-Fc đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 2,3 nM) được dùng làm phôi tử. Sau khi ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ và rửa ba lần, streptavidin đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (GE Healthcare) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ.



Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2-5 phút. Lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (Molecular Devices hoặc PerkinElmer).

Kháng thể B kìm hãm theo cách phụ thuộc nồng độ sự liên kết giữa EphA4 người và phối tử người, và giá trị  $\text{IC}_{50}$  chống lại sự liên kết Ephrin A5 và Ephrin B3 người lần lượt là khoảng 4,9 nM và 1,6 nM. Theo đó, đã phát hiện ra rằng kháng thể B ức chế mạnh mẽ sự liên kết giữa EphA4 người và phối tử người, và thể hiện hoạt tính ức chế gần như tương đương như kháng thể A mà là kháng thể trước khi làm cho giống người (Hình 14).

Ví dụ 5: Hoạt tính ức chế liên kết EphA4 chuột nhất-phối tử chuột nhất của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người

Đối với kháng thể B thu được trong Ví dụ 1, việc đánh giá hoạt tính ức chế của sự liên kết giữa EphA4 chuột nhất và phối tử chuột nhất được thực hiện theo các bước sau đây. Kháng thể kháng phosphatase kiềm (Thermo SCIENTIFIC) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$  qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,02% (Thermo SCIENTIFIC), protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhất-SEAP-His được bổ sung vào các giếng (nồng độ cuối cùng 10 nM), và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, phối tử và kháng thể B đã pha loãng theo dãy (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, và 3000 nM) được bổ sung vào các giếng. Lưu ý rằng thể khảm Ephrin A1 chuột nhất-Fc đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 6 nM) và thể khảm Ephrin B2-Fc chuột nhất đã được biotinyl hóa (R&D Systems, nồng độ cuối cùng 2,5 nM) được dùng làm phối tử. Sau khi

ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ và rửa ba lần, streptavidin đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (GE Healthcare) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút. Lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (Molecular Devices hoặc PerkinElmer).

Kháng thể B kìm hãm theo cách phụ thuộc nồng độ sự liên kết giữa EphA4 chuột nhất và phối tử chuột nhất, và giá trị  $\text{IC}_{50}$  chống lại sự liên kết Ephrin A1 và Ephrin B2 chuột nhất lần lượt là khoảng 8,7 nM và 4,2 nM. Theo đó, đã phát hiện ra rằng kháng thể B ức chế mạnh mẽ sự liên kết giữa EphA4 chuột nhất và phối tử chuột nhất, và thể hiện hoạt tính ức chế gần như tương đương như kháng thể A mà là kháng thể trước khi làm cho giống người (Hình 15).

Ví dụ 6: Tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người chống lại thụ thể Eph người

Tương tự với phương pháp điều chế protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhất-SEAP-His được mô tả trong Ví Dụ Tham Chiếu 1, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của người (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, và EphB6) được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ mô, và được tách dòng vào vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) có trình tự ADN mã hóa cho protein SEAP và đuôi histidin. Tiếp theo, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của người, protein SEAP và đuôi histidin được chuyển vào vector pcDNA 3.1\_rfcB bằng phản ứng LR của Gateway System (Invitrogen/LifeTechnologies) để tạo cấu trúc vector (được đề cập đến dưới dạng "vector biểu hiện protein vùng ngoại bào thụ thể Eph-SEAP-His") biểu hiện protein có protein

SEAP và đuôi His được dung hợp vào vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của người (được đề cập đến dưới dạng "protein vùng ngoại bào thụ thể Eph-SEAP-His.")

Tiếp theo, mỗi vectơ biểu hiện protein vùng ngoại bào thụ thể Eph người -SEAP-His được đưa vào trong tế bào Expi293F (Gibco/ThermoFisher) với hệ thống biểu hiện Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Sau khi ủ năm ngày ( $\text{CO}_2$  5%,  $37^\circ\text{C}$ ), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi, và nó được ly tâm ở nhiệt độ trong phòng, ở tốc độ 1500 vòng/phút, và trong thời gian 5 phút. Dịch nổi bề mặt đã được ly tâm được lọc bằng bộ lọc  $0,45\ \mu\text{m}$  (Millipore).

Đối với kháng thể B thu được trong Ví dụ 1, việc đánh giá hoạt tính liên kết của thụ thể Eph người được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng 6-His của thỏ (Bethyl Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$  qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), mỗi protein vùng ngoại bào thụ thể Eph người-SEAP-His (nồng độ cuối cùng 1 nM) được cấy trong mỗi giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch IgG người ( $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , Mitsubishi Pharma Corporation) và kháng thể B ( $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Kháng thể kháng IgG người của lừa đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Đã phát hiện ra rằng kháng thể B, tương tự với kháng thể A mà là kháng thể trước khi làm cho giống người, liên kết đặc hiệu với EphA4 người trong họ thụ thể Eph người (Hình 16).

Ví dụ 7: Tính chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người chống lại thụ thể Eph chuột nhắt

Sau phương pháp điều chế protein vùng ngoại bào EphA4-Fc-His theo Ví Dụ Tham Chiếu 1, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph của chuột nhắt (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, và EphB6) được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ mô, và được tách dòng vào vector pENTR1A (Invitrogen/LifeTechnologies) có trình tự ADN mã hóa cho vùng Fc của IgG<sub>1</sub> người và đuôi histidin. Tiếp theo, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của mỗi thụ thể Eph (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, và EphB6) của chuột nhắt, Fc, và đuôi histidin được chuyển vào vector pcDNA 3.1\_rfcB bằng phản ứng LR của Gateway System (Invitrogen/LifeTechnologies) để tạo cấu trúc mỗi vector biểu hiện protein vùng ngoại bào thụ thể Eph chuột nhắt-Fc-His. Trong việc tạo cấu trúc của vector biểu hiện protein vùng ngoại bào EphA2 chuột nhắt-Fc-His, trình tự ADN mã hóa cho trình tự tín hiệu và vùng ngoại bào của EphA2 chuột nhắt được khuếch đại bằng RT-PCR với ARN tổng số có nguồn gốc từ mô, và được tách dòng vào vector pcDNA 3.1 có trình tự ADN mã hóa cho Fc và đuôi histidin để tạo cấu trúc vector biểu hiện protein vùng ngoại bào EphA2 chuột nhắt-Fc-His.

Tiếp theo, mỗi vector biểu hiện protein vùng ngoại bào thụ thể Eph chuột nhắt-Fc-His được đưa vào trong tế bào Expi293F (Gibco/ThermoFisher) với hệ thống biểu hiện Expi293 (Gibco/ThermoFisher). Sau khi nuôi cấy 5 ngày (CO<sub>2</sub> 5%, 37°C, 120 vòng/phút), dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi, và nó được ly tâm ở nhiệt

độ trong phòng, ở tốc độ 1500 vòng/phút, và trong thời gian 5 phút. Dịch nổi bề mặt đã được ly tâm được lọc bằng bộ lọc 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore).

Đối với kháng thể B, việc đánh giá hoạt tính liên kết của thụ thể Eph chuột nhắt được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng 6-His của thỏ (Betyl Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), mỗi protein vùng ngoại bào thụ thể Eph chuột nhắt-Fc-His (nồng độ cuối cùng 1 nM) được cấy trong mỗi giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch IgG người (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) và kháng thể B (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Kháng thể kháng Chuỗi Nhẹ Kappa người của dê đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (IBL) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Trong họ thụ thể Eph chuột nhắt, kháng thể B có hoạt tính liên kết đặc hiệu chỉ với EphA4 chuột nhắt (Hình 17).

Ví dụ 8: Khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người chống lại EphA4 chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người

Đối với kháng thể B, việc đánh giá hoạt tính liên kết với các EphA4 khác nhau được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng phosphatase kiềm (Thermo SCIENTIFIC) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được

phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa ba lần bằng Tween 20/PBS 0,05% (Thermo SCIENTIFIC), protein vùng ngoại bào EphA4 chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người-SEAP-His (nồng độ cuối cùng 1 nM) được cấy trong các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch IgG người (100 µg/ml, Mitsubishi Pharma Corporation) và kháng thể B (0, 0,00013, 0,00064, 0,0032, 0,016, 0,08, 0,4, 2, và 10 µg/ml) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Kháng thể kháng IgG người của lừa đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, dung dịch TMBZ (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin, Sigma) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng, và độ hấp thụ ở 450 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Kháng thể B có hoạt tính liên kết tương đương trong tất cả EphA4 chuột nhắt, chuột cống, khỉ, và người (Hình 18).

Ví dụ 9: Khả năng phản ứng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người chống lại vùng ngoại bào EphA4 người, miền liên kết phối tử, miền 1 fibronectin típ III, miền 2 fibronectin típ III

Đối với kháng thể B thu được trong Ví dụ 1, việc đánh giá hoạt tính liên kết với các miền khác nhau trong EphA4 người được thực hiện theo các bước sau đây.

Kháng thể kháng 6-His của thỏ (Betyl Laboratories) được phủ lên trên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc). Sau khi ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm, các giếng được phong bế ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ bằng Block ACE 1% (DS Pharma Biomedical). Sau khi rửa hai lần bằng Tween 20/PBS 0,02% (Nacalai Tesque), protein vùng ngoại bào EphA4 người-MBP-His, protein miền liên kết phối tử EphA4 người-

MBP-His, protein miền 1 fibronectin týp III EphA4 người-MBP-His, và protein miền 2 fibronectin týp III EphA4 người-MBP-His (nồng độ cuối cùng 10 nM) được cấy trong các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần, kháng thể B (nồng độ cuối cùng 10 nM) được bổ sung vào các giếng, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Mẫu kháng thể kháng Fcγ IgG người của thỏ đã được gắn nhãn peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) được bổ sung, và nó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa năm lần, dung dịch TMB (KPL) được bổ sung vào các giếng, và khi xác nhận lượng sắc tố vừa phải, lượng ngang bằng của dung dịch làm dừng ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, Wako Pure Chemical) được bổ sung vào các giếng. Độ hấp thụ ở 450 nm và 650 nm được đọc bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer).

Kháng thể B có hoạt tính liên kết đối với vùng ngoại bào (ECD) của EphA4 người và miền liên kết phối tử (LBD) (Hình 19). Không có phản ứng đối với miền 1 fibronectin týp III (FN1) và miền 2 fibronectin týp III (FN2). Theo đó, đã phát hiện ra rằng kháng thể AB liên kết đặc hiệu với miền liên kết phối tử của vùng ngoại bào EphA4 người.

