



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

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



1-0048479

(51)^{2010.01} C07K 16/28; C12N 5/077; C12N 15/13; (13) B
C12N 1/15; C12N 1/19

(21) 1-2019-06458

(22) 29/05/2018

(86) PCT/JP2018/020581 29/05/2018

(87) WO 2018/221521 A1 06/12/2018

(30) 2017-106529 30/05/2017 JP

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/06/2020 387A

(73) TEIJIN PHARMA LIMITED (JP)

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

(72) EGUCHI, Hiroshi (JP); TANOKURA, Akira (JP); TAKAGI, Kenichiro (JP); KATO, Hirotsugu (JP); YAMAMURA, Satoshi (JP); NAMIKI, Naoko (JP).

(74) Văn phòng Luật sư MINERVAS (MINERVAS)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG THỤ THỂ YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG TƯƠNG TỰ
INSULIN DẠNG I (IGF-I), QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2019-06458

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I (IGF-I) mà liên kết riêng với thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I của động vật có xương sống và có hoạt tính gây ra sự tăng sinh của tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống, hoặc đoạn của nó, hoặc các dẫn xuất của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I là yếu tố tăng trưởng tương tự insulin được tiết ra chủ yếu từ gan, và ảnh hưởng thụ thể IGF-I và bằng cách đó thể hiện nhiều chức năng sinh lý trong các cơ quan khác nhau. Do đó, IGF-I được kỳ vọng sẽ được sử dụng để điều trị nhiều loại bệnh. Do trình tự axit amin của IGF-I có độ tương tự cao khoảng 40% so với tiền insulin, nên IGF-I có thể liên kết với thụ thể insulin và bằng cách đó thể hiện những hiệu quả tương tự insulin (Tài liệu phi sáng chế 1). Ngoài ra, do trình tự axit amin của thụ thể IGF-I có độ tương tự cao khoảng 60% so với thụ thể insulin, những thụ thể này có thể tạo thành heterodime (Tài liệu phi sáng chế 1). Insulin có thể hoạt động trên thụ thể insulin bằng cách đó thể hiện hiệu quả cao trong việc hạ mức đường huyết, và do đó được sử dụng như một loại thuốc hạ đường huyết.

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

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

3. Hiệu quả sinh lý của IGF-I

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

Với hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng, IGF-I được biết đến trong việc thúc đẩy khả năng tổng hợp DNA của các tế bào sụn người. Điều được biết đến là việc đưa IGF-I vào cơ thể một con chuột đã cắt bỏ tuyến yên cũng làm tăng trọng lượng cũng như chiều dài xương đùi của nó (Tài liệu phi sáng chế 5).

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

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

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

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

Myostatin, một yếu tố kiểm soát tiêu cực của sự hình thành cơ xương, ảnh hưởng đến thụ thể activin dạng II (ActRII) bằng cách đó ức chế Akt/mTOR (Các tài liệu phi sáng chế 13 và 15).

LY2495655, một kháng thể kháng myostatin, làm tăng khối lượng cơ của các bệnh nhân mà đã được phẫu thuật thay thế toàn bộ khớp háng và các bệnh nhân này là người cao tuổi (Các tài liệu phi sáng chế 16 và 17).

Bimagrumab, một kháng thể kháng ActRII, làm tăng khối lượng cơ của bệnh nhân mắc bệnh thần kinh cơ (Tài liệu phi sáng chế 18).

Tuy nhiên, cho đến nay chưa có một loại thuốc nào mà thúc đẩy sự hình thành cơ xương và bằng cách đó có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng có nhu cầu.

6. Các sản phẩm có trước dùng để thúc đẩy sự tăng trưởng

Sự tạo thành hormon tăng trưởng tái tổ hợp ở người (GH) kích hoạt thụ thể GH và gây ra sự bài tiết IGF-I, bằng cách đó thể hiện các hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng. Tuy nhiên, do sự tạo thành đòi hỏi việc đưa vào một lần mỗi ngày qua việc tiêm dưới da, nên điều này thường dẫn đến việc khó tuân thủ chỉ dẫn dùng thuốc (ví dụ, quên uống thuốc) và dẫn đến việc giảm các hiệu quả tăng trưởng (Tài liệu phi sáng chế 19). Đã có sự nỗ lực không ngừng để phát triển sự tạo thành GH hoạt động lâu dài với động năng được cải thiện mà sẽ được đưa vào mỗi lần một tuần hoặc hai tuần.

Tuy nhiên, cho đến nay chưa có loại thuốc nào mà thể hiện các hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng và bằng cách đó có thể được sử dụng trong việc điều trị đối tượng có nhu cầu với sự tuân thủ chỉ dẫn dùng thuốc được cải thiện. Ngoài ra, sự tạo thành GH đã được phát hiện cho thấy các hiệu quả tăng trưởng giảm ở các bệnh nhân có thụ thể GH bất thường với độ nhạy với sự hoạt hóa thụ thể GH giảm, hoặc các bệnh nhân kháng sự điều trị GH (Tài liệu phi sáng chế 20).

IGF-I là chất điều trị duy nhất mà có hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng ở bệnh nhân có độ nhạy với sự hoạt hóa thụ thể GH giảm, do nó hoạt động ở hướng ngược dòng vị trí bất kỳ của thụ thể GH. Tuy nhiên, sự tạo thành IGF-I là một giải pháp đưa vào ngoài đường tiêu hóa hai lần mỗi ngày và do đó dẫn đến việc khó tuân thủ chỉ dẫn dùng thuốc. Ngoài ra, điều này đã được chứng minh là dẫn đến việc hạ đường huyết như một tác dụng phụ (Tài liệu phi sáng chế 21). Cho đến nay

chưa có một loại thuốc nào mà có việc tuân thủ chỉ dẫn dùng thuốc được cải thiện và giảm sự xuất hiện của việc hạ đường huyết hơn IGF-I và có thể được sử dụng như một chất điều trị thay thế.

7. Hiệu quả hạ đường huyết của IGF-I

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

Đã có báo cáo rằng hiệu quả giảm glucoza của IGF-I dẫn đến việc hạ đường huyết như một tác dụng phụ lâm sàng (Tài liệu phi sáng chế 21). Tương tự, việc đưa IGF-I vào người dẫn đến việc hạ đường huyết. Do đó, ở giai đoạn bắt đầu của việc điều trị bằng IGF-I, điều cần thiết là duy trì sự kiểm soát liều lượng bắt đầu từ liều lượng thấp với sự xem xét các nghiên cứu lâm sàng khác nhau bao gồm cả mức đường huyết sau khi đưa vào (Tài liệu phi sáng chế 5).

IGF-I thể hiện hiệu quả hạ đường huyết thông qua việc thúc đẩy sự phosphoryl hóa Akt, mà là một tín hiệu ngược dòng của thụ thể IGF-I. Một biến thể hoạt hóa Akt cải thiện việc hấp thụ glucoza bởi các tế bào 3T3-L1 (Tài liệu phi sáng chế 22). Mặt khác, một con chuột thiếu hụt Akt2 thể hiện mức đường huyết cao (Tài liệu phi sáng chế 23). Chất ức chế Akt ngăn cản việc hấp thụ glucoza gây ra bởi insulin ở các tế bào có nguồn gốc cơ chuột (Tài liệu phi sáng chế 24). IGF-I cũng được biết đến để kích hoạt thụ thể insulin mà đóng một phần vai trò trong hiệu quả hạ đường huyết. Các kết quả nghiên cứu này đề xuất hiệu quả hạ đường huyết của IGF-I bao gồm việc hoạt hóa quá độ Akt và hoạt hóa thụ thể insulin.

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

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

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

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

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

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

IGF-I được biết đến là có ảnh hưởng tới nhiều cơ quan khác nhau và sử dụng rộng rãi nhiều chức năng sinh lý (Tài liệu phi sáng chế 21).

IGF-I đã được báo cáo là có hiệu quả bảo vệ thần kinh ở hệ thống thần kinh trung ương bằng việc bảo vệ ty thể và hiệu quả chống oxy hóa thông qua sự hoạt hóa thụ thể IGF-I (Các tài liệu phi sáng chế 26 và 27). IGF-I tăng cường sự tái tạo của các sợi trục thần kinh bị tổn thương (Tài liệu phi sáng chế 28).

IGF-I là yếu tố chính của sự thúc đẩy tăng trưởng (Các tài liệu phi sáng chế 29 và 30). Trên thực tế, mecaseprin, một IGF-I tái tổ hợp ở người, về phương diện lâm sàng được sử dụng như thuốc cho việc điều trị bệnh lùn.

IGF-I có vẻ như có hiệu quả trong việc điều trị xơ gan, mà phát triển từ tổn thương gan và bệnh gan mãn tính và bao gồm xơ hóa gan. Việc đưa IGF-I vào đã cải thiện xơ hóa gan ở động vật mô hình mắc xơ gan (Tài liệu phi sáng chế 31).

IGF-I cũng được biết đến với vai trò trong sự phát triển và các chức năng của thận. IGF-I có hiệu quả bảo vệ đối với mất cân bằng oxy hóa và chết rụng tế bào do ngộ độc glucoza trong các tế bào gian mao mạch của thận (Tài liệu phi sáng chế 32). IGF-I được kỳ vọng như thuốc cho việc điều trị bệnh thận.

Ví dụ về các điều kiện bệnh lý được kỳ vọng sẽ được cải thiện thông qua việc đưa IGF-I vào bao gồm: bệnh lùn, hội chứng Laron, xơ gan, xơ hóa gan, lão hóa, ức chế tăng trưởng nội tử cung (IUGR), bệnh thần kinh, đột quỵ não, chấn thương cột sống, bảo vệ tim mạch, đái tháo đường, kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, bệnh thận, loãng xương, xơ hóa bàng quang, chữa lành vết thương, loạn dưỡng tăng trưởng cơ lực, giảm cơ gắn với AIDS, hội chứng tái phân bố chất béo gắn với HIV, bệnh Crohn, hội chứng Werner, bệnh suy giảm miễn dịch kết hợp liên quan đến giới gen X, mất thính giác, chứng chán ăn tâm thần, và bệnh vồng mạc của trẻ sinh non (Tài liệu phi sáng chế 21).

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

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

Thông thường, các công thức kháng thể có chu kỳ bán rã dài, và được chứng minh là hiệu quả khi đưa vào một đến hai lần một tháng. Mặc dù một số các kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I được báo cáo là hiệu quả trong việc hoạt hóa thụ thể trong ống nghiệm, không có kháng thể nào được báo cáo là thể hiện hoạt tính chủ vận đối với thụ thể IGF-I trong ống nghiệm (Các tài liệu phi sáng chế 33 đến 37).

Cụ thể, các kháng thể 3B7 và 2D1 tăng cường sự tổng hợp ADN tế bào trong ống nghiệm (Tài liệu phi sáng chế 34).

Các kháng thể 11A1, 11A4, 11A11, và 24-57 tăng cường sự phosphoryl hóa tyrosin của thụ thể IGF-I trong ống nghiệm (Tài liệu phi sáng chế 35).

Các kháng thể 16-13, 17-69, 24-57, 24-60, 24-31, và 26-3 được chứng minh là hiệu quả trong sự thúc đẩy tổng hợp ADN tế bào và hấp thụ glucoza trong ống nghiệm, và có tiềm năng thể hiện hiệu quả hạ đường huyết (Các tài liệu phi sáng chế 36 và 37).

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

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

Đã có những thử nghiệm để sử dụng kháng thể mà liên kết với thụ thể IGF-I cho việc điều trị các bệnh ác tính, dựa trên hiệu quả đối vận của IGF-I trong việc ngăn cản sự liên kết của IGF-I với thụ thể IGF-I. Tuy nhiên, các kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I hiện tại có nhiều tác dụng phụ như tăng đường huyết trong điều trị đơn thức (Tài liệu phi sáng chế 38), và thể hiện tác động tăng huyết áp khi

được sử dụng kết hợp với các chất chống ung thư khác (Tài liệu phi sáng chế 39). Theo đó, các ứng dụng điều trị của IGF-I được kỳ vọng sẽ được giới hạn.

Danh sách tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

[Tài liệu sáng chế 1] Use of PEGylated Igf-I Variants for the Treatment of Neuromuscular Disorders, JP2011-518778A (WO2009/121759A) (2011)

Tài liệu phi sáng chế

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

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

[Tài liệu phi sáng chế 3] Bailyes, E.M., et al., Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J*, 1997. 327 (Pt 1): trang 209-15.

[Tài liệu phi sáng chế 4] Pandini, G., et al., Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*, 2002. 277(42): trang 39684-95.

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

[Tài liệu phi sáng chế 6] Fukushima, T., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity bound to insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, which is continuously sustained by IGF-I stimulation, is required for IGF-I-induced cell proliferation. *J Biol Chem*, 2012. 287(35): trang 29713-21.

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

[Tài liệu phi sáng chế 8] Boonen, S., et al., Musculoskeletal effects of the recombinant human IGF-I/IGF binding protein-3 complex in osteoporotic patients with proximal femoral fracture: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(4): trang 1593-9.

[Tài liệu phi sáng chế 9] Barton-Davis, E.R., et al., Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(26): trang 15603-7.

[Tài liệu phi sáng chế 10] Lamberts, S.W., A.W. van den Beld, and A.J. van der Lely, The endocrinology of aging. *Science*, 1997. 278(5337): trang 419-24.

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

[Tài liệu phi sáng chế 12] Temel, J.S., et al., Anamorelin in patients with non-small-cell lung cancer and cachexia (ROMANA 1 and ROMANA 2): results from two randomized, double-blind, phase 3 trials. *Lancet Oncol*, 2016. 17(4): trang 519-31.

[Tài liệu phi sáng chế 13] Glass, D.J., Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. 13(3): trang 225-9.

[Tài liệu phi sáng chế 14] Lee, S.J. and A.C. McPherron, Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(16): trang 93

06-11.

[Tài liệu phi sáng chế 15] Amirouche, A., et al., Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*, 2009. 150(1): trang 286-94.

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

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

[Tài liệu phi sáng chế 18] Amato, A.A., et al., Treatment of sporadic inclusion body myositis with bimagrumab. *Neurology*, 2014. 83(24): trang 2239-46.

[Tài liệu phi sáng chế 19] Cutfield, W. S., et al., Non-compliance with growth hormone treatment in children is common and impairs linear growth. *PLoS One.*, 2011.6(1):e16223

[Tài liệu phi sáng chế 20] Bang, P., et al., Identification and management of poor response to growth-promoting therapy in children with short stature. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2012.77(2): trang 169-181.

[Tài liệu phi sáng chế 21] Puche, J.E. and I. Castilla-Cortazar, Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J Transl Med*, 2012. 10: trang 224.

[Tài liệu phi sáng chế 22] Kohn, A.D., et al., Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*, 1996. 271(49): trang 31372-8.

[Tài liệu phi sáng chế 23] Cho, H., et al., Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 2001. 292(5522): trang 1728-31.

[Tài liệu phi sáng chế 24] Green, C.J., et al., Use of Akt inhibitor and a drug-resistant mutant validates a critical role for protein kinase B/Akt in the insulin-dependent regulation of glucose and system A amino acid uptake. *J Biol Chem*, 2008. 283(41): trang 27653-67.

[Tài liệu phi sáng chế 25] Submission for marketing application to FDA, APPLICATION NUMBER, 21-884

[Tài liệu phi sáng chế 26] Garcia-Fernandez, M., et al., Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology*, 2008. 149(5): trang 2433-42.

[Tài liệu phi sáng chế 27] Puche, J.E., et al., Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology*, 2008. 149(5): trang 2620-7.

[Tài liệu phi sáng chế 28] Joseph D'Ercole, A. and TRANGYe, Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology*, 2008. 149(12): trang 5958-62.

[Tài liệu phi sáng chế 29] Abuzzahab, M.J., et al., IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med*, 2003. 349(23): trang 2211-22.

[Tài liệu phi sáng chế 30] Woods, K.A., et al., Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*, 1996. 335(18): trang 1363-7.

[Tài liệu phi sáng chế 31] Perez, R., et al., Mitochondrial protection by low doses of insulin-like growth factor- I in experimental cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(17): trang 2731-9.

[Tài liệu phi sáng chế 32] Kang, B.P., et al., IGF-I inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. 285(5): trang F1013-24.

[Tài liệu phi sáng chế 33] Bhaskar, V., et al., A fully human, allosteric monoclonal antibody that activates the insulin receptor and improves glycemic control. *Diabetes*, 2012. 61(5): trang 1263-71.

[Tài liệu phi sáng chế 34] Xiong, L., et al., Growth-stimulatory monoclonal antibodies against human insulin-like growth factor I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(12): trang 5356-60.

[Tài liệu phi sáng chế 35] Runnels, H.A., et al., Human monoclonal antibodies to the insulin-like growth factor 1 receptor inhibit receptor activation and tumor growth in preclinical studies. *Adv Ther*, 2010. 27(7): trang 458-75.

[Tài liệu phi sáng chế 36] Soos, M.A., et al., A panel of monoclonal antibodies for the type I insulin-like growth factor receptor. Epitope mapping, effects on ligand binding, and biological activity. *J Biol Chem*, 1992. 267(18): trang 12955-63.

[Tài liệu phi sáng chế 37] Kato, H., et al., Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor.

Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). J Biol Chem, 1993. 268(4): trang 2655-61.

[Tài liệu phi sáng chế 38] Atzori, F., et al., A Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Dalotuzumab (MK-0646), an Anti-Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Monoclonal Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors. Clin Cancer Res., 2011.17(19): trang 6304-12.

[Tài liệu phi sáng chế 39] de Bono J.S., et al., Phase II randomized study of figitumumab plus docetaxel and docetaxel alone with crossover for metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res., 2014.20(7): trang 1925-34.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó mà có liên kết riêng với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất kháng thể mà gia tăng khối lượng cơ hoặc độ dày của sụn đĩa đệm tăng trưởng qua thụ thể IGF-I mà không gây ra mức đường huyết.