Ví dụ 10: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người lên việc làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã

Việc điều chế noron hồi hải mã chuột cống được thực hiện như được mô tả trong Ví Dụ Tham Chiếu 1 (B). Noron hồi hải mã chuột cống được đưa gen EGFP vào bằng cách sử dụng Nucleofector (Lonza), và được cấy trong đĩa 24 giếng (Falcon) chứa kính đáy (Matsunami Glass Industries) được phủ bằng poly-L-lysine.

Việc đếm gai sử dụng noron hồi hải mã được thực hiện theo các bước sau đây. Noron hồi hải mã chuột cống đã được đưa EGFP vào vào Ngày nuôi cấy 13 đã cấy trong đĩa 24 giếng (Falcon) chứa kính đáy (Matsunami Glass Industries) được phủ bằng poly-L-lysine được xử lý bằng kháng thể đối chứng (người IgG<sub>2</sub>; Sigma) hoặc kháng thể B

(6,7 và 20 nM) trong thời gian 24 giờ. Sau đó kính đáy được chuyển vào PFA 2% (Wako Pure Chemical)/sucroza 4% (Wako Pure Chemical)/PBS, và nó được để yên trong thời gian 20 phút để cố định tế bào. Sau khi loại bỏ dung dịch cố định và rửa tế bào ba lần bằng PBS, Triton X-100 0,25% (Wako Pure Chemical)/PBS được bổ sung, và việc làm cho tế bào có thể thấm được thực hiện trong thời gian 15 phút. Dung dịch được loại bỏ, kính đáy được chuyển vào BSA 2% (Sigma)/Triton X-100 0,25%/OPTI-MEM (GIBCO) và được đưa đi phong bế một giờ, sau đó kháng thể kháng GFP (Nacalai Tesque) được để cho phản ứng trong thời gian 1,5 giờ. Sau khi loại bỏ dung dịch kháng thể sơ cấp và rửa ba lần bằng PBS, kháng thể thứ cấp được để cho phản ứng trong thời gian một giờ. Sau khi loại bỏ dung dịch kháng thể thứ cấp và rửa ba lần bằng PBS, chất phản ứng Prolong Gold antifade (Molecular probes) được bổ sung để lấp ghép, và việc quan sát được thực hiện với LSM800 (ZEISS). Thí nghiệm được mô tả ở trên được thực hiện ba lần, và đối với mỗi thí nghiệm, noron được chiết từ hai kính đáy, các gai trên mỗi sợi nhánh được đếm bằng phần mềm phân tích hình ảnh Imaris® (Bitplane), và số lượng gai trong mỗi 10  $\mu\text{m}$  đối với mỗi noron được tính.

Kháng thể B làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã (Hình 20). Kết quả này cho thấy rằng kháng thể B có hoạt tính để làm ổn định các gai ở noron hồi hải mã.

Ví dụ 11: Hoạt tính tăng cường phân cắt EphA4 người của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người

Đối với kháng thể B thu được trong Ví dụ 1, việc đánh giá hoạt tính tăng cường phân cắt trên EphA4 người được thực hiện theo các bước sau đây.

Việc điều chế noron hồi hải mã chuột cống được thực hiện như được mô tả trong Ví Dụ Tham Chiếu 1 (B). Noron hồi hải mã chuột cống được đưa vector biểu hiện protein EphA4 người-HA vào bằng cách sử dụng Nucleofector (Lonza), và được cấy trong đĩa 96 giếng (Falcon) được phủ bằng poly-L-lysine. Noron hồi hải mã chuột cống đã được cấy được xử lý bằng kháng thể B (6,7, 20, và 67 nM) và thuốc ức chế  $\gamma$  selectaza Hợp



chất E (50 nM, Enzo Life Sciences). Khoảng hai mươi tư giờ sau, nó được rửa bằng PBS (Wako Pure Chemical), chất đệm mẫu SDS (chất đệm mẫu Laemmli (Bio-Rad) và 2-mercaptoetanol 5% (Bio-Rad)) được bổ sung để thu hồi tế bào, và nó được đun sôi trong thời gian 5 phút. SDS-PAGE được thực hiện với mẫu này, thẩm tách western với kháng thể đơn dòng kháng HA chuột cống (Roche) được thực hiện, cường độ băng được định lượng, và giá trị của mảnh đầu tận cùng C EphA4/EphA4 chiều dài đầy đủ được tính.

Kháng thể B tăng cường người phản ứng phân cắt EphA4 ở noron hồi hải mã (Hình 21).

Ví dụ 12: Sự tham gia của MMP và ADAM chống lại tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người lên việc làm tăng số lượng gai ở noron hồi hải mã

Việc điều chế noron hồi hải mã chuột cống được thực hiện như được mô tả trong Ví Dụ Tham Chiếu 1 (B). Một phần của noron hồi hải mã chuột cống được đưa gen EGFP vào bằng cách sử dụng Nucleofector (Lonza), và được cấy trong đĩa 24 giếng (Falcon) chứa kính đáy (Matsunami Glass Industries) được phủ bằng poly-L-lysine.

Việc đếm gai sử dụng noron hồi hải mã được thực hiện theo các bước sau đây. Noron hồi hải mã chuột cống đã được đưa EGFP vào vào Ngày nuôi cấy 13 đã cấy trong đĩa 24 giếng (Falcon) chứa kính đáy (Matsunami Glass Industries) được phủ bằng poly-L-lysine được xử lý bằng kháng thể đối chứng (người IgG<sub>2</sub>; Sigma) hoặc kháng thể B (20 nM), cũng như là DMSO (Sigma) hoặc chất ức chế MMP và ADAM GM6001 (2,5  $\mu$ M, MedChemExpress) trong thời gian 24 giờ. Sau đó kính đáy được chuyển vào PFA 2% (Wako Pure Chemical)/sucroza 4% (Wako Pure Chemical)/PBS, và nó được để yên trong thời gian 20 phút để cố định tế bào. Sau khi loại bỏ dung dịch cố định và rửa tế bào ba lần bằng PBS, Triton X-100 0,25% (Wako Pure Chemical)/PBS được bổ sung, và việc làm cho tế bào có thể thấm được thực hiện trong thời gian 15 phút. Triton X-100 0,25%/PBS được lấy ra, kính đáy được chuyển vào BSA 2% (Sigma)/Triton X-100

0,25%/OPTI-MEM (GIBCO) và được đưa đi phong bế một giờ, sau đó kháng thể kháng GFP (Nacalai Tesque) được để cho phản ứng trong thời gian 1,5 giờ. Sau khi loại bỏ dung dịch kháng thể sơ cấp và rửa ba lần bằng PBS, kháng thể thứ cấp được để cho phản ứng trong thời gian một giờ. Sau khi loại bỏ dung dịch kháng thể thứ cấp và rửa ba lần bằng PBS, chất phản ứng Prolong Gold antifade (Molecular probes) được bổ sung để lấp ghép, và việc quan sát được thực hiện với LSM800 (ZEISS). Thí nghiệm được mô tả ở trên được thực hiện ba lần, và đối với mỗi thí nghiệm, noron được chiết từ hai kính đây, các gai trên mỗi sợi nhánh được đếm bằng phần mềm phân tích hình ảnh Imaris® (Bitplane), và số lượng gai trong mỗi 10  $\mu\text{m}$  đối với mỗi noron được tính.

Sự tăng lên của số lượng gai ở noron hồi hải mã bằng kháng thể B bị ức chế bằng cách xử lý đồng thời bằng GM6001 (Hình 22). Kết quả này cho thấy rằng kháng thể B có hoạt tính làm ổn định gai thông qua MMP và ADAM ở noron hồi hải mã.

Ví dụ 13: Tác dụng của kháng thể đơn dòng kháng EphA4 được làm cho giống người để tìm hiểu sự phosphoryl hóa tau *in vivo*

Việc đánh giá tác dụng để tìm hiểu sự phosphoryl hóa tau *in vivo* bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen tau (rTg4510) được thực hiện theo các bước sau đây. Chuột nhắt chuyển gen tau (rTg4510) được dùng dưới da hai lần một tuần từ 20 đến 26 tuần tuổi với kháng thể B ở liều lượng bằng 100 mg/kg (10 ml/kg). PBS (Wako Pure Chemical) được dùng dưới da ở 10 ml/kg cho nhóm đối chứng. Vào 3,5 ngày sau khi dùng lần cuối cùng, các con chuột nhắt được gây mê bằng thuốc gây mê hít isofluran 2-2,5% (Intervet) và hỗn hợp của ba loại thuốc gây mê (4,0 mg/kg của Dormicum (Astellas Pharma), 0,3 mg/kg của Domitor (Nippon Zenyaku Kogyo), và 5,0 mg/kg của Vetorphale (Meiji Seika Pharma)), việc truyền được thực hiện ở tình trạng gây mê bằng PBS (Wako Pure Chemical) chứa 3 đơn vị/ml của heparin (Ajinomoto) và hỗn hợp chất ức chế phosphatase 1% (Nacalai Tesque), và bán cầu não của các con chuột nhắt được cắt ra. Bán cầu não đã được thu lấy được cố định ở nhiệt độ 4°C trong khi lác qua đêm

được nhúng trong paraformaldehyt 2% (TAAB)/chất đệm photphat 0,1 M (Wako Pure Chemical). Bán cầu não được thay thế bằng sucroza 10% (Wako Pure Chemical)/chất đệm photphat 0,1 M (Wako Pure Chemical) và tiếp đó sucroza 20%/chất đệm photphat 0,1 M (Wako Pure Chemical), và sau đó được nhúng trong Hộp chất Tissue-Tek O.C.T. Hộp chất (Sakura Finetek Nhật Bản)/sucroza 20%, và được làm đông lạnh bằng cách sử dụng khối nhôm đã được làm lạnh bằng nitơ lỏng. Các lát cắt của bán cầu não được tạo ra ở độ dày bằng 7  $\mu\text{m}$  với máy điều lạnh CM1860 (Leica). Các lát cắt được dính trên lam kính phủ silan (Muto Pure Chemicals), được làm khô trong không khí bằng không khí lạnh, và sau đó được đặt trong túi kín và được lưu trữ ở nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$ . Lam kính dùng để nhuộm màu miễn dịch được lấy ra từ  $-80^{\circ}\text{C}$ , được làm khô trong không khí bằng không khí lạnh, và sau đó được rửa bằng PBS (Wako Pure Chemical), được nhúng trong dung dịch BSA 1% (Sigma)/huyết thanh lừa bình thường 10% (Jackson ImmunoResearch Laboratories)/Triton X-100 0,5% (Wako Pure Chemical)/PBS, và được đưa đi phong bế một giờ, sau đó kháng thể kháng tau đã được phosphoryl hóa AT8 (Fujirebio Europe N.V.) được để cho phản ứng qua đêm ở nhiệt độ bình thường. Sau khi rửa ba lần bằng PBS, kháng thể thứ cấp được để cho phản ứng trong thời gian một giờ. Sau khi rửa ba lần bằng PBS, chất phản ứng Prolong Gold antifade (Molecular probes) được đặt trên lam kính và được lắp, và việc quan sát được thực hiện với LSM700 (ZEISS). Diện tích dương tính tín hiệu AT8 ở lớp tia CA1 hồi hải mã được đo bằng phần mềm phân tích hình ảnh Metamorph, và tỉ lệ của diện tích tín hiệu AT8-dương với tổng diện tích được tính.