Giải pháp cho vấn đề

Sáng chế liên quan đến các nội dung sau đây:

Điểm [1] Kháng thể kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I (kháng thể kháng thụ thể IGF-I) hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó mà liên kết riêng với thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I thuần chủng ở người (thụ thể IGF-I thuần chủng ở người) có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 2 ở điểm liên kết chứa axit amin tại vị trí 315 và 316 trong

trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2, và thể hiện hoạt tính gây ra sự tăng trưởng của tế bào có nguồn gốc từ người.

Điểm [2] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm [1], mà liên kết với epitop có chứa ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet trong trình tự của miền CR của thụ thể IGF-I.

Điểm [3] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [2], mà liên kết riêng với một thụ thể IGF-I thuần chủng của động vật được chọn từ khi, thỏ, chuột lang, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột to, hoặc chuột nhắt tại epitop có chứa ProSerGlyPheIleArgAsnX₁X₂GlnSerMet (trong đó X₁ biểu thị Gly hoặc Ser và X₂ biểu thị Ser hoặc Thr) trong trình tự axit amin của miền CR của thụ thể IGF-I của động vật này, và thể hiện hoạt tính gây ra sự tăng trưởng của tế bào của động vật này.

Điểm [4] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [3], mà có khả năng phản ứng chéo với thụ thể IGF-I của người hoặc động vật không phải người bao gồm chuột lang, khi, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột to, hoặc chuột nhắt.

Điểm [5] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [4], mà gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với cường độ ái lực ở hằng số phân ly cân bằng (KD) 1×10^{-8} M hoặc thấp hơn.

Điểm [6] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [2] đến [5], mà có ít nhất một trong các dấu hiệu sau:

1) thể hiện hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống;

2) thể hiện hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài của cơ thể của động vật có xương sống;

3) không gây ra sự hấp thụ glucoza bởi các tế bào cơ khác biệt khi đưa vào cơ thể với liều lượng đủ để gây ra sự tăng trưởng của tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống; và

4) không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống với liều lượng đủ để gây ra sự gia tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể của động vật có xương sống.

Điểm [7] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [2] đến [6], mà có ít nhất một trong các dấu hiệu sau:

1) ngăn cản sự tăng trưởng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống gây ra bởi IGF-I;

2) ngăn cản sự tăng sinh tế bào gây ra bởi IGF-I ở động vật có xương sống bị mắc bệnh tăng sinh tế bào;

3) không ảnh hưởng đến việc hấp thụ glucoza bởi các tế bào cơ khác biệt với liều lượng đủ để ngăn cản sự tăng trưởng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống gây ra bởi IGF-I; và

4) không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống bị bệnh tăng sinh tế bào với liều lượng đủ để ngăn cản sự tăng sinh tế bào gây ra bởi IGF-I ở động vật có xương sống.

Điểm [8] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [7], mà là Fab, scFv, kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đồng đặc hiệu, hoặc dẫn xuất của chúng.

Điểm [9] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [8], bao gồm trình tự axit amin chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-1 (CDR-H1), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 3 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-2 (CDR-H2), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 4 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-3 (CDR-H3), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 5 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-1 (CDR-L1), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 6 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-2 (CDR-L2), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 7 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-3 (CDR-L3), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8 hoặc một trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 8 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin.

Điểm [10] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm [9] chứa thêm chuỗi khung của globulin miễn dịch.

Điểm [11] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm [10], trong đó chuỗi khung của globulin miễn dịch là chuỗi khung của mỗi lớp globulin miễn dịch ở người hoặc động vật không phải người bao gồm chuột lang, khỉ, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột nhắt, hoặc chuột lớn.

Điểm [12] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [11], mà gồm một trình tự axit amin chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng, có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 9 hoặc trình tự axit amin có độ tương tự 90% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 9; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 10 hoặc trình tự axit amin có độ tương tự 90% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 10.

Điểm [13] Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [12] chứa thêm một vùng ổn định của mỗi lớp globulin miễn dịch ở người hoặc động vật không phải con người bao gồm chuột lang, khỉ, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột nhắt, hoặc chuột lớn.

Điểm [14] Phân tử axit nucleic bao gồm chuỗi polynucleotit mã hóa kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [13].

Điểm [15] Vector nhân dòng hoặc vector biểu hiện chứa ít nhất một phân tử axit nucleic theo điểm [14].

Điểm [16] Tế bào tái tổ hợp có nguồn gốc từ tế bào chủ thông qua sự chuyển nhiễm của vector theo điểm [19].

Điểm [17] Quy trình sản xuất kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [13], bao gồm:

nuôi cấy tế bào tái tổ hợp theo điểm [16]; và

tinh chế kháng thể kháng thụ thể IGF-I, hoặc đoạn, hoặc dẫn xuất được sản xuất từ tế bào tái tổ hợp.

Điểm [18] Dược phẩm chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [13], phân tử axit nucleic theo điểm [14], vector theo điểm [15], hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm [16].

Điểm [19] Dược phẩm theo điểm [18], chứa thêm thành phần hoạt tính phụ gia khác ngoài kháng thể kháng thụ thể IGF-I, hoặc đoạn, hoặc dẫn xuất theo điểm

bất kỳ trong số các điểm [1] đến [13], phân tử axit nucleic theo điểm [14], vector theo điểm [15], hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm [16].

Điểm [20] Dược phẩm theo điểm [19], trong đó thành phần hoạt tính là một hoặc nhiều thành phần được lựa chọn từ hormon tăng trưởng hoặc chất tương tự của chúng, insulin hoặc chất tương tự của chúng, IGF-II hoặc chất tương tự của chúng, kháng thể kháng myostatin, chất đối vận myostatin, kháng thể thụ thể loại IIB kháng activin, chất đối vận thụ thể loại IIB activin, thụ thể loại IIB activin có thể hòa tan hoặc chất tương tự của chúng, ghrelin hoặc chất tương tự của chúng, follistatin hoặc chất tương tự của chúng, chất chủ vận beta-2, và chất điều biến thụ thể hormon nam chọn lọc.

Điểm [21] Dược phẩm theo điểm [19] hoặc [20], trong đó thành phần hoạt tính chứa một thành phần được lựa chọn từ nhóm bao gồm: corticosteroid, thuốc chống nôn mửa, hydroclorua ondansetron, hydroclorua granisetron, metoclopramid, domperidon, haloperidol, cyclizin, lorazepam, prochlorperazin, dexametason, levomepromazin, tropisetron, vắc-xin ung thư, chất ức chế GM-CSF, vắc-xin DNA GM-CSF, vắc-xin trên cơ sở tế bào, vắc-xin tế bào đuôi gai, vắc-xin virus tái tổ hợp, vắc-xin protein sốc nhiệt (HSP), vắc-xin u đồng đẳng, vắc-xin nguyên bào nhiễm, chất giảm đau, ibuprofen, naproxen, cholin magie trisalicilat, oxycodon hydroclorua, chất ức chế tạo mạch máu mới, chất chống đông máu, kháng thể kháng PD-1, nivolumab, pembrolizumab, kháng thể kháng PD-L1, atezolizumab, kháng thể kháng CTLA4, ipilimumab, kháng thể kháng CD20, rituximab, kháng thể kháng HER2, trastuzumab, kháng thể kháng CCR4, mogamulizumab, kháng thể kháng VEGF, bevacizumab, kháng thể kháng thụ thể VEGF, đoạn thụ thể VEGF có thể hòa tan, kháng thể kháng TWEAK, kháng thể kháng thụ thể TWEAK, đoạn thụ thể TWEAK có thể hòa tan, AMG 706, AMG

386, chất chống tăng sinh, chất ức chế enzyme truyền protein farnesyl, chất ức chế alpha v beta 3, chất ức chế alpha v beta 5, chất ức chế p53, chất ức chế thụ thể Kit, chất ức chế thụ thể ret, chất ức chế PDGFR, chất ức chế bài tiết hormon tăng trưởng, chất ức chế angiopoietin, chất ức chế đại thực bào thâm nhiễm khối u, chất ức chế c-fms, kháng thể kháng c-fms, chất ức chế CSF-1, kháng thể kháng CSF-1, đoạn c-fms có thể hòa tan, pegvisomant, gemcitabine panitumumab, irinotecan, và SN-38.

Điểm [22] Thuốc y tế để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng gắn liền với IGF-I hoặc IGF-II, chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [13], phân tử axit nucleic theo điểm [14], vector theo điểm [15], hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm [16].

Điểm [23] Phương pháp nuôi cấy các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống trong ống nghiệm, bao gồm việc cho tiếp xúc tế bào có nguồn gốc từ động vật với kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm [1] đến [13], phân tử axit nucleic theo điểm [14], vector theo điểm [15], và tế bào tái tổ hợp theo điểm [16] khi nuôi cấy các tế bào.

Điểm [24] Phương pháp theo điểm [23], trong đó việc cho tiếp xúc đã nêu được thực hiện nhằm mục đích thúc đẩy tăng trưởng hoặc gây ra sự khác biệt của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống.

Điểm [25] Phương pháp theo điểm [23] hoặc [24], trong đó kháng thể kháng thụ thể IGF-I, đoạn, hoặc dẫn xuất được hấp phụ bởi, hoặc được giữ cố định với pha rắn.

Hiệu quả của sáng chế

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

Fig. 2 là biểu đồ biểu thị các kết quả của xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) với việc sử dụng các biến thể của epitop giả định của IGF11-16;

Fig. 3 là biểu đồ biểu thị hoạt tính tăng trưởng của nguyên bào cơ ở người sau khi loại bỏ IGF11-16 và IGF-I;

Fig. 4 là biểu đồ biểu thị hiệu quả hấp thụ glucoza bởi các tế bào cơ khác biệt ở người sau khi bổ sung IGF11-16 và IGF-I;

Fig. 5 là biểu đồ biểu thị trọng lượng của các cơ đuôi dài các chân ở chuột lang mà nhận sự đưa vào liên tục của IGF-I bằng việc sử dụng bơm thẩm thấu trong vòng 2 tuần hoặc đưa một liều IGF11-16 duy nhất vào dưới da hoặc tĩnh mạch 2 tuần trước;

Fig. 6 là biểu đồ biểu thị sự tiến triển theo thời gian của mức đường huyết của chuột lang trong điều kiện nhịn ăn sau khi đưa vào một liều IGF-I duy nhất dưới da;

Fig. 7 là biểu đồ biểu thị sự tiến triển theo thời gian của mức đường huyết của chuột lang trong điều kiện nhịn ăn sau khi đưa vào một liều IGF11-16 duy nhất dưới da;

Fig. 8 là biểu đồ biểu thị sự tiến triển theo thời gian của mức đường huyết của chuột lang trong điều kiện nhịn ăn sau khi đưa vào một liều IGF11-16 duy nhất theo đường tĩnh mạch;

Fig. 9 là biểu đồ biểu thị các hiệu quả của IGF11-16 trong việc làm tăng độ dày của sụn đĩa đệm tăng trưởng của chuột lang bị cắt bỏ tuyến yên (HPX);

Fig. 10 là biểu đồ biểu thị các hiệu quả của IGF11-16 trong việc làm tăng độ dài của xương chày trong chuột lang bị cắt bỏ tuyến yên (HPX);

Fig. 11 là biểu đồ biểu thị các động lực học máu của IGF-I của chuột lang trong điều kiện nhịn ăn sau khi đưa vào một liều duy nhất dưới da; và

Fig. 12 là biểu đồ biểu thị các động lực học máu của IGF11-16 của chuột lang trong điều kiện nhịn ăn sau khi đưa vào một liều duy nhất dưới da.

Mô tả chi tiết sáng chế

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

[Yếu tố tăng trưởng tương tự insulin (IGF)]

IGF đề cập đến yếu tố tăng trưởng tương tự insulin, mà có thể là IGF-I hoặc IGF-II. Cả IGF-I và IGF-II đều là các phối tử sinh học có các hoạt tính chất cơ

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

IGF-I, cũng được đề cập đến như yếu tố tăng trưởng giống insulin dạng I, là hormon polypeptit đơn gồm 70 axit amin. Chuỗi IGF-I ở người có sẵn, ví dụ, trên EMBL-EBI với mã số nhận biết đặc hiệu UniProtKB P50919. Trình tự axit amin của IGF-I hoàn thiện được minh họa trong SEQ ID NO: 1 của trình tự liệt kê được đính kèm sau đây. Chuỗi 70 axit amin này được bảo tồn trong nhiều loài. Trong sáng chế này, thuật ngữ “IGF-I” không có bất kỳ giới hạn nào có nghĩa là protein IGF-I có hoạt tính hormon như vậy, trừ khi được định nghĩa khác.

IGF-I được sản xuất bởi nhiều tế bào trong cơ thể sống, bao gồm các tế bào gan, và tồn tại trong máu và dịch cơ thể khác. Do đó, IGF-I thuần chủng có thể thu được thông qua sự tinh lọc từ dịch cơ thể của động vật và từ tế bào được nuôi cấy nguyên thủy hoặc các dòng tế bào có nguồn gốc từ động vật. Do hormon tăng trưởng gây ra sự sản xuất IGF-I bởi các tế bào, IGF-I cũng có thể được tinh lọc từ dịch cơ thể của động vật mà có hormon tăng trưởng được đưa vào, hoặc từ tế bào động vật được nuôi cấy nguyên thủy hoặc dòng tế bào động vật được nuôi cấy với sự có mặt của hormon tăng trưởng. Như ở phương pháp khác, IGF-I cũng có thể thu được từ tế bào tái tổ hợp được sản xuất từ sự chuyển nhiễm của vector biểu hiện mang phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của IGF-I vào vật chủ

chẳng hạn như là sinh vật không nhân (ví dụ, E.coli) hoặc tế bào có nhân bao gồm men, tế bào côn trùng, hoặc tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú được nuôi cấy, hoặc từ động vật biến đổi gen hoặc thực vật biến đổi gen mà trong đó gen IGF-I bị chuyển nhiễm. IGF-I ở người cũng có sẵn chẳng hạn như thuốc thử nghiên cứu (Enzo Life Sciences, danh mục: ADI-908-059-0100, Abnova, danh mục: P3452, v.v.) hoặc một dược phẩm (Somazon® mecasermin, INCRELEX®, v.v.). Các hoạt tính ngoài cơ thể sống và trong ống nghiệm của IGF-I để sử dụng có thể được đánh giá như các hoạt tính riêng biệt liên quan đến chất tiêu chuẩn IGF-I dưới mã NIBSC: 91/554, chất mà hoạt tính tương ứng một đơn vị/microgram quốc tế. Chất tiêu chuẩn này có sẵn từ World Health Organization's National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Trong nội dung của sáng chế, IGF-I được xem xét là có hoạt tính riêng biệt tương đương với IGF-I của mã NIBSC: 91/554.

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

Thuật ngữ “thụ thể IGF-I” đề cập đến yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I. Thuật ngữ “thụ thể IGF-I” được sử dụng ở đây có nghĩa là protein thụ thể IGF-I, trừ khi được định nghĩa khác. Thụ thể IGF-I là protein được tạo thành từ hai phân tử protein đơn lẻ, mỗi phân tử gồm chuỗi alpha và chuỗi beta. Trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người được biểu thị trong SEQ ID NO: 2, trong đó một phân chuỗi gồm các vị trí axit amin thứ 31 đến 735 biểu thị chuỗi alpha, trong khi một phân chuỗi bắt đầu từ vị trí axit amin thứ 740 biểu thị chuỗi beta. Chuỗi alpha của thụ thể IGF-I có một phần liên kết với IGF-I, trong khi chuỗi beta có cấu trúc xuyên màng và thể hiện chức năng truyền các tín hiệu vào tế bào. Chuỗi alpha của thụ thể IGF-I có thể được chia thành các miền L1, CR, L2, FnIII-1, và FnIII-2a/ID/FnIII-2b. Theo trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người được xác

định trong SEQ ID NO: 2, vị trí thứ 31 đến 179 tương ứng với miền L1, các vị trí thứ 180 đến 328 tương ứng với miền CR, các vị trí thứ 329 đến 491 tiếp xúc với vùng L2, các vị trí thứ 492 đến 607 tiếp xúc với vùng FnIII-1, các vị trí thứ 608 đến 735 tương ứng với miền FnIII-2a/ID/FnIII-2b. Trong số chúng, miền CR (giàu cystein) liên quan đến sự hoạt hóa của kinaza tyrosin nội bào trong chuỗi beta, chuỗi mà liên kết với sự thay đổi thể cấu tạo của thụ thể IGF-I xảy ra khi IGF-I liên kết với thụ thể. Trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người có sẵn, ví dụ, trên EMBL-EBI với mã số nhận biết đặc hiệu UniProtKB P08069, và cũng được biểu thị trong trình tự liệt kê là SEQ ID NO: 2.

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

[Kháng thể kháng thụ thể IGF-I]

Kháng thể là một glycoprotein chứa ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) bắt cặp với nhau thông qua các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi chuỗi nặng (gọi tắt là VH) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng chứa ba miền, ví dụ, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ chứa một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (gọi tắt là VL) và một vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ chứa một miền, ví dụ, CL. Có hai loại vùng hằng định chuỗi nhẹ, ví dụ, chuỗi λ (lambda) và chuỗi κ (kappa). Các vùng hằng định chuỗi nặng được phân lớp thành chuỗi γ (gamma), chuỗi μ (mu), chuỗi α (alpha), chuỗi δ (delta) và chuỗi ϵ (epsilon), và các loại khác của các vùng hằng định chuỗi nặng dẫn đến các lớp kháng thể khác nhau của các kháng thể, ví dụ, một cách tương ứng IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE. Mỗi vùng VH và VL cũng được chia thành bốn vùng được duy trì một cách tương đối (FR-1, FR-2, FR-3, và FR-4), được đề cập chung đến như vùng khuôn (FR), và ba vùng biến đổi lớn (CDR-1, CDR-2, và CDR-3), được đề cập chung đến như những vùng quyết định bổ cứu (CDR). Vùng VH bao gồm ba vùng CRD và bốn vùng FR được sắp xếp theo thứ tự FR-1, CDR-1 (CDR-H1), FR-2, CDR-2 (CDR-H2), FR-3, CDR-3 (CDR-H3), và FR-4 từ đầu cuối amin đến đầu cuối cacboxyl. VL bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR được sắp xếp theo thứ tự FR-1, CDR-1 (CDR-L1), FR-2, CDR-2 (CDR-L2), FR-3, CDR-3 (CDR-L3), và FR-4 từ đầu cuối amin đến đầu cuối cacboxyl. Vùng biến đổi của mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm một miền liên kết, mà tiếp xúc với một kháng nguyên.