Kháng thể B làm giảm tín hiệu của tau đã được phosphoryl hóa ở vùng CA1 hồi hải mã (Hình 23). Kết quả này cho thấy rằng kháng thể B có hoạt tính để kìm hãm sự tiến triển của bệnh lý protein tau ở chuột nhất chuyển gen tau (rTg4510).

## YÊU CẦU BẢO HỘ

### 1. Kháng thể kháng EphA4, trong đó

kháng thể kháng EphA4 có chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và có chứa:

- (a) CDR1 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 44;
- (b) CDR2 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 27;
- (c) CDR3 chuỗi nặng gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 28;
- (d) CDR1 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 29;
- (e) CDR2 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 30; và
- (f) CDR3 chuỗi nhẹ gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 31.

### 2. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng EphA4 này được làm cho giống người.

### 3. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng có chứa vùng biến đổi gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 45, và chuỗi nhẹ có chứa vùng biến đổi gồm có trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 46.

### 4. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 1, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chứa các vùng không đổi có chứa các trình tự axit amin có nguồn gốc từ kháng thể người.

### 5. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 4, trong đó vùng không đổi của chuỗi nặng là vùng không đổi của IgG người.

### 6. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 5, trong đó vùng không đổi của IgG người là vùng không đổi của IgG<sub>2</sub> người.

### 7. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 6, trong đó

vùng không đổi của IgG<sub>2</sub> người có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 47.

### 8. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 4, trong đó vùng không đổi của chuỗi nhẹ là vùng

không đổi của Igk người.

9. Kháng thể kháng EphA4 theo điểm 8, trong đó vùng không đổi của Igk người có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 48.

10. Kháng thể kháng EphA4, trong đó kháng thể kháng EphA4 có chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 59, và chuỗi nhẹ có chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 60.

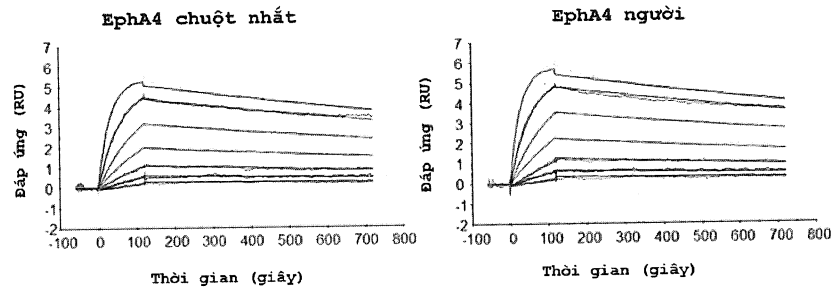
11. Dược phẩm chứa kháng thể kháng EphA4 theo điểm 1 và ít nhất một chất mang được dụng.

12. Kháng thể kháng EphA4, trong đó kháng thể kháng EphA4 này chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 59, chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO. 60, và lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng bị làm khuyết.

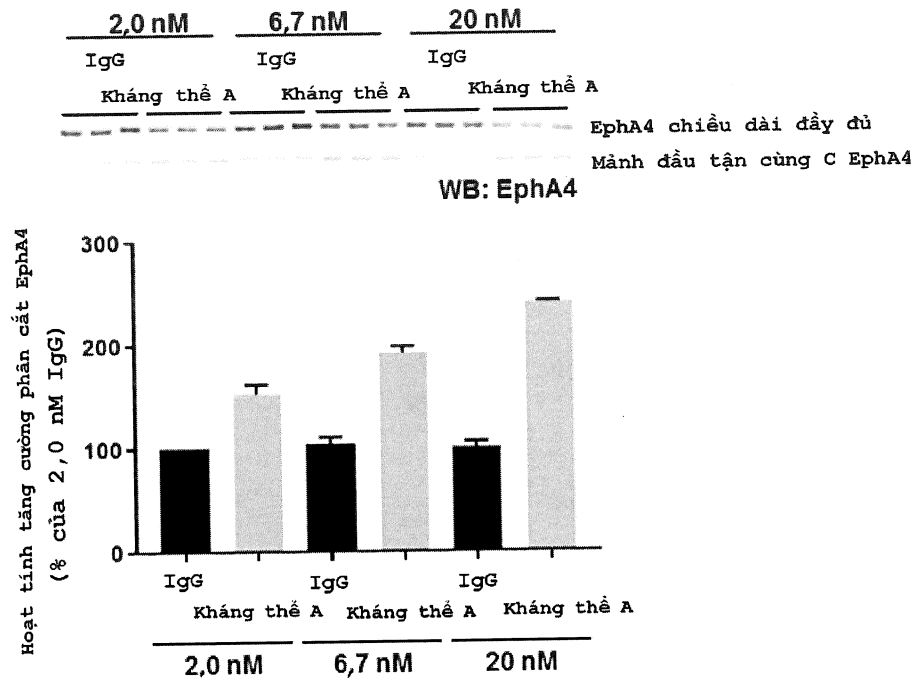
13. Dược phẩm chứa kháng thể kháng EphA4 theo điểm 10 và ít nhất một chất mang được dụng.

[Hình 1]

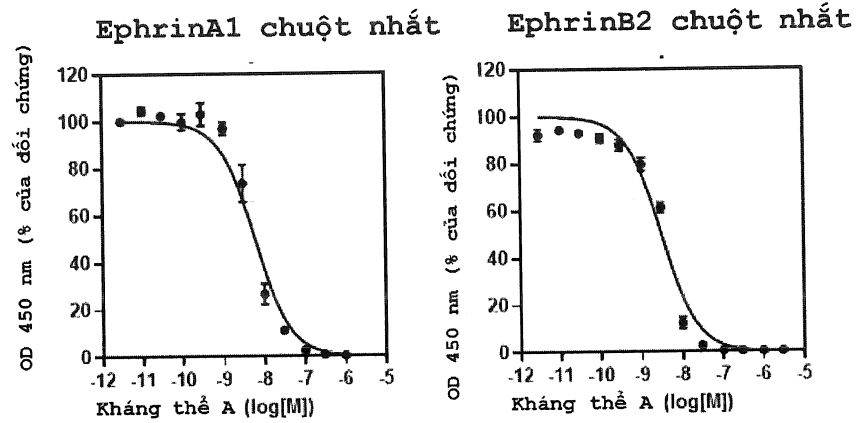
|                  | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)    | Rmax (RU) | $\chi^2$ (RU <sup>2</sup> ) |
|------------------|--------------|-------------|-----------|-----------|-----------------------------|
| EphA4 chuột nhắt | 3,28.E+05    | 4,33.E-04   | 1,32.E-09 | 5,48      | 0,006                       |
| EphA4 người      | 3,79.E+05    | 4,48.E-04   | 1,19.E-09 | 5,40      | 0,012                       |



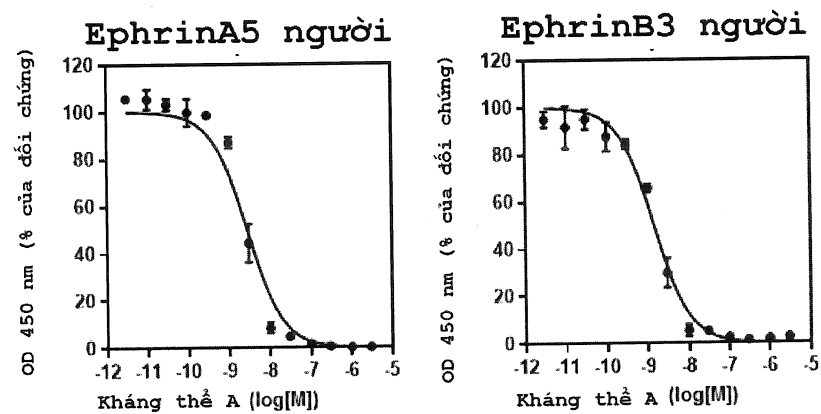
[Hình 2]



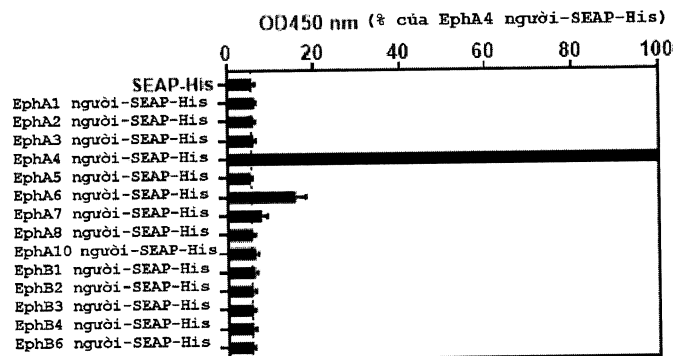
[Hình 3]



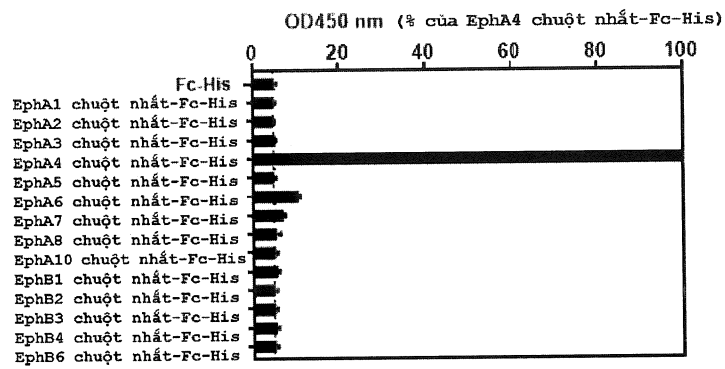
[Hình 4]



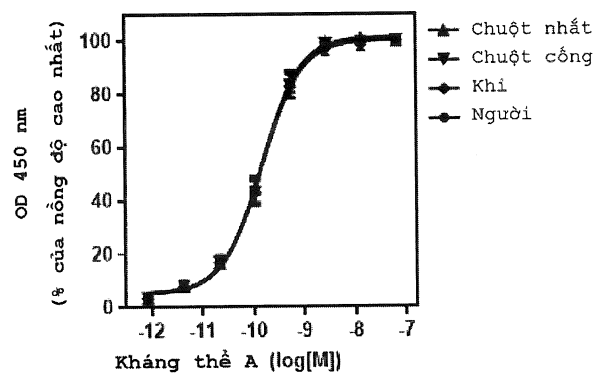
[Hình 5]