Kháng thể theo sáng chế có thể là đoạn và/hoặc dẫn xuất của kháng thể. Các ví dụ của các đoạn kháng thể bao gồm $F(ab')_2$, Fab, và Fv. Các ví dụ của các dẫn xuất của kháng thể bao gồm: các kháng thể mà trong đó sự biến đổi axit amin được gây ra ở vùng hằng định của nó; các kháng thể mà trong đó thứ tự miền của

các vùng hằng định bị biến đổi; các kháng thể có hai hoặc nhiều hơn Fc's trên phân tử; các kháng thể gồm duy nhất chuỗi nặng hoặc duy nhất chuỗi nhẹ; các kháng thể với sự glycosyl hoá bị biến đổi; các kháng thể đồng đặc hiệu; liên hợp các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể với các hợp chất hoặc các protein khác ngoài các kháng thể; các enzym kháng thể; các kháng thể thu nhỏ; tandem scFv's; tandem scFv's đồng đặc hiệu; các kháng thể đơn dòng; và các VHH. Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng ở đây bao hàm các đoạn kháng thể và/hoặc các dẫn xuất từ kháng thể như vậy, trừ trường hợp được định nghĩa khác.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” thông thường có nghĩa là các phân tử kháng thể thu được từ dòng vô tính có nguồn gốc từ tế bào sinh kháng thể đơn, ví dụ, nhiều các phân tử kháng thể đơn có sự kết hợp của VH và VL với các trình tự axit amin riêng biệt. Kháng thể đơn dòng cũng có thể được sản xuất thông qua quy trình chế tạo gen, bằng việc sản xuất phân tử axit nucleic có chuỗi gen mã hóa trình tự axit amin của protein kháng thể đơn dòng.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể quen với các công nghệ để biến đổi kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng các thông tin di truyền học về, ví dụ, các chuỗi H, các chuỗi L, các vùng biến đổi của nó, và các công nghệ để sản xuất kháng thể phù hợp cho thuốc điều trị bằng việc thay thế kháng thể động vật chẳng hạn như kháng thể chuột thành kháng thể loại ở người. Kháng thể đơn dòng loại ở người cũng có thể được sản xuất bằng việc kích hoạt động vật biến đổi gen không phải người mang gen kháng thể người thành kháng nguyên.

Phương pháp khác mà không đòi hỏi sự kích hoạt động vật là phương pháp liên quan đến: cung cấp thư viện thực khuẩn thể biểu thị vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể ở người hoặc một phần của nó (sự hiển thị thực khuẩn thể

kháng thể ở người); thu được dòng vô tính thực khuẩn thể biểu thị peptit mà liên kết riêng với kháng nguyên tương ứng hoặc kháng thể có trình tự axit amin muốn có; và sản xuất kháng thể ở người muốn có trên cơ sở thông tin của dòng vô tính thực khuẩn thể được lựa chọn. Một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể sử dụng công nghệ thích hợp (xem, ví dụ, a review by Taketo Tanaka et al., Keio J. Med., Vol.60, trang 37-46). Một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể chế tạo một kháng thể để đưa vào động vật không phải người theo cách thức tương tự với kháng thể nhân hóa, bằng cách sử dụng thông tin về các trình tự axit amin của các CDR và các vùng biến đổi thích hợp.

Thuật ngữ “phản ứng kháng nguyên-kháng thể” được sử dụng ở đây có nghĩa là kháng thể liên kết với thụ thể IGF-I với ái lực được biểu thị bằng hằng số phân ly cân bằng (KD) của $1 \times 10^{-8} \text{M}$ hoặc thấp hơn. Kháng thể của sáng chế tốt hơn nên liên kết với thụ thể IGF-I với một KD thông thường là $1 \times 10^{-8} \text{M}$ hoặc thấp hơn, cụ thể là $1 \times 10^{-9} \text{M}$ hoặc thấp hơn, cụ thể hơn nữa là $1 \times 10^{-10} \text{M}$ hoặc thấp hơn.

Thuật ngữ “tính đặc hiệu” của kháng thể được sử dụng ở đây có nghĩa là kháng thể gây ra sự liên kết trên cơ sở phản ứng kháng nguyên-kháng thể với kháng nguyên đặc hiệu. Trong nội dung của sáng chế này, kháng thể thụ thể đặc hiệu IGF-I có nghĩa là kháng thể mà, khi được sử dụng ở nồng độ đủ để gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với các tế bào đáng kể biểu thị thụ thể IGF-I, gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với một INSR ở khả năng phản ứng là 1,5 lần hoặc ít hơn khả năng phản ứng với tế bào Mock. INSR có sự tương tự cao với thụ thể IGF-I ở cấu trúc ban đầu (trình tự axit amin) và cấu trúc bậc cao.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể thực hiện các phép đo lường của phản ứng kháng nguyên-kháng thể bằng việc chọn thí nghiệm liên kết thích hợp trong hệ thống của pha chất rắn hoặc pha chất lỏng. Các ví dụ

của các thí nghiệm như vậy bao gồm, mặc dù không bị giới hạn bởi: xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), xét nghiệm miễn dịch enzym pha rắn (EIA), hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET), truyền năng lượng cộng hưởng phát quang (LRET). Phép đo ái lực liên kết kháng nguyên-kháng thể có thể được thực hiện bằng, ví dụ, phân lớp kháng thể và/hoặc kháng nguyên với, ví dụ, enzym, chất huỳnh quang, chất phát quang, hoặc chất đồng vị phóng xạ, và phát hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể bằng việc sử dụng phương pháp thích hợp để đo lường các đặc tính vật lý và/hoặc hóa học của loại được sử dụng.

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế bao gồm cả kháng thể chất chủ vận và kháng thể chất đối vận. Khi sử dụng độc lập, kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I chủ vận của sáng chế có hiệu quả tăng cường hoạt tính tăng trưởng của nguyên bào cơ. Khi được sử dụng kết hợp với IGF-I, kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I của sáng chế có hiệu quả ngăn cản hoạt tính tăng trưởng gây ra bởi IGF-I của nguyên bào cơ.

Kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I theo sáng chế mà liên kết chặt với miền đặc hiệu của thụ thể IGF-I có hiệu quả tăng cường hoạt tính tăng trưởng của nguyên bào cơ trong ống nghiệm.

Kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I của sáng chế không có hiệu quả tăng cường hấp thụ glucoza bởi các tế bào cơ khác biệt trong ống nghiệm ở nồng độ hiệu quả vừa đủ để tăng cường hoạt tính tăng trưởng của nguyên bào cơ, tốt hơn ở nồng độ cao gấp 10 lần so với nồng độ hiệu quả vừa đủ, tốt hơn nữa ở nồng độ cao gấp 100 lần so với nồng độ hiệu quả vừa đủ.

Trong khi IGF-I có hiệu quả hạ đường huyết tốt ở liều lượng đủ để thể hiện hiệu quả tăng khối lượng cơ, kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I của sáng chế không có hiệu quả hạ đường huyết ở liều lượng hiệu quả đủ để thể hiện hiệu quả tăng khối lượng cơ, tốt hơn ở liều lượng cao gấp 10 lần liều lượng hiệu quả.

Ngoài ra, kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I, khi được đưa vào chuột lang ở liều duy nhất, thể hiện hoạt tính ngoài cơ thể để tăng hiệu quả khối lượng cơ mà tương đương với hoạt tính đã thu được bằng việc đưa IGF-I vào liên tục. Kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I của sáng chế có chu kỳ bán rã trong máu dài, và thể hiện hiệu quả tăng khối lượng cơ thông qua việc đưa liều duy nhất vào động vật.

Vì vậy, kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I của sáng chế có tiềm năng như thuốc điều trị hoặc phòng ngừa cho nhiều bệnh liên quan đến thụ thể IGF-I chẳng hạn như chứng teo cơ do bất động và bệnh lùn, trong đó IGF-I được kỳ vọng sẽ có hiệu quả. Ngoài ra, kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I của sáng chế cũng có thể giải quyết vấn đề liên quan đến IGF-I bằng, ví dụ, loại bỏ ảnh hưởng hạ đường huyết và kéo dài chu kỳ bán rã trong máu.

Kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I của sáng chế ngăn cản sự liên kết của IGF-I với thụ thể IGF-I. Theo phương án của kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I của sáng chế, các hoạt tính của thụ thể IGF-I trong khi ngăn cản các hiệu quả của IGF-I trên thụ thể IGF-I. Theo phương án này, kháng thể có hiệu quả ngược hoạt tính đối vận bổ sung của IGF-I, ví dụ, hiệu quả ngược hoạt tính của IGF-I để gây ra sự tăng trưởng của nguyên bào cơ. Phương án khác của kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I của sáng chế liên kết với, nhưng không làm hoạt hóa, thụ thể IGF-I. Các ví dụ của các kháng thể chất đối vận như vậy mà không gây ra sự hoạt hóa thụ thể IGF-I thông qua liên kết chéo bao gồm, mặc dù không bị giới hạn bởi:

các kháng thể có khả năng liên kết kháng nguyên đơn trị, chẳng hạn như Fab và scFv; và các kháng thể có các điểm liên kết hóa trị hai, chẳng hạn như các kháng thể đồng đặc hiệu, mà trong đó chỉ một trong các điểm liên kết liên kết với miền đặc hiệu của thụ thể IGF-I, hoặc trong đó các điểm liên kết được tách ra với khoảng được kiểm soát bằng việc sử dụng mỗi liên kết. Khi sản xuất kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I theo sáng chế này, có thể xác nhận rằng kháng thể có liên kết với thụ thể IGF-I dù thiếu hoạt tính đối vận bằng: xác định kháng thể có khả năng liên kết với thụ thể IGF-I không bằng việc sử dụng phương pháp đo khả năng phản ứng giữa kháng thể và thụ thể IGF-I; hoặc xác định kháng thể có thiếu hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào không bằng việc sử dụng việc kiểm tra sự tăng sinh tế bào với, ví dụ, nguyên bào cơ. Mặt khác, kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I không ảnh hưởng đến hấp thụ glucoza bởi các tế bào cơ khác biệt trong ống nghiệm và mức đường huyết ngoài cơ thể sống. Do đó, kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I của sáng chế có tiềm năng như thuốc điều trị hoặc phòng ngừa mà không có các tác dụng phụ như tăng đường huyết, hoặc có thể được sử dụng cho việc điều trị các khối u ác tính chẳng hạn như ung thư vú, ung thư ruột, ung thư mô liên kết, ung thư phổi, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư tuyến giáp, và u tủy.

[Khả năng liên kết của kháng thể kháng thụ thể IGF-I]

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế liên kết với miền CR của thụ thể IGF-I như epitop. Mặt khác, kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I không có khả năng liên kết với INSR, mà có sự tương tự cao với thụ thể IGF-I ở cấu trúc ban đầu (trình tự axit amin) và cấu trúc bậc cao.

Bằng liên kết với miền CR của thụ thể IGF-I, kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có vẻ như hoạt hóa thụ thể loại ở người, mà là dime của hai bản sao thụ thể IGF-I, hoặc thụ thể loại ở đây, mà là dime giữa thụ thể IGF-I và INSR.

[Chuỗi kháng thể kháng thụ thể IGF-I]

Chuỗi kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, miễn là nó liên kết riêng với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống và có hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào.

Tuy nhiên, kháng thể này tốt hơn nên có các trình tự axit amin đặc hiệu như các chuỗi CDR, mà sẽ được giải thích chi tiết bên dưới. Trong nội dung của sáng chế, thuật ngữ “tính giống nhau” của các trình tự axit amin được sử dụng ở đây có nghĩa là tỷ lệ của các vị trí axit amin giống nhau giữa các chuỗi, trong khi thuật ngữ “tính tương tự” của các trình tự axit amin được sử dụng ở đây có nghĩa là tỷ lệ của các vị trí axit amin giống hoặc tương tự giữa các chuỗi. Tính tương tự và tính giống nhau của các trình tự axit amin có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp BLAST (với các điều kiện mặc định của PBLAST được cung cấp bởi NCBI).

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

- 1) các vị trí axit amin có các nhóm thế béo: các vị trí glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin;
- 2) các vị trí axit amin có các nhóm thế hydroxyl béo: các vị trí serin và threonin;
- 3) các vị trí axit amin có các nhóm thế chứa amit: các vị trí asparagin và glutamin;
- 4) các vị trí axit amin có các nhóm thế thơm: các vị trí phenylalanin, tyrosin, và tryptophan;
- 5) các vị trí axit amin có các nhóm thế cơ bản: các vị trí lysin, acginin, và histidin;

6) các vị trí axit amin có các nhóm thế có tính axit: các vị trí axit aspartic và axit glutamic;

7) các vị trí axit amin có các nhóm thế chứa lưu huỳnh: các vị trí cystein và methionin.

Theo sáng chế, chuỗi CDR-1 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H1) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3 (SerTyrTrpMetHis) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 3 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin. Chuỗi CDR-H1 tốt hơn cũng nên có sự tương tự 80% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 3. Trong nội dung của sáng chế, khi vị trí axit amin (dưới đây là “vị trí axit amin thứ nhất”) của trình tự axit amin được thế bằng vị trí axit amin khác (dưới đây là “vị trí axit amin thứ hai”), vị trí axit amin thứ nhất trước khi thế và vị trí axit amin thứ hai sau khi thế tốt hơn là tương tự nhau về cấu trúc và/hoặc các đặc điểm.

Chuỗi CDR-2 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H2) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4 (GluThrAsnProSerAsnSerValThrAsnTyrAsnGluLysPheLysSer) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 4 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin. Chuỗi CDR-H2 tốt hơn cũng nên có sự tương tự 82% hoặc cao hơn, cụ thể là 88% hoặc cao hơn, cụ thể hơn nữa là 94% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 4.

Chuỗi CDR-3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (CDR-H3) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5 (GlyArgGlyArgGlyPheAlaTyr) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 5 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin. Chuỗi CDR-H3 tốt

hơn cũng nên có sự tương tự 75% hoặc cao hơn, cụ thể là 87% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 5.

(GluThrAsnProSerAsnSerValThrAsnTyrAsnGluLysPheLysSer)

Chuỗi CDR-1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L1) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6 (ArgAlaSerGlnAsnIleAsnPheTrpLeuSer) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 6 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin. Chuỗi CDR- L1 tốt hơn cũng nên có sự tương tự 81% hoặc cao hơn, cụ thể là 90% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 6.

Chuỗi CDR-2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L2) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7 (LysAlaSerAsnLeuHisThr) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 7 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin. Chuỗi CDR- L2 tốt hơn cũng nên có sự tương tự 85% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 7.

Chuỗi CDR-3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (CDR-L3) tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8 (LeuGlnGlyGlnSerTyrProTyrThr) hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 8 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin. Chuỗi CDR- L3 tốt hơn cũng nên có sự tương tự 77% hoặc cao hơn, cụ thể là 88% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 8.

Tốt hơn là, kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế nên có sự kết hợp của các chuỗi CDR của:

chuỗi CDR-H1, trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3;

chuỗi CDR-H2, trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4;

chuỗi CDR-H3, trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5;

chuỗi CDR-L1, trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6;

chuỗi CDR-L2, trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7; và

chuỗi CDR-L3, trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8.

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

Các chuỗi khung của globulin miễn dịch cho kháng thể của sáng chế tốt hơn là các chuỗi khung của mỗi lớp globulin miễn dịch của động vật có xương sống, tốt hơn nữa là các chuỗi khung của mỗi lớp globulin miễn dịch của người hoặc động vật không phải người bao gồm chuột lang, khỉ, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gia cầm, chuột nhắt, hoặc chuột to.

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế tốt hơn nên có các trình tự axit amin đặc hiệu như vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, như được mô tả dưới đây.

Vùng biến đổi chuỗi nặng tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 9, trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 9 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin, hoặc trình tự axit amin có sự tương tự 90% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 9. Vùng

biến đổi chuỗi nhẹ tốt hơn là trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 10, trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 10 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin, hoặc trình tự axit amin có sự tương tự 90% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 10. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế nên là IGF11-16, mà nên bao gồm sự kết hợp của SEQ ID NO: 9 là vùng biến đổi chuỗi nặng và SEQ ID NO: 10 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có khả năng tạo ra kháng thể kháng thụ thể IGF-I nhân tính theo sáng chế bằng việc chọn các trình tự axit amin của các CDR và/hoặc các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ nội dung được đề cập trên đây và kết hợp chúng với các trình tự axit amin của các vùng khung và/hoặc các vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể ở người thích hợp. Các trình tự axit amin của các vùng khung và/hoặc các vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể nhân tính có thể được chọn từ, ví dụ, các chuỗi ở các lớp IgG, IgA, IgM, IgE, và IgD ở người hoặc các biến thể của chúng.

Khi kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế là kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I, kháng thể của sáng chế hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó tốt hơn là nhóm IgG ở người hoặc biến thể của chúng, tốt hơn nữa là phân lớp IgG4 ở người, phân lớp IgG1 ở người, hoặc biến thể của chúng. Theo một ví dụ, vùng hằng định IgG4 được ổn định có prolin tại vị trí 241 trong vùng bản lề theo hệ đếm Kabat. Vị trí này tương ứng với vị trí 228 trong vùng bản lề theo hệ đếm châu Âu (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, DIANE Publishing, 1992, Edelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 63, 78-85, 1969). Dư lượng tại vị trí này trong IgG4 ở người thường là serin, trong khi sự thể serin

với prolin có thể gây ra sự ổn định của kháng thể kết quả. Theo ví dụ khác, sự đưa đột biến N297A vào vùng hằng định của IgG1 giúp giảm thiểu khả năng liên kết với thụ thể Fc và/hoặc khả năng để cố định phần bổ sung.

[Liên kết cạnh tranh]

Kháng thể nhân tính mà tạo ra liên kết cạnh tranh với thụ thể IGF-I cùng kháng thể kháng thụ thể IGF-I có tính người theo sáng chế cũng được bao hàm trong phạm vi sáng chế. Thuật ngữ “liên kết cạnh tranh” được sử dụng ở đây có nghĩa là hiện tượng mà khi có hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng cùng với kháng nguyên, sự liên kết một trong các kháng thể với kháng nguyên bị ngăn cản bởi liên kết của kháng thể khác với kháng nguyên. Sự liên kết cạnh tranh này thường được đo bằng, ví dụ, bổ sung vào một lượng ổn định (nồng độ) của kháng thể đơn dòng, kháng thể đơn dòng khác cùng lượng biến đổi của nó (nồng độ), và xác định lượng (nồng độ) của kháng thể đơn dòng sau tại nơi lượng liên kết của kháng thể đơn dòng ban đầu, tồn tại trong lượng ổn định, bị suy giảm. Mức độ ngăn cản của liên kết cạnh tranh có thể được biểu thị trong đơn vị IC_{50} hoặc K_i . Kháng thể đơn dòng mà tạo ra liên kết cạnh tranh với kháng thể kháng thụ thể IGF-I nhân tính theo sáng chế có nghĩa là kháng thể có IC_{50} của 1000nM hoặc ít hơn, cụ thể hơn 100nM hoặc ít hơn, cụ thể hơn nữa là 10nM hoặc ít hơn khi đo liên kết kháng nguyên-kháng thể bằng việc sử dụng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế, ví dụ, kháng thể IGF11-16, ở 10Nm. Phép đo liên kết cạnh tranh cũng có thể được thực hiện bằng việc phân lớp kháng thể để sử dụng với, ví dụ, enzym, chất huỳnh quang, chất phát quang, chất đồng vị phóng xạ, v.v., và phát hiện lớp này bằng việc sử dụng phương pháp đo lường thích hợp cho việc phát hiện các đặc tính vật lý và/hoặc hóa học của lớp.

[Phản ứng chéo]

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế tốt hơn nên phản ứng chéo với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống khác. Thuật ngữ “phản ứng chéo” có nghĩa là trong khi kháng thể tạo ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với thụ thể IGF-I từ động vật đích (chẳng hạn như người), kháng thể cũng có khả năng để liên kết với kháng nguyên có nguồn gốc từ động vật khác mà khác với động vật đích. Kháng thể tốt hơn nên có khả năng phản ứng chéo với thụ thể IGF-I của động vật khác với động vật đích mà có thụ thể IGF-I là mục tiêu của phản ứng kháng nguyên-kháng thể bằng kháng thể, chẳng hạn như người hoặc động vật không phải người bao gồm chuột lang, khỉ, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, hoặc gia cầm. Ví dụ 7 chứng minh rằng kháng thể kháng thụ thể IGF-I, IGF11-16, đã được minh họa để liên kết với chuỗi ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet ở miền CR của thụ thể IGF-I ở người. Do chuỗi ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet này được duy trì trong các phản ứng của các thụ thể IGF-I ở khỉ (khỉ đuôi dài), thỏ, chuột lang, bò, cừu, ngựa, và chó, kháng thể này có khả năng liên kết chéo với các thụ thể IGF-I từ các loài này. Ngoài ra, do các trình tự axit amin của các phản ứng của chuột to và chuột nhắt đều là ProSerGlyPheIleArgAsnSerThrGlnSerMet, sự sàng lọc đối với kháng thể kháng thụ thể IGF-I mà liên kết với phần này để có thể thu được kháng thể mà liên kết với các thụ thể IGF-I, ví dụ, chuột to và chuột nhắt, và cũng có các đặc tính và chức năng tương tự như của IGF11-16.

Ngoài ra, tế bào hoặc động vật của các loài mà không phản ứng chéo với kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể bị thay đổi thông qua sự chế tạo gen thành tế bào hoặc động vật biểu thị thụ thể IGF-I với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo các phản ứng chéo của sáng chế.

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

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo phương án của sáng chế có hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống. Mặc dù các kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I đã được biết đến, không có kháng thể nào được báo cáo là thể hiện hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng các tế bào đã nuôi cấy nguyên thủy, cụ thể là các nguyên bào cơ. Cũng không có kháng thể đã biết đến nào cho đến nay được báo cáo là có hoạt tính gây ra sự tăng trưởng tế bào tại liều lượng thấp hơn giá trị EC_{50} của IGF-I trong ống nghiệm. Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống trong nội dung của sáng chế tốt hơn là các tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú, chim, loài bò sát, lớp lưỡng cư, hoặc cá, tốt hơn nữa là các tế bào có nguồn gốc từ người, khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, cừu, ngựa hoặc chó. Các tế bào có nguồn gốc từ các loài này mà biểu thị thụ thể IGF-I với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo các phản ứng chéo của sáng chế có thể được gây ra để tăng nhanh bằng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế. Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống theo sáng chế cũng bao hàm: các tế bào và các động vật biến đổi gen để biểu thị thụ thể IGF-I của các loài với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo các phản ứng chéo của sáng chế; và các tế bào động vật bị biến đổi có nguồn gốc từ các tế bào và các động vật biến đổi gen như vậy.

Hoạt tính của kháng thể để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống có thể được phân tích trong ống nghiệm bằng việc sử dụng các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy, các dòng tế bào có sẵn, hoặc các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các tế bào như vậy. Thuật ngữ, “các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy” có nghĩa là các tế bào mà được tách riêng từ cơ quan hoặc

mô của sinh vật sống, và có thể được nuôi cấy thứ cấp một cách điển hình theo một số cách. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy có nguồn gốc từ động vật có xương sống có thể thu được từ cơ quan hoặc mô của động vật có xương sống thông qua việc xử lý enzym, sự phân tán với các phương thức vật lý, hoặc phương pháp cấy mô khối sinh vật. Cơ quan hoặc mô hoặc đoạn của chúng thu được từ động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng cho việc phân tích hoạt tính của kháng thể nêu trên. Các ví dụ tốt hơn của các cơ quan và mô từ các tế bào nguyên thủy được sản xuất bao gồm: các mô tuyến nội tiết như tuyến giáp, tuyến cận giáp, và tuyến thượng thận; các mô tuyến miễn dịch như ruột thừa, amidan, hạch bạch huyết, và lá lách; các cơ quan hô hấp như khí quản và phổi; các cơ quan tiêu hóa như dạ dày, tá tràng, ruột non, và ruột già; các cơ quan bài tiết như thận và bàng quang; các cơ quan sinh dục nam như ống dẫn tinh, tinh hoàn và tuyến tiền liệt; các cơ quan sinh dục nữ như vú và ống dẫn trứng; và các mô cơ như cơ tim và cơ xương. Các ví dụ tốt hơn nữa bao gồm gan, thận, hoặc các cơ quan tiêu hóa hoặc các mô cơ, trong số chúng thì các mô cơ vẫn tốt hơn cả. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy mà có thể được sử dụng cho việc phân tích hoạt động gây ra sự tăng trưởng của kháng thể kháng thụ thể IGF-I trong nội dung của sàng chế là các tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được gây ra để tăng nhanh bằng liên kết IGF-I với thụ thể IGF-I. Các ví dụ điển hình của chúng là các nguyên bào cơ xương, mà là các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy tách riêng từ mô cơ. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy có nguồn gốc từ người hoặc động vật có sẵn bởi sự chuyển nhượng hoặc về mặt thương mại trên thị trường cũng có thể thu được và được sử dụng. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy có sẵn từ nhiều tổ chức và công ty, ví dụ, ATCC®, ECACC, Lonza, Gibco®, Cell Applications, ScienCell research laboratories, và PromoCell.

Thuật ngữ “dòng tế bào” có nghĩa là dòng các tế bào được nuôi cấy mà có nguồn gốc từ sinh vật sống và sau đó được bắt tử để chúng có thể sinh sôi nảy nở với việc duy trì các đặc tính riêng biệt của loài. Các dòng tế bào được chia thành các dòng tế bào không có nguồn gốc từ khối u và các dòng tế bào có nguồn gốc từ khối u. Các dòng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống mà có thể được sử dụng cho việc phân tích hoạt tính gây ra sự tăng trưởng của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế là các tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được gây ra để sản sinh bằng liên kết IGF-I với thụ thể IGF-I. Các ví dụ của các dòng tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được gây ra để sản sinh bằng IGF-I bao gồm, dù không bị giới hạn bởi: u nguyên bào thần kinh ở người SH-SY5Y, HaCaT dòng tế bào sừng biểu bì ở người, A549 dòng tế bào ung thư biểu mô tuyến phế nang ở người, Caco-2 dòng tế bào ung thư biểu mô đại tràng ở người, HepG2 dòng tế bào ung thư biểu mô tế bào gan ở người, Hela dòng tế bào ung thư cổ tử cung ở người, SiHa dòng tế bào ung thư cổ tử cung ở người, MCF7 dòng tế bào ung thư vú ở người, NTERA-2 dòng ung thư biểu mô tế bào phôi người đa năng và U-2-OS dòng tế bào ung thư xương ở người.

Các tế bào khác mà có thể được sử dụng cho việc phân tích hoạt tính gây ra sự tăng trưởng của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế là các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy và các dòng tế bào. Các ví dụ về các chất chuyển hóa như vậy bao gồm: các tế bào iPS được sản xuất từ các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy; và các tế bào và các mô khác biệt với các tế bào iPS như vậy. Các chất chuyển hóa khác bao gồm các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy và các dòng tế bào biến đổi gen để kết hợp gen để biểu thị gen tạm thời hoặc vĩnh viễn. Các ví dụ về các gen sẽ được đưa vào và biểu thị bằng các tế bào như vậy bao gồm các gen thụ thể IGF-I của người và các loài khác.

Các phương pháp để xác định khả năng của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế để gây ra các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống để sinh sản bao gồm: việc đếm tế bào, phép đo sự tổng hợp ADN, và phép đo sự thay đổi hoạt tính của enzym chuyển hóa. Các phương pháp cho việc đếm tế bào bao gồm các phương pháp bằng cách sử dụng các đĩa đếm tế bào máu hoặc các thiết bị đếm tế bào như máy đếm Coulter. Các phương pháp để đo sự tổng hợp ADN bao gồm các phương pháp trên cơ sở sự hấp thụ của [3H]-thymidin hoặc 5-brom-2'-deoxyulysin (BrdU). Phương pháp để đo sự thay đổi hoạt tính của enzym chuyển hóa bao gồm phương pháp MTT, phương pháp XTT, và phương pháp WST. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể sử dụng các phương pháp khác thích hợp. Hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào được phát hiện nếu sự tăng trưởng của các tế bào được nuôi cấy phản ứng với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế là cao hơn so với sự tăng trưởng của các tế bào khi không có kháng thể. Trong trường hợp này, cũng dễ dàng để đo hoạt tính cảm ứng trong cùng các điều kiện bằng việc sử dụng IGF-I, mà là phối tử gốc cho thụ thể IGF-I, như tiêu chuẩn so sánh.

Các tế bào được nuôi cấy sẽ được thử nghiệm cho phản ứng với cả kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế hoặc IGF-I với nồng độ của nó thay đổi, và nồng độ ở mức 50% của hoạt tính tăng trưởng tối đa được thể hiện được xác định là giá trị EC_{50} . Khi các nguyên bào cơ xương ở người được sử dụng để đánh giá hoạt tính tăng trưởng, giá trị EC_{50} của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế để gây ra sự tăng sinh tế bào tốt hơn là nên so sánh với IGF-I, tốt hơn nữa là 1/10 hoặc thấp hơn so với IGF-I, tốt hơn nữa là 1/20 hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 1/50 hoặc thấp hơn so với IGF-I. Khi nguyên bào cơ xương ở người được sử dụng để đánh giá hoạt tính tăng trưởng, giá trị EC_{50} của kháng thể kháng thụ thể

IGF-I theo sáng chế tốt hơn là 0,5nmol/L hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 0,3nmol/L hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 0,1nmol/L hoặc thấp hơn.

Các phương pháp cho việc đo hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống ngoài cơ thể sống bao gồm: phương pháp liên quan đến việc đưa vào kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế ngoài đường tiêu hóa cho động vật có xương sống và đo các thay đổi về trọng lượng, kích thước, số lượng tế bào, v.v., đối với toàn bộ cơ thể của cá thể được nhận sự đưa vào hoặc đối với cơ quan hoặc mô tách riêng từ cá thể; và phương pháp liên quan đến việc sử dụng động vật với mô ghép của các tế bào động vật có xương sống và đo các thay đổi về trọng lượng, kích thước, số lượng tế bào, v.v., của mô ghép này bao gồm các tế bào động vật có xương sống. Các phép đo đối với toàn bộ cơ thể của cá thể bao gồm: các phép đo trọng lượng cơ thể, chiều dài cơ thể, và chu vi của bốn chi; phép đo cấu tạo cơ thể, bằng việc sử dụng phương pháp trở kháng; và phép đo hệ số chiều cao creatinin.

Các phép đo đối với cơ quan, mô, hoặc mô ghép từ cá thể bao gồm: trong trường hợp động vật không phải người, phương pháp liên quan đến việc phục hồi trực tiếp cơ quan, mô hoặc mô ghép đích và đo trọng lượng, kích thước hoặc số lượng tế bào bao gồm trong đó của nó. Các phép đo không xâm phạm đối với cơ quan, mô hoặc mô ghép từ cá thể bao gồm: phân tích hình ảnh bằng cách sử dụng ảnh chụp X-quang, CT, và MRI; và phương pháp tương phản bằng cách sử dụng các chất phóng xạ đánh dấu với các chất đồng vị hoặc các chất huỳnh quang. Nếu mô đích là cơ xương, sau đó sự thay đổi lực cơ cũng có thể được sử dụng như một chỉ số. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể sử dụng bất kỳ phương pháp khác mà thích hợp để phân tích hoạt tính của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc

từ động vật có xương sống ngoài cơ thể sống. Các phương pháp đo hoạt tính của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế để gây ra sự tăng trưởng của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống ngoài cơ thể sống bao gồm: thực hiện các phép đo bằng cách sử dụng, ví dụ, các phương pháp đã đề cập ở trên đối với các cá thể mà đã nhận sự đưa vào của kháng thể khác biệt ngoài kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế hoặc bất kỳ chất tiêu chuẩn so sánh nào khác và so sánh các phép đo thu được giữa các cá thể này.

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được đặc trưng bởi thời gian hiệu quả gây ra sự tăng trưởng tế bào dài hơn tương ứng với thời gian tiếp xúc so với thời gian của IGF-I thuần chủng, và bằng cách đó thể hiện khả năng duy trì bền vững được cải thiện. Theo Ví dụ 12, mà chứng minh các hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào trong ống nghiệm, khi các tế bào được tiếp xúc với IGF-I thuần chủng và sau đó được rửa bằng dung môi nuôi cấy không có IGF-I, hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào của IGF-I thuần chủng đã biến mất sau khi rửa. Mặt khác, khi các tế bào được tiếp xúc với IGF11-16 (kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế) và sau đó được rửa bằng dung môi nuôi cấy không có IGF11-16, hoạt tính gây ra sự tăng trưởng tế bào vẫn tiếp tục ngay cả sau khi rửa. Theo Ví dụ 16, mà so sánh động lực học của IGF-I và IGF11-16 (kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế) trong máu, khoảng 50% hoặc cao hơn IGF-I thuần chủng được đưa vào động vật đã biến mất khỏi máu trong vòng 24 giờ sau khi đưa vào, trong khi 60% hoặc cao hơn kháng thể IGF11-16 được đưa vào động vật vẫn còn trong máu thậm chí 48 giờ sau khi đưa vào. Vì vậy, kháng thể IGF11-16 đã thể hiện là duy trì trong máu trong thời gian dài. Các kết quả này chỉ ra rằng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế thể hiện hiệu quả lâu dài của việc gây ra sự tăng sinh tế bào cả trong ống nghiệm và ngoài cơ thể sống.

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế cũng được kỳ vọng để thể hiện hiệu quả ngoài cơ thể sống trong việc gia tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể. Cụ thể, IGF-I có hiệu quả gây ra sự tăng trưởng và sự biệt hóa của các nguyên bào cơ trong các cơ xương như đã được đề cập ở trên, cũng như hiệu quả trong việc mở rộng các sợi cơ. Điều này được kỳ vọng rằng các hiệu quả chung này dẫn đến hiệu quả gia tăng khối lượng cơ. Giống như IGF-I, khi kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được đưa vào động vật, nó cũng thể hiện hiệu quả gia tăng khối cơ của động vật. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế là kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I thứ nhất mà được chứng minh thể hiện hiệu quả ngoài cơ thể sống trong việc gia tăng khối lượng cơ.

Các phương pháp để đo hoạt tính của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế để gia tăng khối lượng cơ bao gồm: đối với toàn bộ cơ thể của cá thể mà nhận sự đưa vào, phép đo trọng lượng cơ thể, chiều dài cơ thể, và chu vi bốn chi; phép đo cấu tạo cơ thể, bằng cách sử dụng phương pháp trở kháng; và phép đo creatinin, và hệ số chiều cao. Các phương pháp khác bao gồm: phân tích hình ảnh bằng cách sử dụng ảnh chụp ảnh X quang, CT, và MRI; phương pháp tương phản bằng cách sử dụng các chất phóng xạ đánh dấu với các chất đồng vị hoặc các chất huỳnh quang; và phép đo sự thay đổi lực cơ. Trong trường hợp động vật không phải người, phương pháp liên quan đến sự phục hồi trực tiếp cơ quan, mô hoặc mô ghép đích và đo trọng lượng và/hoặc kích thước của nó có thể được sử dụng. Hiệu quả của việc gia tăng khối lượng cơ có thể được đánh giá bằng cách: so sánh sự gia tăng khối lượng cơ giữa một cá thể mà kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được đưa vào và một cá thể mà kháng thể này không được đưa vào; hoặc so sánh các khối lượng cơ của một cá thể trước và sau khi đưa vào kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế.