[Hình 6]

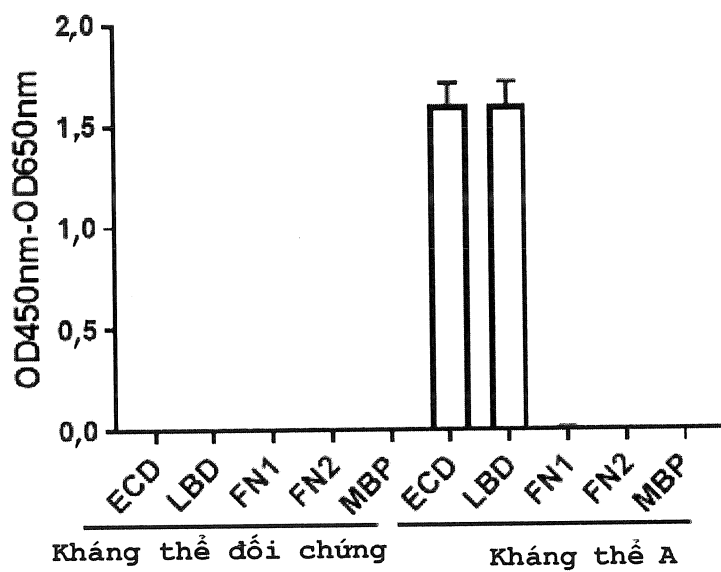


[Hình 7]

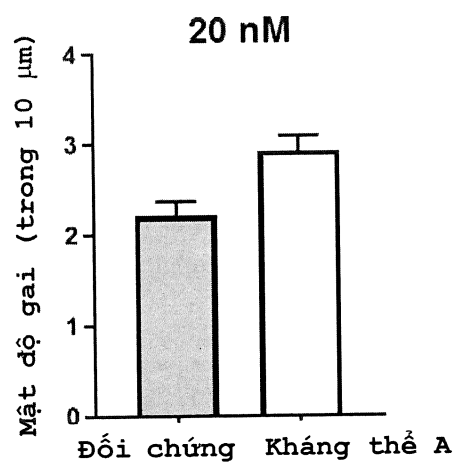
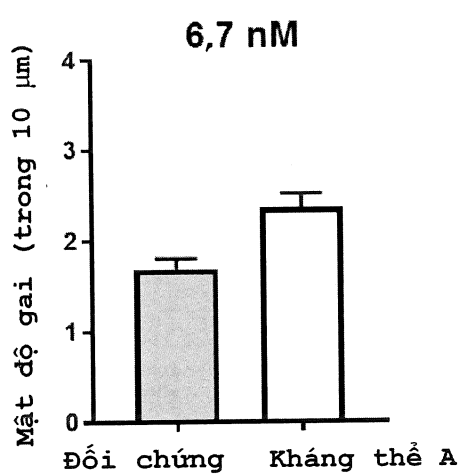
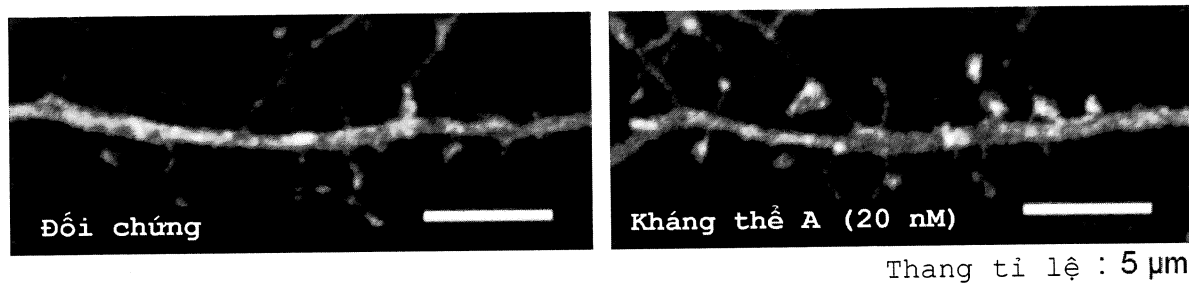




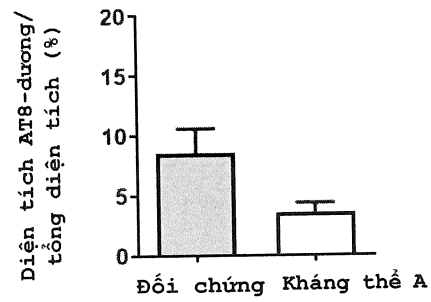
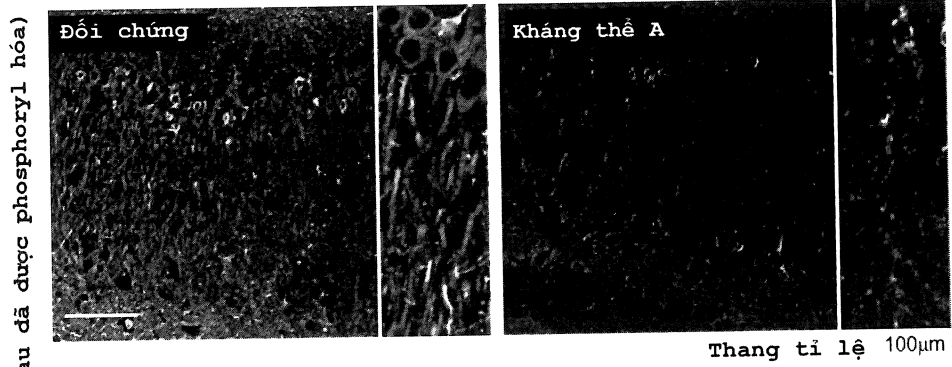
[Hình 8]



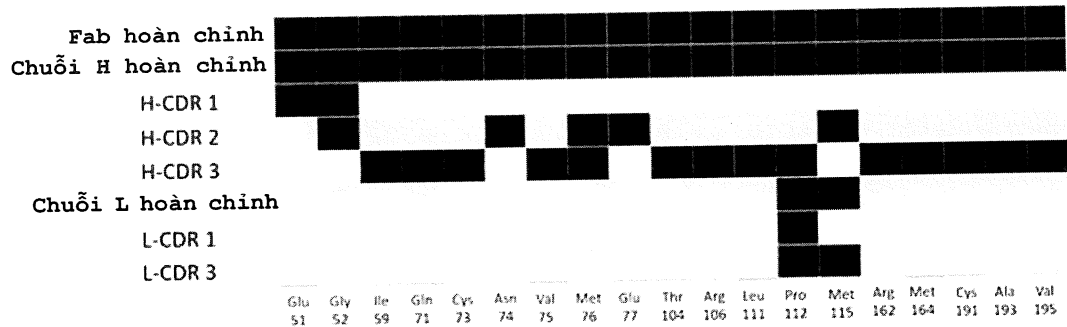
[Hình 9]



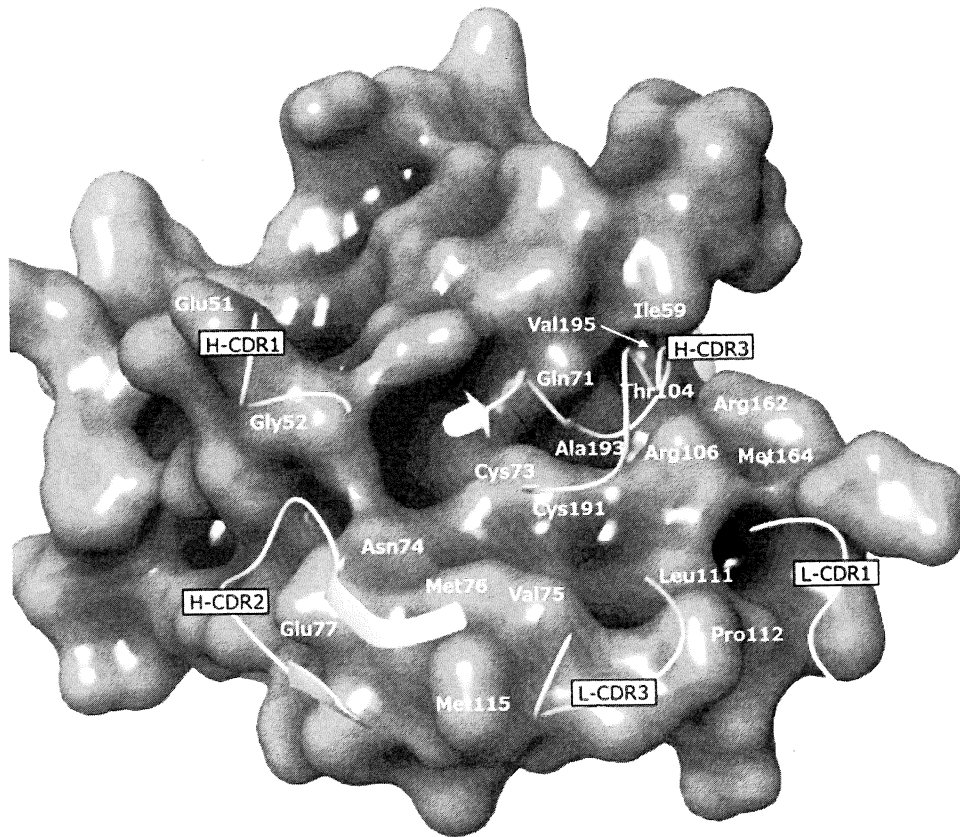
[Hình 10]



[Hình 11A]

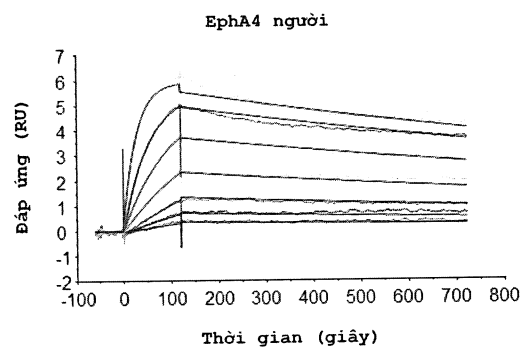


[Hình 11B]