Hiệu quả của việc gia tăng khối lượng cơ có thể được xác định nếu có sự gia tăng bất kỳ khối lượng cơ của cá thể trước và sau khi đưa vào kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế. Tốt hơn là, hiệu quả thu được bằng việc đưa vào kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được xác định khi có sự khác biệt tốt hơn là 103% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 104% hoặc cao hơn của khối lượng cơ giữa cá thể mà kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được đưa vào và cá thể mà kháng thể này không được đưa vào, hoặc của cùng cá thể giữa trước và sau khi đưa vào kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế. IGF-I cũng đóng vai trò trong sự tăng trưởng xương, và có hiệu quả gia tăng chiều dài cơ thể (chiều cao cơ thể trong trường hợp của người). Do đó, kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế cũng thể hiện hiệu quả gia tăng chiều dài cơ thể khi được đưa vào động vật. Hiệu quả của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế trong việc tăng chiều dài cơ thể của cá thể có thể được xác định bằng cách đo trọng lượng cơ thể, chiều dài cơ thể, và chu vi bốn chi của cá thể.

[Các hiệu quả về việc hấp thụ glucoza bởi các tế bào có nguồn gốc từ động vật và/hoặc mức đường huyết của động vật]

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được đặc trưng bởi việc không ảnh hưởng đến sự hấp thụ glucoza nội bào bởi các tế bào cơ khác có nguồn gốc từ động vật có xương sống và/hoặc mức đường huyết của động vật có xương sống. Cụ thể, IGF-I được biết đến có hiệu quả gia tăng sự hấp thụ glucoza nội bào và hiệu quả hạ thấp mức đường huyết như là một phần của hiệu quả chất chủ vận của nó với thụ thể IGF-I. Mặt khác, mặc dù kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có chức năng như chất chủ vận của kháng thể kháng thụ thể IGF-I, điều bất ngờ là nó không gây ra sự hấp thụ glucoza của các tế bào cơ khác biệt ngay cả với liều lượng gấp 100 lần hoặc cao hơn so với giá trị EC_{50} trong ống nghiệm đối với

hoạt tính gây ra sự tăng trưởng tế bào. Cụ thể hơn, khi đưa vào động vật ngoài đường tiêu hóa với liều lượng cao gấp 10 lần hoặc cao hơn so với liều lượng hiệu quả đủ để gây ra sự gia tăng khối lượng cơ, kháng thể này bất ngờ không làm thay đổi mức đường huyết.

Ngoài ra, với các đặc tính như kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I, các đặc tính của nó là không ảnh hưởng đến sự hấp thụ glucoza nội bào bởi các tế bào cơ khác biệt có nguồn gốc từ động vật có xương sống và/hoặc mức đường huyết của động vật có xương sống là các hiệu quả tích cực mà giúp tránh vấn đề gây tăng đường huyết, mà là vấn đề được mong muốn được giải quyết đối với kháng thể này được sử dụng để điều trị ở người, nhưng không được giải quyết bằng các kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I thông thường. Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống theo sáng chế tốt hơn là các tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú, chim, loài bò sát, lớp lưỡng cư hoặc cá, tốt nhất nữa là các tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc chim, tốt nhất là các tế bào có nguồn gốc từ người, khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, cừu, ngựa hoặc chó. Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống theo sáng chế cũng bao hàm: các tế bào và các động vật biến đổi gen để biểu thị thụ thể IGF-I có nguồn gốc từ loài động vật có xương sống có khả năng phản ứng chéo với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế; các tế bào và các động vật biến đổi gen để biểu thị thụ thể IGF-I bị đột biến để có khả năng liên kết; và các tế bào có nguồn gốc từ các động vật biến đổi gen như vậy.

Để phân tích hiệu quả của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế trong việc không ảnh hưởng đến sự hấp thụ glucoza nội bào bởi các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống trong ống nghiệm, có thể sử dụng các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy, các dòng tế bào, và các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ

các tế bào như vậy. Thuật ngữ “các tế bào nuôi cấy nguyên thủy” có nghĩa là các tế bào mà được tách riêng từ cơ quan hoặc mô của sinh vật sống, và có thể thường được nuôi cấy thứ cấp đối theo một số cách. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy có nguồn gốc từ động vật có xương sống có thể thu được từ cơ quan hoặc mô của động vật có xương sống thông qua việc xử lý enzym, sự phân tán với các cách thức vật lý, hoặc phương pháp cấy mô. Các ví dụ tốt hơn của các cơ quan và mô mà từ các tế bào nguyên thủy được sản xuất bao gồm: các mô tuyến nội tiết như tuyến giáp, tuyến cận giáp, và tuyến thượng thận; các mô tuyến miễn dịch như ruột thừa, amidan, hạch bạch huyết, và lá lách; các cơ quan hô hấp như khí quản và phổi; các cơ quan tiêu hóa như dạ dày, tá tràng, ruột non, và ruột già; các cơ quan bài tiết như thận và bàng quang; các cơ quan sinh dục nam như ống dẫn tinh, tinh hoàn và tuyến tiền liệt; các cơ quan sinh dục nữ như vú và ống dẫn trứng; và các mô cơ như cơ tim và cơ xương. Các ví dụ tốt hơn nữa bao gồm gan, thận, hoặc các cơ quan tiêu hóa hoặc các mô cơ, trong số chúng thì các mô cơ vẫn tốt hơn cả.

Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy mà có thể được sử dụng trong việc phân tích đặc tính của kháng thể kháng thụ thể IGF-I đối với việc không ảnh hưởng đến sự hấp thụ glucoza nội bào theo nội dung của sáng chế là các tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được gây ra để dẫn đến sự hấp thụ glucoza nội bào của liên kết IGF-I với thụ thể IGF-I. Ví dụ điển hình của chúng là các tế bào cơ khác biệt từ nguyên bào cơ xương, mà là các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy được tách riêng từ mô cơ.

“Các tế bào cơ khác biệt” theo sáng chế là các tế bào cơ mà gây ra sự biệt hóa, và bao gồm các tế bào mà chưa được biệt hóa hoàn toàn. Để thuận tiện, thuật ngữ “các tế bào cơ khác biệt” trong nội dung của sáng chế liên quan đến các tế

bào đã trải qua sự biệt hóa trong ít nhất sáu ngày kể từ khi bắt đầu sự biệt hóa. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy có nguồn gốc từ người hoặc động vật có sẵn bởi sự chuyển nhượng hoặc trên thị trường về mặt thương mại cũng có thể thu được và sử dụng. Các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy ở người có sẵn từ nhiều tổ chức và công ty, ví dụ, ATCC®, ECACC, Lonza, Gibco®, Cell Applications, ScienCell research laboratories, và PromoCell.

Thuật ngữ “dòng tế bào” là dòng các tế bào được nuôi cấy mà có nguồn gốc từ sinh vật sống và sau đó được làm cho bất tử chẳng hạn như chúng có thể sinh sản tạm thời trong khi duy trì các đặc tính riêng của chúng. Các dòng tế bào được chia thành các dòng tế bào không có nguồn gốc từ khối u và các dòng tế bào có nguồn gốc từ khối u. Các dòng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống có thể được sử dụng trong việc phân tích hiệu quả kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế trong việc hấp thụ glucoza nội bào là các tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được gây ra để dẫn đến sự hấp thụ glucoza nội bào bằng liên kết IGF-I với thụ thể IGF-I. Các ví dụ của các dòng tế bào mà biểu thị thụ thể IGF-I và có thể được gây ra để dẫn đến sự hấp thụ glucoza nội bào bằng IGF-I bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi: các tế bào cơ xương, các tế bào mỡ, và tế bào sừng biểu bì.

Các tế bào khác mà có thể được sử dụng cho việc phân tích hiệu quả của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế về sự hấp thụ glucoza nội bào là các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các tế bào và các dòng tế bào được nuôi cấy nguyên thủy. Các ví dụ về các chất chuyển hóa như vậy bao gồm: các tế bào iPS được sản xuất từ các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy; và các tế bào và mô được gây ra để phân biệt với các tế bào iPS như vậy. Các chất chuyển hóa khác bao gồm các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy và các dòng tế bào được tạo ra để hợp

nhất gen để biểu thị tạm thời và nhanh chóng gen này. Các ví dụ về các gen được đưa vào và được biểu thị bởi các tế bào như vậy bao gồm các gen thụ thể IGF-I ở người và các loài khác.

Các phương pháp cho việc xác định hiệu quả của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế về sự hấp thụ glucoza của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống bao gồm: phép đo nồng độ glucoza nội bào; phép đo sự hấp thụ nội bào của chất đánh dấu phóng xạ tương tự glucoza; và phép đo sự thay đổi về lượng của chất vận chuyển glucoza. Các phương pháp cho việc đo nồng độ glucoza bao gồm các phương pháp đo độ hấp thụ như phương pháp enzym. Các phương pháp đo lượng hấp thụ nội bào của chất phóng xạ đánh dấu tương tự glucoza bao gồm phép đo lượng hấp thụ của $[3H]$ -2'-deoxyglucoza. Các phương pháp cho việc đo sự thay đổi về lượng của chất vận chuyển glucoza bao gồm bảo vệ miễn dịch và phương pháp lai thấm protein (western blotting). Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể sử dụng các phương pháp khác thích hợp. Thực tế là không có hiệu quả về sự hấp thụ glucoza nội bào có thể được khẳng định nếu sự hấp thụ glucoza nội bào của các tế bào được nuôi cấy phản ứng với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế gần như giống với sự hấp thụ glucoza nội bào của tế bào nuôi cấy khi không có kháng thể này. Trong trường hợp này, cũng thuận tiện để thực hiện phép đo trong cùng các điều kiện bằng việc sử dụng IGF-I, mà là liên kết gốc cho thụ thể IGF-I, như tiêu chuẩn so sánh.

Các tế bào được nuôi cấy để thử nghiệm đã được xử lý với cả kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế và IGF-I với nồng độ của nó thay đổi, và sự hấp thụ glucoza của nhóm điều trị được chỉ định là tỷ lệ khi sự hấp thụ glucoza nội bào của nhóm không điều trị được xác định là 100%. Khi các tế bào cơ khác biệt ở người được sử dụng để đánh giá sự hấp thụ glucoza, sự hấp thụ glucoza đạt

được bằng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế tốt hơn là bằng hoặc ít hơn sự hấp thụ glucoza đã đạt được bằng IGF-I ở cùng nồng độ. Tốt hơn nữa là, sự hấp thụ glucoza đã đạt được bằng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế nên là 110% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 100%, của lượng hấp thụ glucoza của nhóm không điều trị. Khi các tế bào cơ khác biệt ở người được sử dụng để đánh giá sự hấp thụ glucoza, sự hấp thụ glucoza đã đạt được bằng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được thêm vào một lượng là 100nmol/L tốt hơn là 110% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 105% hoặc thấp hơn, tốt nhất là từ 95% đến 100%.

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

kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế về sự hấp thụ glucoza của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống ngoài cơ thể sống.

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế cũng được đặc trưng ở chỗ khi đưa vào động vật có xương sống ngoài đường tiêu hóa thậm chí với lượng hiệu quả đủ để gia tăng khối lượng cơ của động vật có xương sống, tốt hơn là với lượng gấp 10 lần hoặc lớn hơn lượng hiệu quả, điều này không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống. Khi đánh giá hiệu quả của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế trong việc thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống, tốt hơn nên sử dụng động vật mà thuộc động vật có vú, chim, loài bò sát, lớp lưỡng cư hoặc cá, tốt hơn nữa là động vật thuộc động vật có vú hoặc chim, tốt nhất là người, khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, cừu, ngựa hoặc chó. Động vật biến đổi gen để biểu thị thụ thể IGF-I của loài mà có khả năng phản ứng chéo với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế cũng có thể được sử dụng như động vật để đánh giá hiệu quả của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế trong việc thay đổi mức đường huyết. Các phương pháp xâm phạm để đo mức đường huyết bao gồm phương pháp đo màu và phương pháp điện cực. Các ví dụ về các phương pháp enzym được sử dụng để phát hiện bao gồm phương pháp oxy hóa glucoza (phương pháp GOD) và phương pháp dehydrogenaza glucoza (phương pháp GDH). Các phương pháp không xâm phạm bao gồm các phương pháp đo quang học. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể chọn bất kỳ phương pháp nào khác mà thích hợp.

Trong trường hợp của người, giới hạn bình thường của mức đường huyết lúc nhanh là từ 100mg/dL đến 109mg/dL. Liên quan đến các tác dụng phụ trong mức đường huyết do sử dụng thuốc (Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0), mức đường huyết thấp hơn giới hạn từ 77mg/dL đến 55mg/dL đã

được xác định là đường huyết thấp, trong khi mức đường huyết cao hơn giới hạn từ 109mg/dL đến 160mg/dL đã được xác định là đường huyết cao. Việc đưa thuốc vào được xem xét là không ảnh hưởng đến mức đường huyết khi mức đường huyết sau khi đưa thuốc vào cao hơn 55mg/dL và thấp hơn 160mg/dL, tốt hơn nữa là cao hơn 77mg/dL và thấp hơn 109mg/dL. Tuy nhiên, giá trị bình thường của mức đường huyết và giới hạn dao động của nó thay đổi phụ thuộc vào động vật mà thuốc được đưa vào, và ngay cả đối tượng người cũng không phải lúc nào cũng có mức đường huyết trong giới hạn bình thường tại đưa thuốc vào. Theo đó, trong nội dung của sáng chế, kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế tốt hơn nên được xem xét là không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống mà kháng thể này được đưa vào khi thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống tốt hơn là 30% hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 20% hoặc thấp hơn, tốt nhất là 10% hoặc thấp hơn.

[Quy trình sản xuất kháng thể kháng thụ thể IGF-I]

Kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng nhiều công nghệ đã biết đến với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng (Milstein et al., Nature (England), 06/10/1983, tập 305, số 5934, trang 537-540). Kháng thể đa dòng theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng việc kích hoạt động vật có vú với peptit của thụ thể IGF-I được xác định trong SEQ ID NO: 2 là kháng nguyên, và phục hồi kháng thể kết quả từ, ví dụ, huyết tương động vật. Khi peptit này được sử dụng làm kháng nguyên, peptit này có thể được liên kết với protein mang chẳng hạn như BSA hoặc KLH hoặc được ghép cặp với polylysine. Các ví dụ cụ thể của các peptit mà có thể được sử dụng làm kháng nguyên bao gồm, nhưng không bị giới hạn, ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet, một phần

chuỗi của SEQ ID NO: 2. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng việc kích hoạt động vật có vú với kháng nguyên như vậy, phục hồi tế bào miễn dịch từ động vật có vú, và kết hợp tế bào miễn dịch với tế bào u nguyên bào để sản xuất tế bào lai, nhân bản và nuôi cấy tế bào lai này, và phục hồi kháng thể kết quả từ tế bào lai được nuôi cấy. Ví dụ của phương pháp để thu được kháng thể đơn dòng được mô tả trong Ví dụ 1, và các ví dụ của các kháng thể đơn dòng đã thu được bằng cách đó bao gồm, mặc dù không bị giới hạn bởi, kháng thể đơn dòng có trình tự axit amin VH được xác định trong SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin VL được xác định trong SEQ ID NO: 10 (IGF11-16).

Khi kháng thể đơn dòng như vậy đã thu được, sau đó phân tử axit nucleic có chuỗi gen mã hóa trình tự axit amin của protein kháng thể, và phân tử axit nucleic như vậy cũng có thể được sử dụng để sản xuất kháng thể này thông qua kỹ thuật chế tạo gen. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ đánh giá các công nghệ khác nhau để tận dụng thông tin gen về kháng thể này, chẳng hạn như thông tin về chuỗi H và chuỗi L, các vùng biến đổi của chúng, và các chuỗi CDR, để biến đổi kháng thể này nhằm cải thiện khả năng liên kết hoặc tính đặc hiệu của nó, hoặc thay đổi kháng thể của động vật như kháng thể chuột thành kháng thể ở người, để bằng cách đó sản xuất kháng thể có cấu trúc thích hợp làm thuốc điều trị cho con người. Kháng thể đơn dòng ở người cũng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng, như động vật được kích hoạt với kháng nguyên, động vật chuyển gen không phải người mà có gen kháng thể người được đưa vào. Phương pháp khác mà không đòi hỏi sự kích hoạt động vật là công nghệ liên quan đến việc sử dụng thư viện thực khuẩn thể biểu thị vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể ở người hoặc một phần của chúng (sự hiển thị thực khuẩn thể kháng thể ở người) và thu được dòng vô tính thực khuẩn thể biểu thị peptit mà liên kết riêng với kháng

nguyên tương ứng hoặc kháng thể có trình tự axit amin mong muốn, và sản xuất kháng thể ở người mong muốn dựa trên thông tin của dòng vô tính thực khuẩn thể đã chọn. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể sử dụng công nghệ như vậy mà thích hợp (xem, ví dụ, a review by Taketo Tanaka et al., Keio J. Med., tập 60, trang 37-46).

Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng như đã đề cập ở trên bao gồm việc nuôi cấy tế bào lai mà sản xuất kháng thể mong muốn và sự tinh chế kháng thể kết quả từ chất lỏng bề mặt nuôi cấy thông qua các cách thức thông thường. Phương pháp khác để sản xuất kháng thể đơn dòng như đã đề cập ở trên bao gồm việc cung cấp tế bào lai mà sản xuất kháng thể mong muốn hoặc dòng vô tính thực khuẩn thể thu được từ sự hiển thị thực khuẩn thể kháng thể ở người, thu được gen mã hóa kháng thể như vậy, cụ thể hơn, gen mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, sản xuất vector biểu hiện gen này, và đưa vector này vào tế bào chủ (tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, vi sinh vật, v.v.) để sản xuất kháng thể. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể thay đổi phương pháp này bằng kỹ thuật di truyền học gen mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch để đưa ra đặc điểm mong muốn và tạo ra một kháng thể nhân hóa, một protein di truyền kháng thể, một kháng thể phân tử thấp hoặc một kháng thể sử dụng thông tin cấu trúc về các vùng biến đổi hoặc vùng CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Để cải thiện hiệu suất của kháng thể hoặc tránh các tác dụng phụ, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể đưa ra sự thay đổi cấu trúc của các miền hằng định hoặc chuỗi đường của kháng thể, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã được biết đến bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng phương pháp đã được biết đến với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Cụ thể, trong khi kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được nhân hóa là kháng thể đơn dòng điển hình (Milstein et al., Nature, 1983, tập 305, số 5934, trang 537-540), kháng thể đơn dòng như vậy có thể được sản xuất, ví dụ, theo phương pháp sau đây.

Phương pháp này bắt đầu với, ví dụ, sản xuất phân tử axit nucleic mã hóa (các) trình tự axit amin của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ cấu thành globulin miễn dịch của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế. Phân tử axit nucleic sau đó có thể được nhân bản thành nhiều vector hoặc plasmit để sản xuất vector hoặc plasmit chứa phân tử axit nucleic. Tiếp theo, phân tử axit nucleic, vector hoặc plasmit được sử dụng để chuyển hóa tế bào chủ, mà có thể được chọn từ, ví dụ, các tế bào có nhân chẳng hạn như các tế bào động vật có vú, các tế bào côn trùng, các tế bào men, và các tế bào thực vật, và các tế bào vi khuẩn. Tế bào chủ đã chuyển hóa sau đó được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp mà có thể cho phép sản xuất kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế. Nếu cần thiết, kháng thể kháng thụ thể IGF-I kết quả theo sáng chế có thể được tách riêng từ tế bào chủ. Các phương pháp khác nhau có thể được sử dụng đối với quá trình này mà được biết đến bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Phương pháp trên cơ sở sự tạo miễn dịch của động vật bao gồm việc sản xuất động vật biến đổi gen không phải người thành gen kháng thể ở người đã được đưa vào động vật để tạo miễn dịch, miễn dịch động vật này bằng cách sử dụng thụ thể IGF-I và/hoặc một phần peptit như kháng nguyên, phụ hồi tế bào miễn dịch và kết hợp nó với tế bào u nguyên bào để tạo thành tế bào lai, mà sau đó được nhân bản để sản xuất kháng thể, mà sau đó được phục hồi từ chất lỏng bề mặt nuôi cấy

bằng cách sử dụng phương pháp tinh chế thông thường. Ví dụ cho phương pháp như vậy để thu được kháng thể đơn dòng được mô tả trong, ví dụ, WO2013/180238A.

Phương pháp có sẵn khác bao gồm việc sử dụng thư viện thực khuẩn thể biểu thị vùng biến đổi của kháng thể nhân tính mong muốn hoặc một phần của chúng (sự hiển thị thực khuẩn thể kháng thể ở người) để bằng cách đó thu được kháng thể mà liên kết riêng với kháng nguyên tương ứng hoặc dòng vô tính thực khuẩn thể có trình tự axit amin đặc hiệu, kháng thể mà thông tin sau đó được sử dụng cho việc sản xuất kháng thể nhân tính được mong muốn (xem, ví dụ, the review by Taketo Tanaka et al., The Keio Journal of Medicine, tập 60, trang 37-46).

Theo mỗi liên hệ này, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể sản xuất các kháng thể khác nhau như protein chimeric kháng thể, các kháng thể phân tử thấp và các kháng thể scaffold bằng cách sử dụng các công nghệ đã biết, ví dụ, bằng cách chỉnh sửa gen thành gen mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch để đưa ra đặc điểm mong muốn, hoặc bằng cách sử dụng thông tin cấu trúc của các vùng biến đổi hoặc các vùng CDR của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Ngoài ra, để cải thiện hiệu suất của kháng thể này hoặc tránh các tác dụng phụ, có thể đưa ra sự điều chỉnh cấu trúc của vùng hằng định của kháng thể hoặc đưa ra các vị trí glycosyl hóa của kháng thể, bằng cách sử dụng các công nghệ đã biết đến với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật khi thích hợp.

[Thuốc chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I]

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được sử dụng như thuốc điều trị hoặc phòng ngừa cho tình trạng liên quan đến IGF-I hoặc bệnh gây ra bởi

bất kỳ ảnh hưởng nào trên thụ thể IGF-I. Cụ thể, các tình trạng liên quan đến IGF-I hoặc các bệnh mà có thể là mục tiêu của việc điều trị hoặc phòng ngừa bằng việc sử dụng kháng thể chất chủ vận kháng thụ thể IGF-I bao gồm: teo cơ do bất động, bệnh lùn, xơ gan, xơ hóa gan, đái tháo đường thận, suy thận mãn tính, hội chứng Laron, lão hóa, ức chế tăng trưởng nội tử cung (IUGR), bảo vệ tim mạch, đái tháo đường, kháng insulin, hội chứng chuyển hóa, loãng xương, xơ hóa bàng quang, loạn dưỡng tăng trưởng cơ lực, giảm cơ gắn với AIDS, hội chứng tái phân bố chất béo gắn với HIV, bệnh Crohn, hội chứng Werner, bệnh suy giảm miễn dịch kết hợp liên quan đến giới gen X, chứng chán ăn tâm thần và bệnh vồng mạc của trẻ sinh non, hội chứng Tóc nơ, hội chứng Tóc nơ, hội chứng Prader-Willi, hội chứng Silver-Russell, chiều cao thấp tự phát, béo phì, đa xơ cứng, hội chứng đau cơ xơ hóa, viêm loét đại tràng, giảm lượng cơ, thiếu máu cơ tim, và loãng xương.

Các bệnh mà có thể là mục tiêu của việc điều trị hoặc phòng ngừa bằng cách sử dụng kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I bao gồm: u nguyên bào thần kinh, ung thư mô liên kết cơ vân, ung thư xương, ung thư ở trẻ em, bệnh to đầu chi, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, u xơ tiền liệt tuyến, ung thư vú, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư xương, ung thư phổi, ung thư trực kết tràng, ung thư cổ tử cung, ung thư mô liên kết hoạt dịch, ung thư bàng quang, ung thư dạ dày, u Wilm, tiêu chảy gắn với hạch ung thư di căn và u bài tiết peptit ruột vận mạch, u hormon peptit ruột vận mạch, hội chứng Verner-Morrison, hội chứng Beckwith-Wiedemann, ung thư thận, ung thư tế bào thận, ung thư tế bào chuyển tiếp, ung thư mô liên kết Ewing, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tăng lympho bào cấp tính, u não, u não glioblastoma, u não phi glioblastoma, u màng não, u tuyến yên, u dây thần kinh thính giác, u ngoại bì thần kinh nguyên thủy, u nguyên bào tuỷ, u sao bào, u tế bào thần kinh đệm ít nhánh, u màng não thất, u nhú đám rối màng mạch,

bệnh không lồ, bệnh vảy nến, xơ vữa động mạch, tái phát hẹp van tim cơ trơn mạch máu, phát triển vi mạch không phù hợp, vồng mạc đái tháo đường, bệnh Graves, bệnh đa xơ cứng, bệnh lupus ban đỏ hệ thống, bệnh suy giáp mãn tính, bệnh nhược cơ, viêm tuyến giáp tự miễn và bệnh Behcet. Cụ thể, tốt hơn nên sử dụng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế bao gồm sử dụng như thuốc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh teo cơ do bất động và/hoặc bệnh lùn. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế hữu ích ở chỗ nó không làm thay đổi mức đường huyết khi đưa vào cơ thể.

Thuốc chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng dược phẩm mà chứa, ngoài kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế, một chất mang được dụng được chấp nhận và/hoặc bất kỳ tá dược khác. Việc bào chế thuốc bằng cách sử dụng chất mang được dụng được chấp nhận và/hoặc bất kỳ tá dược khác có thể được thực hiện theo, ví dụ, phương pháp được mô tả ở Đại học Khoa học ở Philadelphia, “Remington: The Science and Practice of Pharmacy, tái bản lần thứ 20”, Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Thuốc điều trị hoặc phòng ngừa như vậy có thể được đề xuất dưới dạng bào chế lỏng được sản xuất bằng việc hòa tan, làm kết tủa, hoặc nhũ hóa các thành phần vào môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu, hoặc là dạng bào chế đông khô của chúng.

Môi trường hoặc dung môi làm chất pha loãng để sản xuất dạng bào chế như vậy có thể là môi trường nước, các ví dụ của môi trường nước bao gồm nước cất để tiêm và dung dịch muối sinh lý, mà có thể được lựa chọn sử dụng với việc thêm vào chất thẩm thấu (ví dụ, D-glucoza, D-sorbitol, D-mannitol, và natri clorua) và/hoặc trong sự kết hợp với chất hỗ trợ hòa tan thích hợp chẳng hạn như rượu (ví dụ, etanol), polyalcohol (ví dụ, propylen glycol hoặc polyetylen glycol), hoặc chất

hoạt động bề mặt không ion (ví dụ, polysorbat 80 hoặc dầu thầu dầu được hydro hóa polyoxyetylen 50). Dạng bào chế như vậy cũng có thể được sản xuất với môi trường dầu hoặc dung môi, các ví dụ của môi trường như vậy bao gồm dầu mè và dầu đậu nành, mà có thể được lựa chọn sử dụng kết hợp với chất hỗ trợ hòa tan chẳng hạn như benzyl benzoat và rượu benzyl. Các thuốc dạng lỏng như vậy thường có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các chất phụ gia thích hợp chẳng hạn như các chất đệm (ví dụ, các chất đệm photphat và các chất đệm axetat), các chất làm dịu (ví dụ, benzalkonium clorua và procaine hydroclorua), các chất ổn định (ví dụ albumin huyết thanh người và polyetylen glycol), các chất bảo quản (ví dụ, axit ascorbic, axit erythorbic, và các muối của chúng), các chất tạo màu (ví dụ, chlorophyll β -caroten màu đồng, Đỏ #2 và Xanh dương #1), các chất khử trùng (ví dụ, este axit paraoxybenzoic, phenol, benzethonium clorua và benzalkonium clorua), các chất làm đặc (ví dụ, hydroxypropyl xenlulozơ, cacboxymetyl xenlulozơ, và các muối của chúng), các chất ổn định (ví dụ, sorbitol và mannitol albumin huyết thanh người), và các chất điều chỉnh mùi (ví dụ, hương liệu bạc hà và cam quýt).

Các dạng bào chế thay thế khác bao gồm các thuốc điều trị hoặc phòng ngừa để bôi vào niêm mạc, các dạng bào chế như vậy thường chứa các chất phụ gia chẳng hạn như các chất kết dính nhạy áp lực, các chất tăng cường nhạy áp lực, các chất điều chỉnh độ nhớt, các chất làm đặc và các chất tương tự (ví dụ, chất nhầy, chất làm đông aga, gelatin, pectin, caragenan, natri alginat, kẹo cao su locust, gôm xanthan gum, gôm tragacan, gôm arabic, chitosan, pullulan, tinh bột sắn, sucralfat, xenlulozơ và các dẫn xuất của nó (chẳng hạn như hydroxypropyl methyl xenlulozơ), các este axit béo polyglyxerol, các chất đồng trùng hợp acrylic axit-alkyl (meth)acrylat, hoặc các muối của chúng và các este axit béo polyglyxerol),

chủ yếu cho mục đích chuyển tải các đặc tính duy trì và hấp thụ vào niêm mạc. Tuy nhiên, dạng bào chế, dung môi và các chất phụ gia cho thuốc điều trị hoặc thuốc phòng ngừa được đưa vào cơ thể không bị giới hạn bởi các chất này, và việc chọn thích hợp có thể được thực hiện bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Thuốc chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể chứa thêm, ngoài kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế, thuốc khác đã được biết đến (thành phần hoạt tính). Thuốc chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được kết hợp với thuốc khác đã được biết đến dưới dạng bộ dụng cụ. Các ví dụ của các thành phần hoạt tính sẽ được kết hợp với kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I bao gồm: hormon tăng trưởng hoặc chất tương tự của chúng, insulin hoặc chất tương tự của chúng, IGF-II hoặc chất tương tự của chúng, kháng thể kháng myostatin, chất đối vận myostatin, kháng thể thụ thể loại IIB kháng activin, chất đối vận thụ thể loại IIB activin, thụ thể loại IIB activin có thể hòa tan hoặc chất tương tự của chúng, ghrelin hoặc chất tương tự của chúng, follistatin hoặc chất tương tự của chúng, chất chủ vận beta-2, và chất điều biến thụ thể hormon nam chọn lọc.

Các ví dụ về thành phần hoạt tính để kết hợp với kháng thể chất đối vận thụ thể IGF-I bao gồm: corticosteroid, thuốc chống nôn mửa, hydroclorua ondansetron, hydroclorua granisetron, metoclopramit, domperidon, haloperidol, cyclizin, lorazepam, prochlorperazin, dexametason, levomepromazin, tropisetron, vắc-xin ung thư, chất ức chế GM-CSF, vắc-xin ADN GM-CSF, vắc-xin trên cơ sở tế bào, vắc-xin tế bào đuôi gai, vắc-xin virus tái tổ hợp, vắc-xin protein sốc nhiệt (HSP), vắc-xin u đồng đẳng, vắc-xin nguyên bào nhiễm, chất giảm đau, ibuprofen, naproxen, cholin magie trisalicylat, oxycodon hydroclorua, chất ức chế

tạo mạch máu mới, chất chống đông máu, kháng thể kháng PD-1, nivolumab, pembrolizumab, kháng thể kháng PD-L1, atezolizumab, kháng thể kháng CTLA4, ipilimumab, kháng thể kháng CD20, rituximab, kháng thể kháng HER2, trastuzumab, kháng thể kháng CCR4, mogamulizumab, kháng thể kháng VEGF, bevacizumab, kháng thể kháng thụ thể VEGF, đoạn thụ thể VEGF có thể hòa tan, kháng thể kháng TWEAK, kháng thể kháng thụ thể TWEAK, đoạn thụ thể TWEAK có thể hòa tan, AMG 706, AMG 386, chất chống tăng sinh, chất ức chế enzyme truyền protein farnesyl, chất ức chế alpha v beta 3, chất ức chế alpha v beta 5, chất ức chế p53, chất ức chế thụ thể Kit, chất ức chế thụ thể ret, chất ức chế PDGFR, chất ức chế bài tiết hormon tăng trưởng, chất ức chế angiopoietin, chất ức chế đại thực bào thâm nhiễm khối u, chất ức chế c-fms, kháng thể kháng c-fms, chất ức chế CSF-1, kháng thể kháng CSF-1, đoạn c-fms có thể hòa tan, pegvisomant, gemcitabine panitumumab, irinotecan, và SN-38. Liều lượng của thuốc khác được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng thụ thể IGF-I có thể trong phạm vi liều lượng được dùng đối với việc trị liệu thông thường, nhưng có thể tăng hoặc giảm tùy theo tình huống.

Thuốc điều trị hoặc phòng ngừa theo sáng chế có thể được đưa vào ngoài đường tiêu hóa cho mục đích cải thiện các triệu chứng. Đối với việc đưa vào ngoài đường tiêu hóa, thuốc đưa xuyên qua mũi có thể được sản xuất, và thuốc dạng lỏng, việc bào chế thể huyền phù hoặc rắn có thể được lựa chọn. Mũi tiêm có thể được chuẩn bị như dạng khác của việc đưa vào ngoài đường tiêu hóa, việc tiêm được lựa chọn là tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch, tiêm truyền, tiêm vào cơ, tiêm nội nhãn hoặc tiêm trong màng bụng. Các dạng bào chế khác được sử dụng cho việc đưa thuốc vào ngoài đường tiêu hóa bao gồm thuốc đạn, thuốc ngậm dưới lưỡi, thuốc tiêm dưới da và thuốc đưa xuyên niêm mạc ngoài thuốc đưa xuyên qua mũi.

Ngoài ra, việc đưa vào động mạch vành là có thể bằng phương thức bổ sung hoặc phủ lên ống đỡ động mạch hoặc dụng cụ trám bít động mạch.

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

[Sử dụng cho động vật không phải người]

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo phương án của sáng chế có thể được sử dụng cho các ứng dụng chăn nuôi hoặc thú y trên các động vật không phải người. Các động vật là mục tiêu của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế cho các ứng dụng chăn nuôi hoặc thú y tốt hơn là các động vật không phải người thuộc động vật có vú, chim, loài bò sát, lớp lưỡng cư hoặc cá, tốt hơn nữa là động vật không phải người thuộc động vật có vú hoặc chim, tốt nhất là động vật được chọn từ khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, cừu, ngựa hoặc chó. Mặc dù các hormon tăng trưởng của bò và các hormon tăng trưởng của lợn hiện nay đang được sử dụng tương ứng để tăng sản lượng sữa của bò và để thúc đẩy sự tăng trưởng của lợn con, các hiệu quả này được xem xét để đạt được bằng IGF-I, mà sự biểu thị của

IGF-I được gây ra bởi hormon tăng trưởng (xem H. Jiang and X. Ge, Journal of Animal Science, tập 92, trang 21-29, 2014).