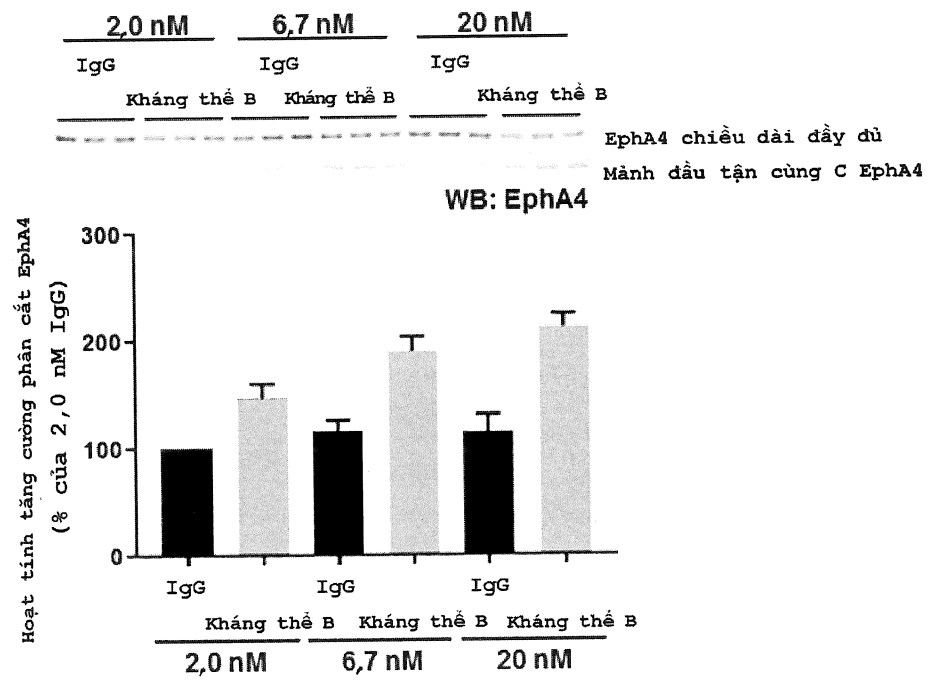


[Hình 12]

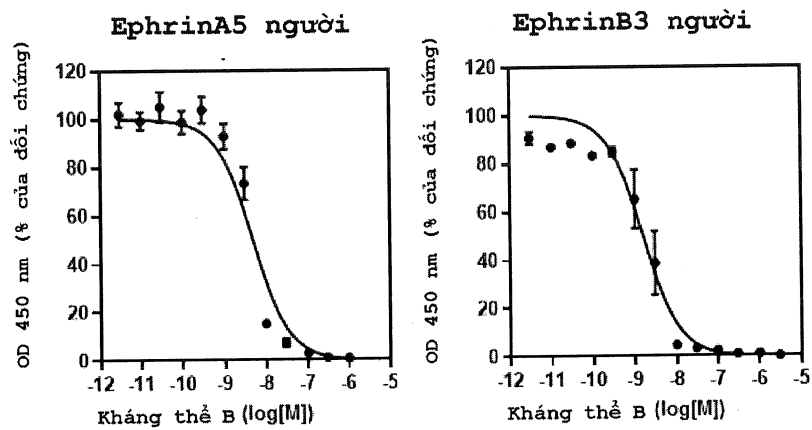
|             | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)    | Rmax (RU) | Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> ) |
|-------------|--------------|-------------|-----------|-----------|-------------------------------------|
| EphA4 người | 3,70.E+05    | 4,94.E-04   | 1,34.E-09 | 5,66      | 0,015                               |



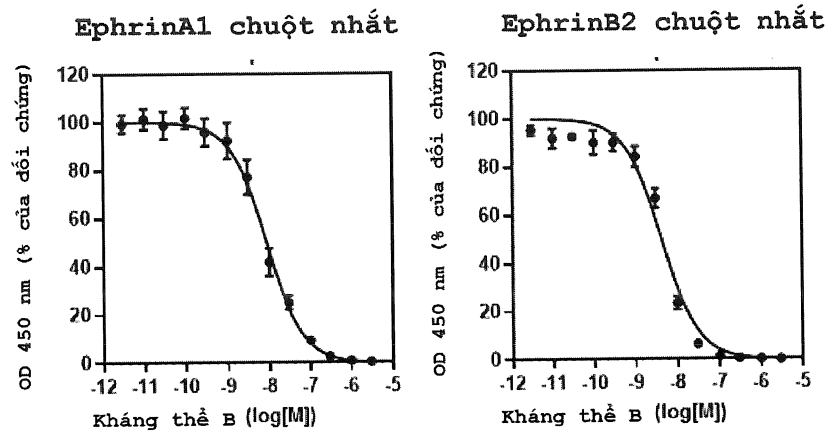
[Hình 13]



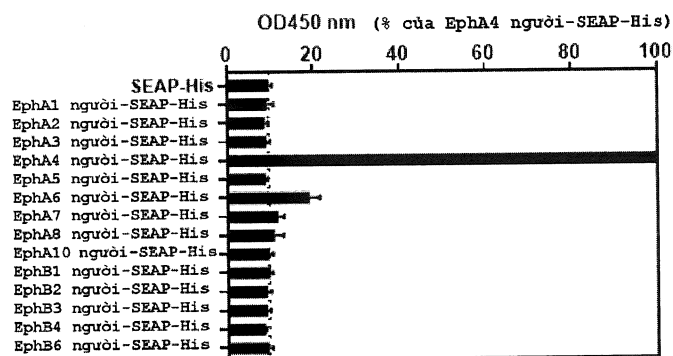
[Hình 14]



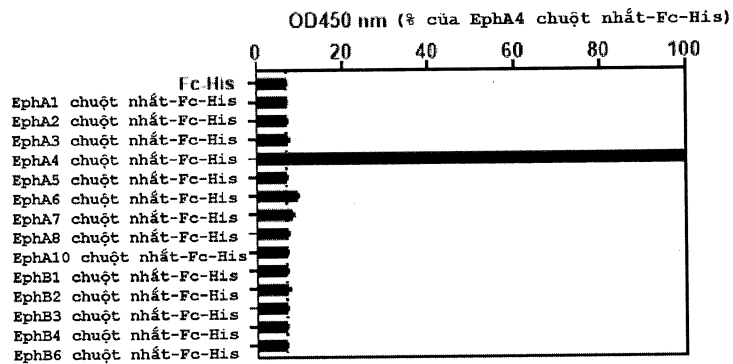
[Hình 15]



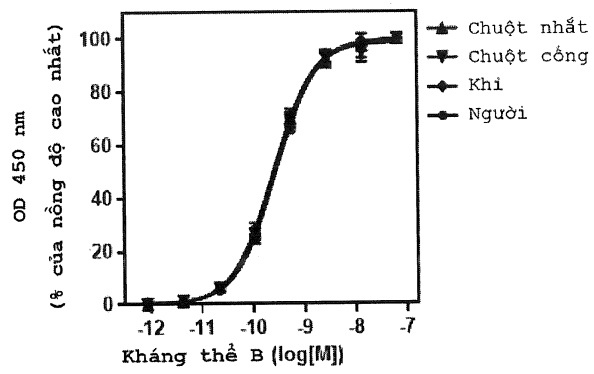
[Hình 16]



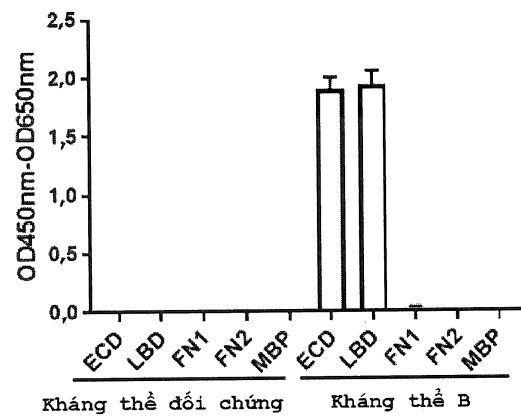
[Hình 17]



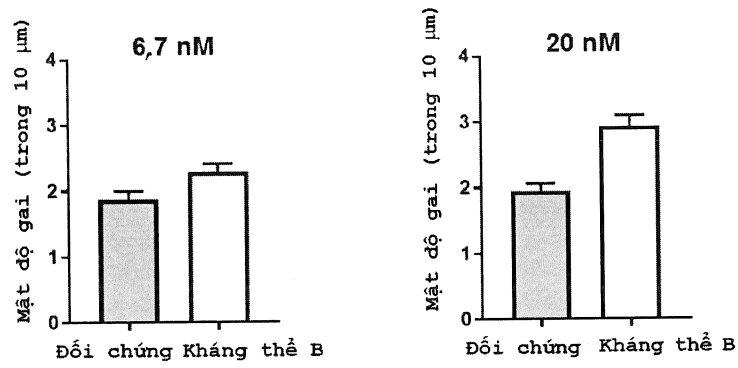
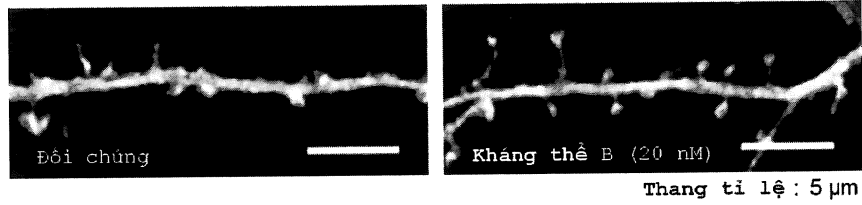
[Hình 18]



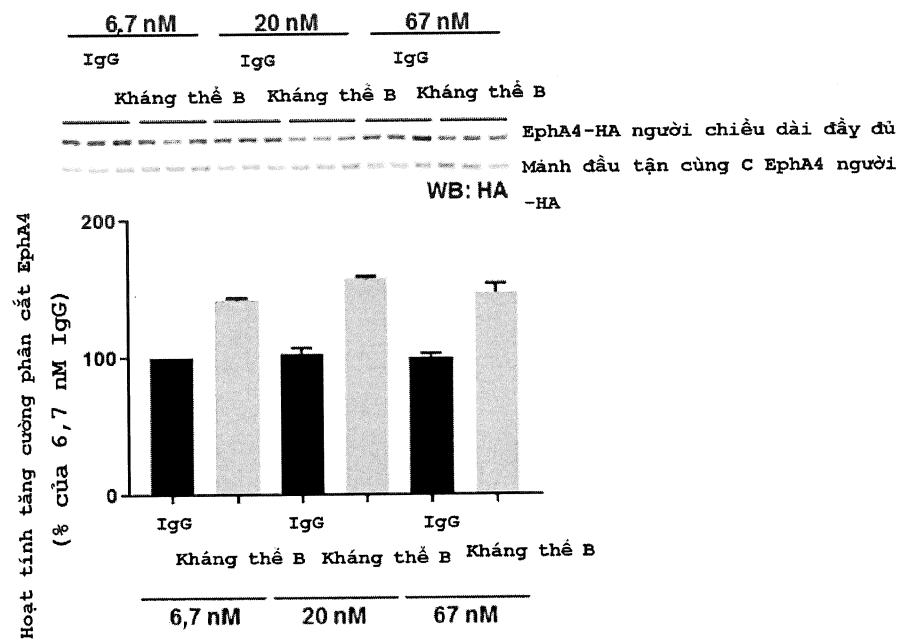
[Hình 19]