Do đó, các hiệu quả chất chủ vận của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được tận dụng cho các mục đích để tăng cường sản xuất sữa của động vật và thúc đẩy sự tăng trưởng của phôi thai hoặc động vật non mới sinh. Các ví dụ của các ứng dụng khác đối với kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi: gia tăng khối lượng cơ của động vật, gia tăng tỷ lệ trọng lượng của cơ với mỡ ở động vật, gia tăng hiệu quả chuyển hóa của chế độ nuôi dưỡng thành các mô của cơ thể, gia tăng hiệu quả sinh sản, tăng cường khả năng sinh sản để bảo tồn loài của chúng, và chữa lành vết thương và các triệu chứng kiệt sức liên quan đến bệnh suy nhược. Hiệu quả chất đối vận đã đạt được bằng phương án khác của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được tận dụng cho việc điều trị khối u ác tính của động vật, sự kiểm soát tần suất sinh sản của động vật, sự kiểm soát tăng trưởng của cá thể, và các công dụng khác. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể thay đổi cấu trúc của kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế khi thích hợp để thay đổi các trình tự axit amin của các vùng khung hoặc vùng hằng định của kháng thể này và bằng cách đó làm giảm khả năng miễn dịch của nó, tùy thuộc vào loài động vật mà kháng thể được đưa vào.

[Phương pháp nuôi cấy các tế bào bằng việc sử dụng kháng thể kháng thụ thể IGF-I]

IGF-I và các dẫn xuất của nó được sử dụng rộng rãi trong các công nghệ nuôi cấy tế bào để duy trì, tăng trưởng và/hoặc biệt hóa các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống trong ống nghiệm, và được bán trên thị trường về mặt thương mại như thuốc thử nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, do IGF-I có thể mất hiệu

quả của nó trong sự nuôi cấy dài hạn, ví dụ, do nó thiếu độ ổn định hiệu quả, nên điều cần thiết là phải điều chỉnh nồng độ của nó để tiến hành nuôi cấy tế bào ổn định. Ngoài ra, do IGF-I gây ra sự hấp thụ glucoza bởi các tế bào, có khả năng rằng sự chuyển hóa và các đặc tính của các tế bào có thể bị thay đổi do sự tăng nồng độ glucoza nội bào, và rằng các điều kiện nuôi cấy có thể thay đổi do sự giảm nồng độ glucoza của môi trường nuôi cấy. So với IGF-I, kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế được đặc trưng ở chỗ nó ổn định hơn, có thể duy trì hiệu quả tăng sinh tế bào ngay cả sau khi tiếp xúc với các tế bào, có thể thể hiện hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào ngay cả ở nồng độ thấp hơn, và không gây ra sự hấp thụ glucoza nội bào. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được sử dụng cho việc nuôi cấy tế bào, bằng cách thêm lượng thích hợp kháng thể này vào môi trường nuôi cấy hoặc bằng cách hấp thụ hoặc cố định lượng thích hợp kháng thể này vào pha rắn của bình nuôi cấy.

Do đó, kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế cho phép giảm lượng được sử dụng, và gây ra sự tăng sinh của các tế bào một cách hiệu quả gắn với pha rắn. Các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống theo sáng chế tốt hơn là các tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú, chim, loài bò sát, lớp lưỡng cư hoặc cá, tốt hơn nữa là các tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú hoặc chim, tốt nhất là các tế bào có nguồn gốc từ người, khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, cừu, ngựa hoặc chó. Các tế bào được sử dụng có thể là các tế bào được nuôi cấy nguyên thủy, các dòng tế bào, các chất chuyển hóa có nguồn gốc từ các tế bào như vậy, hoặc các tế bào có nguồn gốc từ động vật biến đổi gen. Cụ thể hơn, các ví dụ của các đối tượng mà có thể được nuôi cấy bằng cách sử dụng kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế cũng bao gồm cơ quan hoặc mô của động vật có xương sống hoặc động vật biến đổi gen có nguồn gốc từ động vật có xương sống như vậy.

Kháng thể kháng thụ thể IGF-I theo sáng chế có thể được sử dụng cho việc nuôi cấy các tế bào nhằm mục đích sản xuất của chất thuộc hoặc việc trị liệu tế bào và thuốc tái tạo bằng cách sử dụng các tế bào như vậy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sự sản xuất kháng thể đơn dòng chuột

Kháng thể đơn dòng chuột có thể được sản xuất bằng công nghệ tế bào được phát triển bởi Kohler, et al. (Nature 256: 495-497, 1975). Kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I đã được sản xuất bởi việc tạo miễn dịch chuột với các tế bào biểu thị thụ thể IGF-I ở người theo công nghệ tế bào lai tiêu chuẩn. Tất cả các thí nghiệm trên động vật được thực hiện theo quy định của viện nghiên cứu này. Phương pháp tiêu chuẩn liên quan đến sự kết hợp của các tế bào có nguồn gốc từ lá lách chuột với dòng tế bào u nguyên bào chuột (P3U1) đã được thực hiện. Các tế bào lai đã được lựa chọn bằng cách sử dụng môi trường chứa hypoxanthin, aminopterin, và thymidin. Môi trường lỏng tế bào lai đã được sử dụng để đánh giá ái lực bằng Cell ELISA bằng cách sử dụng các tế bào biểu thị thụ thể IGF-I và đánh giá hoạt tính của kinaza tyrosin nội bào của thụ thể IGF-I bởi PathHunter® để chọn giếng chứa tế bào lai dương tính. Các tế bào lai được chứa trong giếng này đã được nhân bản đơn bằng công nghệ pha loãng giới hạn. Tế bào lai dương tính nhân bản đơn này được nuôi cấy không có huyết thanh, và kháng thể đơn dòng đã được tinh lọc từ môi trường lỏng thông qua cột protein A (Ab-Capcher, ProteNova). Kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I, được đặt tên là IGF11-16, đã được tìm thấy bằng việc đánh giá hoạt tính tăng sinh nguyên bào cơ ở người qua bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng.

Ví dụ 2: Xác định lớp kháng thể

Để xác định lớp kháng thể của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I, xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) được thực hiện bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu tương ứng với các lớp kháng thể. Kháng thể kháng IgG ở chuột (TAGO, 6150) được pha loãng bậc 2000 với PBS đã được thêm vào đĩa 96-giếng (Nunc, MaxiSorp) với lượng 50 μL /giếng và được giữ ở 4°C qua đêm. Dung dịch trong đĩa 96-giếng được thay thế bằng 3% BSA/PBS, và đĩa này được sử dụng trong ELISA. Kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I đã được thêm vào đĩa 96-giếng đã cố định kháng thể kháng IgG ở chuột với lượng 30 μL /giếng, tiếp theo phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Mỗi giếng được rửa bằng chất lỏng tẩy rửa, và các kháng thể đặc hiệu phản ứng với các lớp kháng thể IgG ở chuột một cách tương ứng: liên hợp kháng thể ALP kháng IgG1 ở chuột (SBA, 1070-04), liên hợp kháng thể ALP kháng IgG2a ở chuột (SBA, 1080-04), liên hợp kháng thể ALP kháng IgG2b (SBA, 1090-04), và liên hợp kháng thể ALP kháng IgG3 ở chuột (SBA, 1100-04), sau đó đã được thêm vào với lượng 30 μL /giếng, tiếp theo phản ứng ở nhiệt độ phòng khoảng 45 phút. Sự khác nhau giữa các giá trị hấp thụ ở 405 và 550 nm được tính toán và được đánh giá là ái lực.

Vì IGF11-16 đã thể hiện khả năng phản ứng với kháng thể kháng IgG1 ở chuột, lớp kháng thể là IgG1

Ví dụ 3: Xác định chuỗi của kháng thể

Để xác định các chuỗi gen của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I, phương pháp SMARTer® RACE đã được thực hiện. Các đoạn gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này và chứa đơn vị mã di truyền bắt đầu và mã kết thúc đã được sản xuất từ RNA có nguồn gốc từ tế bào lai sản xuất ra kháng thể này bằng phương pháp SMARTer® RACE, và các chuỗi nucleotit của chúng được xác định. Mạch cADN thứ nhất được tổng hợp bằng

việc sử dụng toàn bộ RNA có nguồn gốc từ tế bào lai như khuôn mẫu với Bộ dụng cụ SMARTer® RACE 5'/3' (634859, Clontech) và sau đó được mở rộng bằng phản ứng PCR. Việc sử dụng cADN như khuôn mẫu, phản ứng PCR đã được thực hiện với đoạn môi để các đoạn môi chuỗi phổ quát được gắn vào bộ dụng cụ và đặc hiệu với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể một cách tương ứng. Các đoạn môi cho chuỗi nhẹ (kappa) của kháng thể ở chuột và IgG1 của kháng thể ở chuột được chế tạo tương ứng với Accession số BC080787 và LT160966. Chuỗi nucleotit đã chế tạo của đoạn môi cho chuỗi nhẹ của kháng thể ở chuột là ggtgaagttgatgtcttgtgagtg, và chuỗi nucleotit được chế tạo của đoạn môi cho chuỗi nặng của kháng thể ở chuột là gctcttctcagtatgggtggtgtgc. Các đoạn môi này đã được sử dụng trong các thí nghiệm. Các sản phẩm PCR thu được đã được sử dụng là các sản phẩm 5' RACE PCR trong sự nhân bản vô tính TA.

Trong nhân bản vô tính TA, các sản phẩm 5' RACE PCR đã được trải qua hiện tượng điện di, và cADN có chuỗi đích đã được tinh chế với Bộ dụng cụ chiết suất gel QIAEX II (20021, Qiagen). cADN đã tinh chế được trải qua phản ứng bằng việc sử dụng TaKaRa-Taq (R001A, Takara) ở 72°C trong 5 phút để gắn adenin với các đầu 5' và 3'. cADN này được nhân bản thành vector pCR® II-TOPO® đã kích hoạt Tốpôizômêraza I (sau đây gọi là vector TOPO) bằng việc sử dụng Bộ dụng cụ nhân bản vô tính TA TOPO® (450641, Thermofisher) theo phác đồ gắn với bộ dụng cụ này. Vector TOPO được nhân bản với cADN đích đã được biến đổi thành E. coli TOP10, tiếp theo sự nuôi cấy trong môi trường chất làm đông aga chứa 50 µg/mL kanamycin. Việc chèn cADN đích vào vector TOPO được kiểm nghiệm bằng phương pháp PCR khuôn lạc. Chuỗi nucleotit của cADN đã nhân bản đã được xác định. Tương tự, chuỗi nucleotit của sản phẩm 3' RACE PCR đã được xác định để xác định toàn bộ chiều dài chuỗi của gen kháng thể.

Toàn bộ chiều dài các chuỗi nucleotit và axit amin của chuỗi nhẹ của IGF11-16 đã được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28, và toàn bộ chiều dài các chuỗi nucleotit và axit amin của chuỗi nặng của IGF11-16 được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO: 29 và SEQ ID NO: 30. Các trình tự axit amin của CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của IGF11-16 đã được thể hiện tương ứng trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, và SEQ ID NO: 10.

Ví dụ 4: Ái lực đối với thụ thể IGF-I (ELISA)

Để nghiên cứu ái lực của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I đối với thụ thể IGF-I ở người (SEQ ID NO: 2, NP_000866), chuột lang (SEQ ID NO: 11, XP_003475316), khỉ đuôi dài (SEQ ID NO: 12, NP_001248281), thỏ (SEQ ID NO: 13, XP_017193273), chuột to (SEQ ID NO: 14, NP_494694), và chuột nhắt (SEQ ID NO: 15, NP_034643), Cell ELISA đã được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào biểu thị các thụ thể IGF-I tương ứng.

Vector biểu hiện pEF1 (ThermoFisher) chứa gen thụ thể IGF-I của người (SEQ ID NO: 16), chuột lang (SEQ ID NO: 17), khỉ đuôi dài (SEQ ID NO: 18), thỏ (SEQ ID NO: 19), chuột nhắt (SEQ ID NO: 20) hoặc chuột nhắt nhà (SEQ ID NO: 21) đã được chuyển vào các tế bào P3U1 bởi chuyển gen bằng bao gói trong liposome. Sau khi chuyển gen bằng bao gói trong liposome, các tế bào P3U1 được nuôi cấy ít nhất qua đêm và được thêm vào một đĩa 96-giếng (được phủ bằng poly-D-lysine) ở nồng độ $0,8 \times 10^5$ tế bào/giếng và được cố định bằng đệm formalin 10% (Mildform® 10NM, Wako), tiếp theo bởi sự chặn bằng đệm photphat chứa BSA 3%. Các đĩa kết quả đã được sử dụng cho xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym, 30 μ L dung dịch kháng thể IGF11-16 được điều chỉnh thành 10 nM với sữa tách kem 0,1%/BSA/PBS 3% đã được thêm vào từng giếng và được trải qua phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1,5 giờ. Sau khi rửa hai lần với chất lỏng tẩy rửa, các dung dịch liên hợp kháng thể-HRP kháng IgG ở chuột (30 μ L) được điều chỉnh đến các nồng độ định trước với sữa tách kem 0,1%/BSA/PBS 3% đã được thêm vào các giếng tương ứng và được trải qua phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Sau khi rửa hai lần bằng chất lỏng tẩy rửa, 50 μ L của chất nền (TMB) đã được thêm vào từng giếng để bắt đầu phản ứng. Sau khoảng 20 phút, 50 μ L của axit sulfuric 0,5 M đã được thêm vào từng giếng. Các độ hấp thụ ở 450 nm và 550 nm đã được đo, và sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 450 nm và 550 nm đã được tính toán. Ái lực đã được tính dựa trên sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 450 nm và 550 nm đối với các tế bào (các tế bào Mock, SEQ ID NO: 22) được chuyển hóa với vectơ không chứa gen thụ thể IGF-I như giá trị tiêu chuẩn 1 (Bảng 1).

[Bảng 1]

Loài	Chuột nhất	Chuột to	Chuột lang	Thỏ	Khỉ đuôi dài	Người
Ái lực	0,9	1	5,3	5,4	5,4	5,4

IGF11-16 làm tăng ái lực với các tế bào biểu thị các thụ thể IGF-I ở người, chuột lang, khỉ đuôi dài, và thỏ lớn hơn 5-bậc so với các tế bào Mock. Ngược lại, ái lực của IGF11-16 đối với các tế bào biểu thị các thụ thể IGF-I của chuột nhất và chuột to gần như tương đương với ái lực của các tế bào Mock và không tăng lên. Các kết quả này đã chứng minh rằng IGF11-16 liên kết với các thụ thể IGF-I

ở người, chuột lang, khỉ đuôi dài, và thỏ nhưng không liên kết với các thụ thể IGF-I của chuột to và chuột nhắt.

Ví dụ 5: Ái lực đối với thụ thể insulin (ELISA)

Để nghiên cứu ái lực của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I với thụ thể insulin, Cell ELISA đã được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào biểu thị thụ thể insulin ở người.

Vector biểu hiện pEF1 (ThermoFisher) chứa gen thụ thể insulin ở người đã được chuyển hóa vào các tế bào HEK 293T bởi chuyển gen bằng bao gói trong liposome. Các tế bào HEK 293T sau khi chuyển gen bằng bao gói trong liposome được thêm vào đĩa 96-giếng (được phủ bằng poly-D-lysine) ở nồng độ $0,8 \times 10^5$ tế bào/giếng (khoảng 180 μL /giếng) và được giữ cố định với đệm formalin 10% (Mildform[®] 10NM, Wako), tiếp tục bởi sự chặn với đệm photphat chứa BSA 3%. Đĩa này đã được sử dụng trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym, các dung dịch kháng thể (30 μL) được điều chỉnh theo các nồng độ định trước với sữa tách kem 0,1%/BSA/PBS 3% đã được thêm vào các giếng tương ứng và được trải qua phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Sau khi rửa hai lần bằng chất lỏng tẩy rửa (đệm tris chứa Tween), các dung dịch liên hợp kháng thể ALP kháng IgG ở chuột (30 μL) được điều chỉnh đến các nồng độ định trước với sữa tách kem 0,1%/BSA/PBS 3% đã được thêm vào các giếng tương ứng và được trải qua phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Sau khi rửa hai lần bằng chất lỏng tẩy rửa, 100 μL của chất nền (PNPP) được thêm vào từng giếng để bắt đầu phản ứng. Sau khoảng 30 phút, các độ hấp thụ ở 405nm và 550 nm đã được đo và sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 405 và 550 nm đã được tính toán. Ái lực được

tính dựa trên giá trị của sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 405 và 550 nm đối với các tế bào (các tế bào Mock, SEQ ID NO: 22) được chuyển hóa với vector không chứa gen thụ thể IGF-I và gen thụ thể insulin như giá trị tiêu chuẩn 1 (Bảng 2).

[Bảng 2]

IGF11-16	Thụ thể IGF-I ở người	Thụ thể insulin ở người
0,5 nM	2,9	1,1
5 nM	3,7	1,4

Trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym bằng việc sử dụng các tế bào bất động biểu hiện thụ thể IGF-I ở người, sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 405 và 550nm trong 0,5 nM và 5 nM của IGF11-16 đã tăng lên khoảng 3-bậc hoặc cao hơn so với các tế bào Mock. Ngược lại, trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym bằng việc sử dụng các tế bào bất động biểu hiện thụ thể insulin ở người, sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 405 và 550nm trong 0,5 nM và 5 nM của IGF11-16 không tăng lên đến 1,5-bậc hoặc cao hơn. Các kết quả này đã chứng minh rằng IGF11-16 liên kết mạnh hơn với thụ thể IGF-I so với thụ thể insulin.

Ví dụ 6: Phân tích vị trí liên kết của thụ thể IGF-I (ELISA)

Để xác định epitop của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I đối với thụ thể IGF-I, ái lực của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I với các biến thể được sản xuất bằng việc thay thế từng miền của thụ thể IGF-I bằng miền của thụ thể insulin có cấu trúc tương tự với của thụ thể IGF-I đã được đo.

Miền ngoại bào của thụ thể IGF-I ở người (NP_000866) đã được thay thế bằng miền ngoại bào của thụ thể insulin, hoặc miền ngoại bào của thụ thể insulin ở người (NP_000199) đã được thay thế bằng miền ngoại bào của thụ thể IGF-I. Bốn chất thể sau đây bằng cách đó đã được sản xuất.