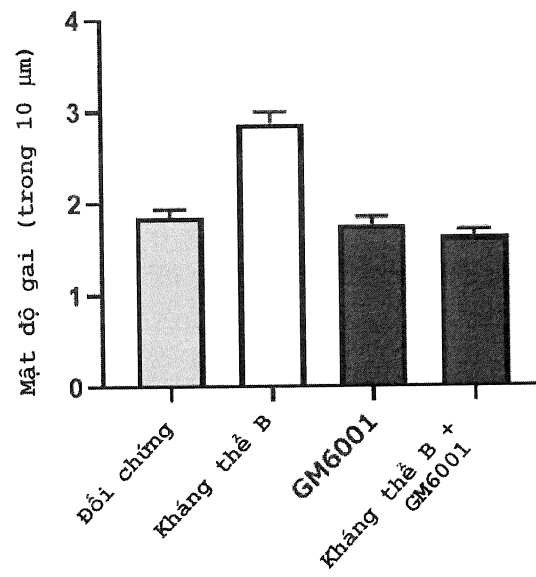
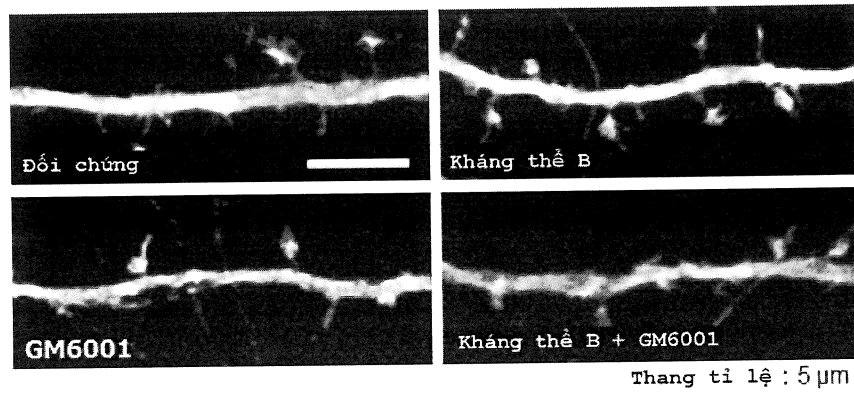
[Hình 20]



[Hình 21]



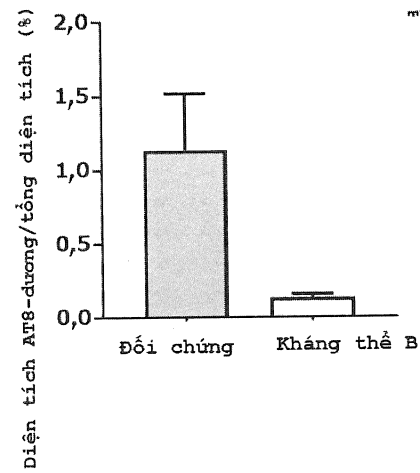
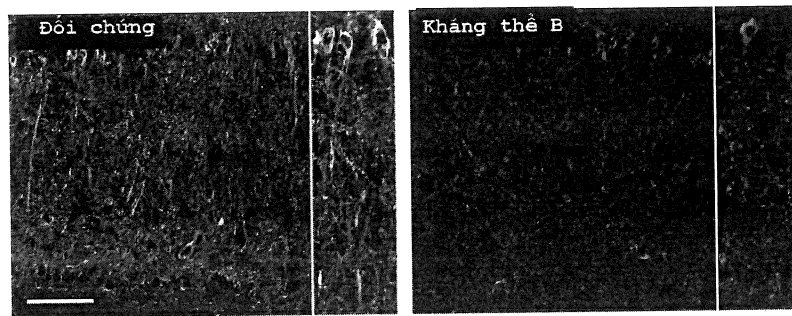
[Hình 22]





[Hình 23]

AT8 (tau đã được phosphoryl hóa)



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> Kháng thể kháng EphA4 và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> ESAP1901F

<150> JP2019-122982

<151> 2019-07-01

<160> 62

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 986

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Gly | Ile | Phe | Tyr | Phe | Ile | Leu | Phe | Ser | Phe | Leu | Phe | Gly | Ile |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Asp | Ala | Val | Thr | Gly | Ser | Arg | Val | Tyr | Pro | Ala | Asn | Glu | Val | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Leu | Asp | Ser | Arg | Ser | Val | Gln | Gly | Glu | Leu | Gly | Trp | Ile | Ala | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Leu | Glu | Gly | Gly | Trp | Glu | Glu | Val | Ser | Ile | Met | Asp | Glu | Lys | Asn |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Pro | Ile | Arg | Thr | Tyr | Gln | Val | Cys | Asn | Val | Met | Glu | Ala | Ser | Gln |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Asn | Trp | Leu | Arg | Thr | Asp | Trp | Ile | Thr | Arg | Glu | Gly | Ala | Gln | Arg |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Tyr | Ile | Glu | Ile | Lys | Phe | Thr | Leu | Arg | Asp | Cys | Asn | Ser | Leu | Pro |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | Met | Gly | Thr | Cys | Lys | Glu | Thr | Phe | Asn | Leu | Tyr | Tyr | Tyr | Glu |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys  
 130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly  
 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu  
 165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile  
 180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val  
 195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser  
 210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys  
 225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro  
 245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu  
 260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala  
 275 280 285

Ser Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala  
 290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala  
 305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile  
 325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln  
 340 345 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys  
 355 360 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val  
 370 375 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile  
 385 390 395 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val  
 405 410 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val  
 420 425 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln  
 435 440 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro  
 450 455 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu  
 465 470 475 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg  
 485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His  
 500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu  
 515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala  
 530 535 540

Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val  
 545 550 555 560

Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr  
 565 570 575

Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly  
 580 585 590

Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala  
 595 600 605

Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp Ala Ser Cys Ile Lys Ile Glu  
 610 615 620

Lys Val Ile Gly Val Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly Arg Leu  
 625 630 635 640

Lys Val Pro Gly Lys Arg Glu Ile Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys  
 645 650 655

Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser  
 660 665 670

Ile Met Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile His Leu Glu Gly Val  
 675 680 685

Val Thr Lys Cys Lys Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn  
 690 695 700

Gly Ser Leu Asp Ala Phe Leu Arg Lys Asn Asp Gly Arg Phe Thr Val  
 705 710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Gly Ser Gly Met Lys Tyr  
 725 730 735

Leu Ser Asp Met Ser Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile  
 740 745 750

Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Met Ser  
 755 760 765

Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Ala Tyr Thr Thr Arg Gly Gly  
 770 775 780

Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys  
 785 790 795 800

Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu  
 805 810 815

Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp  
 820 825 830

Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Gly Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp  
 835 840 845

Cys Pro Ile Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Glu  
 850 855 860

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys  
 865 870 875 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Ser Glu Ser Ser  
 885 890 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala  
 900 905 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr  
 915 920 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val  
 930 935 940

His Met Ser Gln Asp Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr  
 945 950 955 960



Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys  
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val  
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu  
 180 185 190

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

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro  
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn  
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala  
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala  
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys  
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met  
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val  
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly  
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala  
 340 345 350



Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr  
 355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu  
 370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val  
 385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr  
 405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu  
 420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro  
 435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln  
 450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp  
 465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala  
 485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr  
 500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr  
 515 520 525

<210> 3  
 <211> 1030  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
 <223> Polypeptit tổng hợp

&lt;400&gt; 3

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp  
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu  
 20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile  
 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp  
 50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile  
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met  
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn  
 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr  
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile  
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys  
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val  
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu  
 180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 195                                                             | 200 | 205     |
| Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro |     |         |
| 210                                                             | 215 | 220     |
| Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala |     |         |
|                                                                 | 245 | 250 255 |
| Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala |     |         |
|                                                                 | 260 | 265 270 |
| Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys |     |         |
|                                                                 | 275 | 280 285 |
| Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met |     |         |
|                                                                 | 290 | 295 300 |
| Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val |     |         |
| 305                                                             | 310 | 315 320 |
| Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly |     |         |
|                                                                 | 325 | 330 335 |
| Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala |     |         |
|                                                                 | 340 | 345 350 |
| Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr |     |         |
|                                                                 | 355 | 360 365 |
| Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu |     |         |
|                                                                 | 370 | 375 380 |
| Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val |     |         |
| 385                                                             | 390 | 395 400 |
| Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr |     |         |

11

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

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 820                                                             | 825  | 830  |
| Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His |      |      |
| 835                                                             | 840  | 845  |
| Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met |      |      |
| 850                                                             | 855  | 860  |
| Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp |      |      |
| 865                                                             | 870  | 875  |
| Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly |      |      |
| 885                                                             | 890  | 895  |
| Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys |      |      |
| 900                                                             | 905  | 910  |
| Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro |      |      |
| 915                                                             | 920  | 925  |
| Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu |      |      |
| 930                                                             | 935  | 940  |
| Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu |      |      |
| 945                                                             | 950  | 955  |
| Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln |      |      |
| 965                                                             | 970  | 975  |
| Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val |      |      |
| 980                                                             | 985  | 990  |
| Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala |      |      |
| 995                                                             | 1000 | 1005 |
| Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly His His His     |      |      |
| 1010                                                            | 1015 | 1020 |
| His His His His His His His                                     |      |      |

1025

1030

<210> 4  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Chuột nhắt nhà

&lt;400&gt; 4

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ile Leu Phe Ser Phe Leu Phe Gly Ile  
 1 5 10 15

Cys Asp Ala

<210> 5  
 <211> 986  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile  
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr  
 20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser  
 35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn  
 50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln  
 65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg  
 85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro  
 100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu  
 115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys  
 130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly  
 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu  
 165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile  
 180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val  
 195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser  
 210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys  
 225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro  
 245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu  
 260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala  
 275 280 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala  
 290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala  
 305 310 315 320



Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile  
 325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln  
 340 345 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys  
 355 360 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val  
 370 375 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile  
 385 390 395 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val  
 405 410 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val  
 420 425 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln  
 435 440 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro  
 450 455 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu  
 465 470 475 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg  
 485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His  
 500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu  
 515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala  
530 535 540

Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val  
545 550 555 560

Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr  
565 570 575

Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly  
580 585 590

Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala  
595 600 605

Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp Ala Ser Cys Ile Lys Ile Glu  
610 615 620

Lys Val Ile Gly Val Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly Arg Leu  
625 630 635 640

Lys Val Pro Gly Lys Arg Glu Ile Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys  
645 650 655

Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser  
660 665 670

Ile Met Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile His Leu Glu Gly Val  
675 680 685

Val Thr Lys Cys Lys Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn  
690 695 700

Gly Ser Leu Asp Ala Phe Leu Arg Lys Asn Asp Gly Arg Phe Thr Val  
705 710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Gly Ser Gly Met Lys Tyr  
725 730 735

Leu Ser Asp Met Ser Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile  
 740 745 750

Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Met Ser  
 755 760 765

Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Ala Tyr Thr Thr Arg Gly Gly  
 770 775 780

Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys  
 785 790 795 800

Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu  
 805 810 815

Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp  
 820 825 830

Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Gly Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp  
 835 840 845

Cys Pro Ile Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Glu  
 850 855 860

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys  
 865 870 875 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Thr Glu Ser Ser  
 885 890 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala  
 900 905 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr  
 915 920 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val  
 930 935 940

His Val Asn Gln Glu Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr  
 945 950 955 960

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met  
 965 970 975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val  
 980 985

<210> 6  
 <211> 528  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp  
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu  
 20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile  
 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp  
 50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile  
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met  
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn  
 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr  
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile  
 130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys  
 145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val  
 165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu  
 180 185 190

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

Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro  
 210 215 220

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn  
 225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala  
 245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala  
 260 265 270

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys  
 275 280 285

Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met  
 290 295 300

Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val  
 305 310 315 320

Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly  
 325 330 335

Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala  
340 345 350

Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr  
355 360 365

Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu  
370 375 380

Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val  
385 390 395 400

Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr  
405 410 415

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu  
420 425 430

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro  
435 440 445

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln  
450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp  
465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala  
485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr  
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr  
515 520 525

<210> 7  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> ad29S

<400> 7  
acatcactcc gt  
12

<210> 8  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> ad29AS

<400> 8  
acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct  
50

<210> 9  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 9  
agctacgctg aagtatcaac gcagag  
26

<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 10  
gccagtggat agactgatgg  
20

<210> 11  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Đoạn mỗi tổng hợp

&lt;400&gt; 11

gatggataca gttggtgcag c

21

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptit tổng hợp

&lt;400&gt; 12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Val | Leu | Val | Leu | Leu | Leu | Cys | Leu | Val | Thr | Phe | Pro | Ser | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Val Leu Ser

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptit tổng hợp

&lt;400&gt; 13

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Lys | Gln | Ser | Gly | Pro | Ser | Leu | Val | Gln | Pro | Ser | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Ser | Ile | Thr | Cys | Thr | Val | Ser | Gly | Phe | Ser | Leu | Thr | Arg | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ser | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Leu |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Val | Ile | Trp | Arg | Gly | Gly | Ser | Thr | Asp | Tyr | Asn | Ala | Ala | Phe | Met |
|     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |



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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Lys Glu Ser Leu Phe Gly Val Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ser Met  
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 14

Met Asp Met Arg Val Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Phe Pro Gly Thr Arg Cys  
20

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 15

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

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

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 16  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 16  
 atggctgtcc tgggtgctgct cctctgcctg gtgacattcc caagctgtgt cctgtcc  
 57

<210> 17  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 17  
 caggtgcagc tgaagcagtc aggacctagc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccata  
 60

acctgcacag tctctgggttt ctcattaact aggtatgggtg tacactgggt tcgccagtct  
 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atttggagag gtggaagcac agactacaat  
 180

gcagctttca tgtccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt  
240

aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacact gccatatact actgtgccaa agaaagccta  
300

tttggggtct actatgatta cgggtactat tctatggact actgggggtca aggaacctca  
360

gtcaccgtct cctca  
375

<210> 18

<211> 66

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 18

atggacatga gggttcctgc tcacgttttt ggcttcttgt tgctctgggt tccaggtacc  
60

agatgt  
66

<210> 19

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 19

gacatccaaa tgaccagtc tccatcctcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt  
60

ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa gctgggttca gcagaaacca  
120

gatggaacta ttaaagcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa  
180

aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag ccttgagtct  
240

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatgctagtt atccgctcac gttcgggtgct  
300

gggaccaagc tggagctgaa a  
321

<210> 20  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 20  
gcgaagcttg ccgccaccat ggctgtcctg gtgctgctcc  
40

<210> 21  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 21  
gcgaagcttg ccgccaccat ggacatgagg gttcctgctc acg  
43

<210> 22  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 22  
gcggaattca tcatttacca ggagagtggg agaggc  
36

<210> 23  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
<223> Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 23

cgcggaattca ctaacactca ttctgttgga agctcttgac  
40

<210> 24

<211> 324

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 24

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu  
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val  
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys  
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro  
100 105 110

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

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser  
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu

```
<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
```

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptit tổng hợp

&lt;400&gt; 25

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

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 100 105

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Peptit tổng hợp

&lt;400&gt; 26

Arg Tyr Gly Val His  
 1 5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Peptit tổng hợp

&lt;400&gt; 27

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Ile | Trp | Arg | Gly | Gly | Ser | Thr | Asp | Tyr | Asn | Ala | Ala | Phe | Met | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Peptit tổng hợp

&lt;400&gt; 28

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ser | Leu | Phe | Gly | Val | Tyr | Tyr | Asp | Tyr | Gly | Tyr | Tyr | Ser | Met | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Tyr

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Peptit tổng hợp

&lt;400&gt; 29

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ala | Ser | Gln | Glu | Ile | Ser | Gly | Tyr | Leu | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Peptit tổng hợp

&lt;400&gt; 30

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser



1

5

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
 <223> Peptit tổng hợp

<400> 31

Leu Gln Tyr Ala Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 32  
 <211> 986  
 <212> PRT  
 <213> Khi nâu

<400> 32

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile  
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr  
 20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser  
 35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn  
 50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln  
 65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg  
 85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro  
 100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu  
 115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys  
 130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly  
 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu  
 165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile  
 180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val  
 195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser  
 210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys  
 225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro  
 245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu  
 260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala  
 275 280 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala  
 290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala  
 305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile  
 325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln  
 340 345 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys  
 355 360 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val  
 370 375 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile  
 385 390 395 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val  
 405 410 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val  
 420 425 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln  
 435 440 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro  
 450 455 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu  
 465 470 475 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg  
 485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His  
 500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu  
 515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala  
530 535 540

Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val  
545 550 555 560

Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr  
565 570 575

Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly  
580 585 590

Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala  
595 600 605

Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp Ala Ser Cys Ile Lys Ile Glu  
610 615 620

Lys Val Ile Gly Val Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly Arg Leu  
625 630 635 640

Lys Val Pro Gly Lys Arg Glu Ile Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys  
645 650 655

Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser  
660 665 670

Ile Met Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile His Leu Glu Gly Val  
675 680 685

Val Thr Lys Cys Lys Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn  
690 695 700

Gly Ser Leu Asp Ala Phe Leu Arg Lys Asn Asp Gly Arg Phe Thr Val  
705 710 715 720

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Gly Ser Gly Met Lys Tyr  
725 730 735

Leu Ser Asp Met Ser Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile  
 740 745 750

Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Met Ser  
 755 760 765

Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Ala Tyr Thr Thr Arg Gly Gly  
 770 775 780

Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys  
 785 790 795 800

Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu  
 805 810 815

Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp  
 820 825 830

Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Gly Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp  
 835 840 845

Cys Pro Ile Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Glu  
 850 855 860

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys  
 865 870 875 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Thr Glu Ser Ser  
 885 890 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala  
 900 905 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr  
 915 920 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val  
 930 935 940

His Val Asn Gln Glu Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr  
 945 950 955 960

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met  
 965 970 975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val  
 980 985

<210> 33  
 <211> 528  
 <212> PRT  
 <213> Khi nâu

<400> 33

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp  
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu  
 20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile  
 35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp  
 50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile  
 65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met  
 85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn  
 100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr  
 115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile

130                                      135                                      140  
 Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val  
                                     165                                      170                                      175  
 Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu  
                                     180                                      185                                      190  
 Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val  
                                     195                                      200                                      205  
 Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro  
                                     210                                      215                                      220  
 Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala  
                                     245                                      250                                      255  
 Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala  
                                     260                                      265                                      270  
 Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys  
                                     275                                      280                                      285  
 Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met  
                                     290                                      295                                      300  
 Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly  
                                     325                                      330                                      335  
 Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala

|                             |                         |                 |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|
| 340                         | 345                     | 350             |
| Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg | Pro Cys Gly Ser Gly     | Val His Tyr Thr |
| 355                         | 360                     | 365             |
| Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys | Thr Thr Lys Val Ser     | Ile Thr Asp Leu |
| 370                         | 375                     | 380             |
| Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr | Phe Glu Ile Trp Ala Val | Asn Gly Val     |
| 385                         | 390                     | 395             |
| Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro | Asp Gln Ser Val Ser Val | Thr Val Thr     |
| 405                         | 410                     | 415             |
| Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser | Ser Ile Ala Leu Val Gln | Ala Lys Glu     |
| 420                         | 425                     | 430             |
| Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala | Leu Ala Trp Leu Glu Pro | Asp Arg Pro     |
| 435                         | 440                     | 445             |
| Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr | Glu Val Lys Tyr Tyr     | Glu Lys Asp Gln |
| 450                         | 455                     | 460             |
| Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile | Val Arg Thr Ala Ala Arg | Asn Thr Asp     |
| 465                         | 470                     | 475             |
| Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu | Thr Ser Tyr Val Phe His | Val Arg Ala     |
| 485                         | 490                     | 495             |
| Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly | Asp Phe Ser Glu Pro Leu | Glu Val Thr     |
| 500                         | 505                     | 510             |
| Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg | Ile Ile Gly Asp Gly Ala | Asn Ser Thr     |
| 515                         | 520                     | 525             |

<210> 34  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens



&lt;400&gt; 34

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile  
 1 5 10 15

Cys Asp Ala

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 35

Met Ser Ala Leu Leu Ile Leu Ala Leu Val Gly Ala Ala Val Ala  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 547

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 36

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile  
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr  
 20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser  
 35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn  
 50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln  
 65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg  
 85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro  
 100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu  
 115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys  
 130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly  
 145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu  
 165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile  
 180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val  
 195 200 205

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser  
 210 215 220

Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys  
 225 230 235 240

Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro  
 245 250 255

Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu  
 260 265 270

Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala  
 275 280 285

Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala  
 290 295 300

Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala  
305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile  
325 330 335

Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln  
340 345 350

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys  
355 360 365

Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val  
370 375 380

His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile  
385 390 395 400

Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val  
405 410 415

Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val  
420 425 430

Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln  
435 440 445

Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro  
450 455 460

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu  
465 470 475 480

Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg  
485 490 495

Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His  
500 505 510

Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu  
 515 520 525

Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala  
 530 535 540

Asn Ser Thr  
 545

<210> 37  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile  
 1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr  
 20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser  
 35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn  
 50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln  
 65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg  
 85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro  
 100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu  
 115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys

130                                      135                                      140  
 Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu  
                                     165                                      170                                      175  
 Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile  
                                     180                                      185                                      190  
 Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val  
                                     195                                      200                                      205  
 Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser  
                                     210                                      215                                      220  
 Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro  
                                     245                                      250                                      255  
 Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu  
                                     260                                      265                                      270  
 Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala  
                                     275                                      280                                      285  
 Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala  
                                     290                                      295                                      300  
 Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro  
                                     325

<210> 38

<211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn  
 20 25 30

Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu  
 35 40 45

Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu  
 50 55 60

Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu  
 65 70 75 80

Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val  
 85 90 95

Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala  
 100 105 110

Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro  
 115 120 125

Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp  
 130 135 140

Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val  
 145 150 155 160

Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys  
 165 170 175

Gly Ser Gly Val His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr  
 180 185 190

Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu  
 195 200 205

Ile Trp Ala Val Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln  
 210 215 220

Ser Val Ser Val Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala  
 225 230 235

<210> 39  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu  
 1 5 10 15

Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro  
 20 25 30

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln  
 35 40 45

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp  
 50 55 60

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala  
 65 70 75 80

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

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr  
 100 105 110

<210> 40  
 <211> 96  
 <212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 40

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 41

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 42

<211> 98

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp



&lt;400&gt; 42

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

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

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

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

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

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

Ala Lys

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptit tổng hợp

&lt;400&gt; 43

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 1 5 10 15

Val Ser

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 44

Arg Phe Gly Val His  
1 5

<210> 45

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 45

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Ser Leu Phe Gly Val Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ser Met  
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 46  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>  
 <223> Polypeptit tổng hợp

<400> 46

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 Glu Ile Ser Gly Tyr  
 20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

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

<210> 47  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
                                   245                                  250                                  255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
                                   260                                  265                                  270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
                                   275                                  280                                  285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
                                   290                                  295                                  300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
                                   305                                  310                                  315                                  320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                                   325

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
                                   20                                  25                                  30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
                                   35                                  40                                  45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
                                   50                                  55                                  60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
   65                                  70                                  75                                  80

|       |                   |
|-------|-------------------|
| <210> | 52                |
| <211> | 33                |
| <212> | ADN               |
| <213> | Trình tự Nhân tạo |

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 52

cgcgctccc aggagatctc tggctacctg tcc

33

<210> 53

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 53

gctgcctcca ccctggactc t

21

<210> 54

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 54

ctgcagtagc cttcctatcc actgacc

27

<210> 55

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 55

caggtgcagc tgggtggagag cggaggagga gtgggtgcagc ctggcaggtc cctgaggctg

60

agctgtgccg tgtccggctt cagcctgaca agatttggag tgcattgggt gcgccaggct

120

ccaggcaagg gactggagtg ggtggccgtg atctggaggg gaggatccac cgactacaac

180

gctgctttta tgagccggct gacaatctct aaggataact ccaagaatac cgtgtatctg  
240

cagatgaact ccctgagggc tgaggacacc gccgtgtact attgcgccaa ggagagcctg  
300

ttcggcgtgt actatgacta cggctactat tctatggatt attggggcca gggcaccaca  
360

gtgacagtgt cctcc  
375

<210> 56

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 56

gatatccaga tgacacagtc cccttcacgc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc  
60

atcacatgtc gcgcctccca ggagatctct ggctacctgt cctggctgca gcagaagcca  
120

ggcaaggctc ccaagcgcct gatctatgct gcctccaccc tggactctgg agtgccttcc  
180

aggttcagcg gctctcggtc cggcacagag tacaccctga caatctcttc cctgcagcct  
240

gaggatttcg ccacctacta ttgcctgcag tacgcttctt atccactgac ctttggcggc  
300

ggcacaaagg tggagatcaa g  
321

<210> 57

<211> 978

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 57

gcctccacca agggaccatc cgtgttccca ctggcccat cttcccgag cacatctgag



60

tccaccgccg ctctgggctg tctggtgaag gattacttcc ctgagccagt gacagtgtct  
120

tggaaactccg gcgctctgac atccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagagctct  
180

ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtgacc gtgccctctt ccaatttcgg caccagaca  
240

tatactgca acgtggacca taagccttcc aatacaaagg tggataagac cgtggagaga  
300

aagagctgcg tggagtgtcc accttgccca gctccaccag ccgctgcccc tagcgtgttc  
360

ctgtttcctc caaagccaaa ggacacactg atgatctctc gcacaccoga ggtgacctgc  
420

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggatcca gaggtgcagt ttaactggta cgtggatggc  
480

gtggaggtgc ataatgctaa gaccaagccc agggaggagc agttcaactc cacatttcgg  
540

gtggtgagcg tgctgaccgt ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtataagtgt  
600

aaggtgagca ataagggcct gcccgccctt atcgagaaga caatctctaa gaccaagggc  
660

cagcctagag agccacaggt gtacaccctg ccccttctc gcgaggagat gacaaagaac  
720

caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc ttctatccta gcgacatcgc tgtggagtgg  
780

gagtctaattg gccagccaga gaacaattac aagaccacac caccatgct ggacagcgat  
840

ggctctttct ttctgtattc taagctgaca gtggataagt ccaggtggca gcagggcaac  
900

gtgttttagct gctctgtgat gcatgaggcc ctgcacaatc attacacca gaagtccttg  
960

agcctgtctc caggcaag  
978

&lt;210&gt; 58

<211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự Nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Polynucleotit tổng hợp"  
  
 <400> 58  
 aggacagtgg ccgctccatc cgtgttcac tttcccccta gcgacgagca gctgaagagc  
 60  
  
 ggcaccgcct ctgtggtgtg cctgctgaac aatttctacc ccagggaggc caaggtgcag  
 120  
  
 tggaaggtgg ataacgctct gcagagcggc aattctcagg agtccgtgac cgagcaggac  
 180  
  
 agcaaggatt ctacatattc cctgagctct accctgacac tgagcaaggc cgattacgag  
 240  
  
 aagcacaagg tgtatgcttg cgaggtgacc catcagggcc tgtccagccc agtgacaaag  
 300  
  
 tcttttaaca ggggcgagtg t  
 321

<210> 59  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự Nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Polypeptit tổng hợp  
  
 <400> 59

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Ser Leu Phe Gly Val Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Tyr Ser Met  
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Arg Ser Thr Ser  
130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys  
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu  
210 215 220

Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala  
225 230 235 240

Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe  
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile  
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445

Pro Gly Lys  
 450

<210> 60  
 <211> 214  
 <212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 60

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 Glu Ile Ser Gly Tyr  
20 25 30

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

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

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

180

185

190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 1353

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự Nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polynucleotit tổng hợp"

&lt;400&gt; 61

caggtgcagc tgggtggagag cggaggagga gtggtgcagc ctggcaggtc cctgaggctg  
 60

agctgtgccg tgtccggctt cagcctgaca agatttggag tgcattgggt gcgccaggct  
 120

ccaggcaagg gactggagtg ggtggccgtg atctggaggg gaggatccac cgactacaac  
 180

gctgctttta tgagccggct gacaatctct aaggataact ccaagaatac cgtgtatctg  
 240

cagatgaact ccctgagggc tgaggacacc gccgtgtact attgcgcca ggagagcctg  
 300

ttcggcgtgt actatgacta cggctactat tctatggatt attggggcca gggcaccaca  
 360

gtgacagtgt cctccgcctc caccaagga ccatccgtgt tccactggc cccatcttcc  
 420

cggagcacat ctgagtccac cgccgctctg ggctgtctgg tgaaggatta cttccctgag  
 480

ccagtgcagc tgtcttggaa ctccggcgct ctgacatccg gcgtgcacac ctttcctgcc  
 540

gtgctgcaga gctctggcct gtacagcctg tccagcgtgg tgaccgtgcc ctcttccaat  
 600

ttcggcacc agacatatac ctgcaacgtg gaccataagc cttccaatac aaaggtggat  
 660

aagaccgtgg agagaaagag ctgcgtggag tgtccacott gccagctcc accagccgct  
720

gccctagcg tgttctgtt tcctccaaag ccaaaggaca cactgatgat ctctgcaca  
780

cccaggtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg atccagaggt gcagtttaac  
840

tggtagctgg atggcgtgga ggtgcataat gctaagacca agcccaggga ggagcagttc  
900

aactccacat ttcgggtggt gagcgtgctg accgtggtgc accaggactg gctgaacggc  
960

aaggagtata agtgtaaggt gagcaataag ggccctgccg cccctatcga gaagacaatc  
1020

tctaagacca agggccagcc tagagagcca caggtgtaca ccctgcccc ttctcgcgag  
1080

gagatgacaa agaaccaggt gtccctgacc tgccctggtga agggcttcta tcctagcgac  
1140

atcgctgtgg agtgggagtc taatggccag ccagagaaca attacaagac cacaccaccc  
1200

atgctggaca gcgatggctc tttctttctg tattctaagc tgacagtgga taagtccagg  
1260

tggcagcagg gcaacgtgtt tagctgctct gtgatgcatg aggccctgca caatcattac  
1320

accagaagt ccctgagcct gtctccaggc aag  
1353

<210> 62

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit tổng hợp"

<400> 62

gatatccaga tgacacagtc cccttccagc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc  
60

atcacatgtc ggcctccca ggagatctct ggctacctgt cctggctgca gcagaagcca  
120

ggcaaggctc ccaagcgctt gatctatgct gcctccaccc tggactctgg agtgccttcc  
180

aggttcagcg gctctcggtc cggcacagag tacaccctga caatctcttc cctgcagcct  
240

gaggatttcg ccacctacta ttgcctgcag tacgcttcct atccactgac ctttggcggc  
300

ggcaciaaagg tggagatcaa gaggacagtg gccgctccat ccgtgttcat ctttccccct  
360

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tctgtggtgt gcctgctgaa caatttctac  
420

cccaggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gataacgctc tgcagagcgg caattctcag  
480

gagtccgtga ccgagcagga cagcaaggat tctacatatt ccctgagctc taccctgaca  
540

ctgagcaagg ccgattacga gaagcacaag gtgtatgctt gcgaggtgac ccatcagggc  
600

ctgtccagcc cagtgacaaa gtcttttaac aggggcgagt gt  
642