Chất thể 1: hIGFIR [L1-L2]/hINSR, chất thể mà trong đó miền L1 với miền L2 của thụ thể insulin ở người đã được thay thế bằng miền L1 với miền L2 của thụ thể IGF-I ở người;

Chất thể 2: hINSR [L1-L2]/hIGFIR, chất thể mà trong đó miền L1 với miền L2 của thụ thể IGF-I ở người đã được thay thế bằng miền L1 với miền L2 của thụ thể insulin ở người;

Chất thể 3: hINSR [L1]/hIGFIR, chất thể mà trong đó miền L1 của thụ thể IGF-I đã được thay thế bằng miền L1 của thụ thể insulin ở người; và

Chất thể 4: hINSR [L2]/hIGFIR, chất thể mà trong đó miền L2 của thụ thể IGF-I ở người được thay thế bằng miền L2 của thụ thể insulin ở người.

Các vectơ biểu hiện pEF1 (Thermofisher) chứa các gen tương ứng của bốn chất thể của thụ thể IGF-I ở người đã được chuyển hóa vào các tế bào P3U1 bởi chuyển gen bằng bao gói trong liposome. Gen của hIGFIR[L1-L2]/hINSR là Chất thể 1 được thể hiện trong SEQ ID NO: 23; gen của hINSR[L1-L2]/hIGFIR là Chất thể 2 được thể hiện trong SEQ ID NO: 24; gen của hINSR[L1]/hIGFIR là Chất thể 3 được thể hiện trong SEQ ID NO: 25; và gen của hINSR[L2]/hIGFIR là Chất thể 4 được thể hiện trong SEQ ID NO: 26. Sau khi chuyển gen bằng bao gói trong liposome, các tế bào P3U1 được nuôi cấy ít nhất qua đêm và được thêm vào đĩa 96-giếng (được phủ với poly-D-lysine) ở nồng độ $0,8 \times 10^5$ tế bào/giếng và được giữ cố định với đệm formalin 10% (Mildform® 10NM, Wako), tiếp theo bởi sự

chặn bằng đệm photphat chứa BSA 3%. Các đĩa này đã được sử dụng trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym, 30 μ L dung dịch kháng thể được điều chỉnh thành 10 nM với sữa tách kem 0,1%/BSA/PBS 3% được thêm vào mỗi giếng và được trải qua phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1,5 giờ. Sau khi rửa hai lần bằng chất lỏng tẩy rửa, 30 μ L dung dịch liên hợp kháng thể HRP kháng IgG ở chuột được điều chỉnh thành 5 nM với sữa tách kem 0,1%/BSA/PBS 3% được thêm vào mỗi giếng và được trải qua phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Sau khi rửa hai lần bằng chất lỏng tẩy rửa, 50 μ L của chất nền (TMB) đã được thêm vào từng giếng để bắt đầu phản ứng. Sau khoảng 20 phút, 50 μ L của axit sulfuric 0,5 M đã được thêm vào từng giếng để ngăn cản phản ứng. Các độ hấp thụ ở 450 nm và 550 nm đã được đo, và sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 450 nm và 550 nm đã được tính toán. Ái lực được tính dựa trên sự khác biệt giữa các giá trị hấp thụ ở 450 nm và 550 nm đối với các tế bào (các tế bào Mock, SEQ ID NO: 22) được chuyển hóa với vector không chứa gen của mỗi chất thể làm giá trị tiêu chuẩn 1 (Bảng 3).

[Bảng 3]

Chất thể	IGF11-16
hIGFIR[L1-L2]/hINSR	5,5
hINSR[L1-L2]/hIGFIR	1,5
hINSR[L1]/hIGFIR	5,7
hINSR[L2]/hIGFIR	5,6

Trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym bằng việc sử dụng các tế bào bất động biểu hiện hIGFIR[L1-L2]/hINSR, hINSR[L1]/hIGFIR, hoặc hINSR[L2]/hIGFIR, độ hấp thụ ở 450 đến 550 nm trong IGF11-16 đã tăng lên 5-

bậc hoặc cao hơn so với các tế bào Mock. Ngược lại, ái lực của IGF11-16 với các tế bào biểu hiện hINSR[L1-L2]/hIGFIR là yếu. Các kết quả này đã chứng minh rằng IGF11-16 liên kết với miền CR của thụ thể IGF-I.

Ví dụ 7: Xác định epitop của IGF11-16

Để nhận biết chi tiết hơn của epitop từ miền CR là epitop của IGF11-16, chuỗi liên kết được dự tính từ sự khác biệt loài trong ái lực đến thụ thể IGF-I của IGF11-16. Fig. 1 minh họa các trình tự axit amin của miền CR của thụ thể IGF-I của các loài tương ứng.

IGF11-16 liên kết với các thụ thể IGF-I ở người, chuột lang và thỏ, nhưng không liên kết với các thụ thể IGF-I ở chuột to và chuột nhắt. Dựa trên các kết quả này, trình tự axit amin chung cho người, chuột lang, và thỏ nhưng không chung cho chuột to và chuột nhắt đã được dự tính là epitop của IGF11-16 từ các trình tự axit amin của miền CR của thụ thể IGF-I.

Để xác định vị trí axit amin của miền CR của thụ thể IGF-I với vị trí mà liên kết với IGF11-16, ái lực của miền CR với mỗi chất thể axit amin đã được đo bằng xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Cell ELISA được thực hiện bằng việc sử dụng các tế bào biểu hiện thụ thể IGF-I mà trong đó trình tự axit amin được giả thiết là liên kết với IGF11-16 đã được biến đổi trong miền CR.

Như các chất thể axit amin của miền CR, ba chất thể được thể hiện dưới đây đã được sử dụng. Ngoài ra, mỗi thụ thể IGF-I thuần chủng ở người và thụ thể IGF-I thuần chủng ở chuột được kết hợp vào vector biểu hiện pEF1 (Thermofisher) đã được sử dụng như sự kiểm soát dương tính và sự kiểm soát âm tính một cách tương ứng. Mức độ biểu hiện của mỗi thụ thể IGF-I được xác định bằng cách sử

dụng khả năng phản ứng của kháng thể FLAG M2 với thể FLAG (AspTyrLysAspAspAspAspLys) được gắn vào miền nội bào của thụ thể IGF-I như chỉ số.

Chất thể 1 của miền CR: trong trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người (NP_000866, SEQ ID NO: 2), axit aspartic ở vị trí 245 và alanin ở vị trí 247 được thay thế tương ứng bằng asparagin và threonin.

Chất thể 2 của miền CR: trong trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người (NP_000866, SEQ ID NO: 2), axit glutamic ở vị trí 294 đã được thay thế bằng axit aspartic.

Chất thể 3 của miền CR: trong trình tự axit amin của thụ thể IGF-I ở người (NP_000866, SEQ ID NO: 2), glyxin ở vị trí 315 và serin ở vị trí 316 được thay thế tương ứng bằng serin và threonin.

Các tế bào HEK 293T được gieo vào đĩa 10 cm được phủ với poly-D-lysine ở mức 9×10^6 tế bào/giếng. Vào ngày kế tiếp, mỗi ADN plasmid đã được chuyển hóa vào các tế bào bởi chuyển gen bằng bao gói trong liposome. Vào ngày tiếp theo, các tế bào HEK 293T đã được tách ra với trypsin 0,25%/EDTA và được kết tủa trong môi trường lỏng. Các tế bào HEK 293T đã được thêm vào đĩa 96-giếng (được phủ với poly-D-lysine) ở nồng độ $0,8 \times 10^5$ tế bào/giếng và được ủ ở 37°C trong các điều kiện CO_2 5% qua đêm. Môi trường này đã được lấy ra khỏi đĩa 96-giếng, và các tế bào được giữ cố định với đệm focmalin 10% (Mildform® 10NM, Wako). Đệm focmalin 10% đã được thay thế bằng đệm chặn (BSA 3%/PBS/natri azit), và đĩa này được sử dụng trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Trong xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym, 50 μ L của dung dịch kháng thể IGF11-16 hoặc kháng thể FLAG M2 được điều chỉnh thành 1 nM với sữa tách kem 0,1%/BSA/PBS 3% được thêm vào mỗi giếng và được trải qua phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Sau khi rửa hai lần bằng chất lỏng tẩy rửa, các dung dịch liên hợp kháng thể HRP kháng IgG ở chuột (50 μ L) được điều chỉnh theo các nồng độ định trước với sữa tách kem 0,1%/ BSA/PBS 3% được thêm vào các giếng tương ứng và được trải qua phản ứng tại nhiệt độ trong phòng trong khoảng 1 giờ. Sau khi rửa hai lần bằng chất lỏng tẩy rửa, 100 μ L của chất nền (TMB) được thêm vào từng giếng để bắt đầu phản ứng. Sau khoảng 30 phút, 100 μ L của axit sulfuric 0,5 M được thêm vào từng giếng để ngăn cản phản ứng, và các độ hấp thụ ở 450nm được đo. Giá trị của độ hấp thụ ở 450 nm được đánh giá là ái lực.

Các kết quả này đã được minh họa trong Fig. 2. Điều được khẳng định rằng các khả năng tái hoạt động của kháng thể FLAG M2 với các tế bào này biểu thị các chất thể tương ứng của miền CR về thực chất là tương đương với nhau và rằng các mức độ biểu hiện của các chất thể riêng lẻ của miền CR về thực chất là giống nhau. IGF11-16 làm tăng giá trị độ hấp thụ ở 450 nm lên 2 lần hoặc nhiều hơn trong thụ thể IGF-I thuần chủng ở người mà trong đó không có biến đổi nào được đưa vào miền CR và thể hiện sự tăng cường trong ái lực. IGF11-16 làm tăng giá trị độ hấp thụ ở 450 nm lên 2 lần hoặc nhiều hơn trong Chất thể 1 và 2 của miền CR và thể hiện sự tăng cường trong ái lực. Ngược lại, giá trị độ hấp thụ ở 450 nm của Chất thể 3 của miền CR là khoảng 1 và là mức bằng với độ hấp thụ của thụ thể IGF-I ở chuột nhất như sự kiểm soát âm tính, và không có ái lực nào được công nhận. Các kết quả này đã chứng minh rằng các axit amin ở các vị trí 315 và

316 của thụ thể IGF-I rất quan trọng đối với ái lực của IGF11-16 đối với miền CR của thụ thể IGF-I.

Các kết quả đề xuất rằng vị trí liên kết của IGF11-16 với thụ thể IGF-I ở người là gần glyxin (Gly) tại vị trí 315 và serin (Ser) tại vị trí 316. Nói chung, trình tự nhận biết của kháng thể bao gồm tám vị trí axit amin (trung bình sáu đến mười vị trí) và IGF11-16 có khả năng phản ứng chéo thể hiện không có ái lực với thụ thể IGF-I ở chuột nhắt và thể hiện ái lực với các thụ thể IGF-I ở thỏ và người; do đó, chuỗi này của vị trí liên kết IGF11-16 với thụ thể IGF-I ở người được dự tính là ProSerGlyPheIleArgAsnGly*Ser*GlnSerMet (Gly*Ser* chỉ trình tự axit amin tại các vị trí 315 và 316).

Ví dụ 8: Ái lực của thụ thể IGF-I được xác định bằng hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)

Ái lực (tỉ lệ liên kết và tỉ lệ phân tách) của một tác nhân với thụ thể IGF-I đã được đo bằng hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR).

Kháng thể đơn dòng kháng His đã được giữ cố định vào chip cảm biến CM3 (GE) với Amine Coupling Kit (BR-1000-50, GE) và His Capture Kit (28-9950-56, GE). Các điều kiện cố định là NHS/EDC: 7 phút, 50 µg/mL của kháng thể đơn dòng kháng His: 3 phút, etanolamin: 7 phút, và mục tiêu: ≥ 3000 RU. Như các chất phân tích, tác nhân được sử dụng ở các nồng độ định trước. Như phối tử, thụ thể IGF-I 1 tái tổ hợp ở người. Thụ thể His (305-GR-050, R&D SYSTEMS, sau đây gọi là IGF-IR-His) được sử dụng. Như sự kiểm soát âm tính, IgG2a ở chuột đã tinh chế, κ , lớp kháng thể Ctrl, nhân bản vô tính: MG2a-53 (401502, BioLegend, sau đây gọi là ctrl IgG2a) được sử dụng.

Chip cảm biến CM3 được giữ cố định với kháng thể đơn dòng kháng His được đặt với Biacore T200, nhiệt độ phản ứng được đặt là 36°C, và đệm chạy (HBS-EP+, BR-1006-69, GE) được cấp tại tốc độ dòng chảy tốc độ 30 $\mu\text{L}/\text{phút}$. Lượng phối tử liên kết được đặt tại khoảng 100 RU và IGF-IR-His ($0,5$ đến 2×10^{-8} mol/L) đã được thêm vào chip cảm biến để được giữ lại bằng kháng thể đơn dòng kháng His. Ctrl IgG2a (10 nmol/L) được phép phản ứng trong 1 phút, và HBS-EP+ được cấp với tốc độ dòng chảy 30 $\mu\text{L}/\text{phút}$ trong ít nhất 10 phút. Chất phân tích và HBS-EP+ đã được thêm vào các tế bào dòng (1 và 2) và các tế bào dòng (3 và 4) một cách tương ứng.

Các điều kiện phản ứng được đặt trong thời gian liên kết là 600 giây và thời gian phân tách là 600 giây. Sau khi hoàn thành phản ứng, việc rửa được thực hiện với dung dịch đệm hoàn nguyên 1 (SDS 0,2%), dung dịch đệm hoàn nguyên 2 (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8,5), 1 mol/L NaCl, 15 mmol/L MgCl_2), và dung dịch đệm hoàn nguyên 3 (10 mmol/L glycine-HCl (pH 1,5)) trong 1 phút mỗi lần với tốc độ dòng chảy 30 $\mu\text{L}/\text{phút}$. Hằng số tốc độ phân tách (k_a , 1/Ms), hằng số tốc độ liên kết (k_d , 1/s), và hằng số phân tách (K_D , M) được tính toán bằng sự phân tích với phương thức liên kết 1: 1 bằng việc sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T200 (phiên bản 2.0). Các kết quả đã được thể hiện trong Bảng 4.

[Bảng 4]

Phối tử	Chất phân tích	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Thụ thể IGF-I	IGF-I	$5,099 \times 10^6$	0,009083	$1,781 \times 10^{-9}$
Thụ thể IGF-I	IGF11-16	$1,051 \times 10^6$	$< 1 \times 10^{-5*}$	$< 1 \times 10^{-11}$

*: một giá trị thấp hơn giá trị tối thiểu của thiết bị đo.

Giá trị K_d của IGF11-16 đối với thụ thể IGF-I ở người khoảng một phần năm so với IGF-I, cho thấy tỷ lệ liên kết thấp. Ngược lại, giá trị K_d của IGF11-16 đối với thụ thể IGF-I ở người thấp hơn giá trị tối thiểu của thiết bị đo và thấp hơn 1/1000 so với IGF-I, cho thấy tỷ lệ phân tách thấp đáng kể và sự phân tách tối thiểu của IGF11-16 liên kết với thụ thể IGF-I. Giá trị K_D của IGF11-16 đối với thụ thể IGF-I ở người thấp hơn 1/50 so với của IGF-I, cho thấy độ bền liên kết cao. Điều đó đã chứng minh rằng ái lực của IGF11-16 với thụ thể IGF-I là cao so với của IGF-I.

Ví dụ 9: Hiệu quả hoạt tính trên thụ thể IGF-I hoặc thụ thể insulin được xác định bởi PathHunter®

Để phát hiện hiệu quả hoạt tính của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I, hoạt tính của tín hiệu xuôi dòng của thụ thể IGF-I được đo với PathHunter® IGF1R Functional Assay (DiscoverX).

Dòng tế bào đã được sử dụng mà trong đó protein thích ứng SHC1-Enzyme Acceptor (EA) kết hợp protein bao gồm thụ thể IGF-I và miền SH2 liên kết với kinaza tyrosin nội bào của thụ thể IGF-I đã được biểu hiện sinh động trong tế bào. Để phát hiện hiệu quả hoạt hóa của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I trên thụ thể insulin, sự kích hoạt tín hiệu xuôi dòng của thụ thể insulin được đo bằng PathHunter® INSR Functional Assay (DiscoverX). Dòng tế bào khác đã được sử dụng mà trong đó protein thích ứng PLCG1-EA kết hợp protein bao gồm thụ thể insulin và miền SH2 mà liên kết với kinaza tyrosin nội bào của thụ thể insulin đã được biểu hiện sinh động trong tế bào. Trong mỗi dòng tế bào, các liên kết phối tử với thụ thể IGF-I hoặc thụ thể insulin, mà dẫn đến sự nhị trùng hoá thụ thể; sự phosphoryl hóa thụ thể để lấy thêm protein thích ứng có miền SH2; sự tạo thành phức hợp truyền tín hiệu thụ thể; sự gia tốc của liên kết giữa kinaza tyrosin liên

kê không gian và EA; và sự tái cấu tạo của β -galactosidaza đã hoạt hóa. Hiệu quả của thuốc lên kinaza tyrosin thụ thể có thể được xác định bằng việc đo mức tín hiệu hóa phát quang của chất nền được thủy phân bởi hoạt tính β -galactosidaza được tái tạo.

Các tế bào biểu hiện thụ thể IGF-I hoặc thụ thể insulin được gieo vào đĩa 96-giếng (Đen/sạch hoặc Trắng/sạch) đã được phủ bằng poly-D-lysine hoặc collagen-I ở 90 μ L/giếng (2×10^4 tế bào/giếng hoặc 5×10^3 tế bào/giếng) và đã được ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5%. Trong ngày kế tiếp, các tác nhân ở nồng độ định trước được thêm vào đĩa này ở 10 μ L/giếng, tiếp theo bằng việc ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5%. Vào ngày tiếp theo, 30 μ L chất lỏng bề mặt nuôi cấy được thêm vào 15 μ L của dung dịch chất nền, tiếp theo bằng phản ứng trong 60 phút, và tín hiệu phát quang đã được đo bằng quang kế (Tristar, Berthold Japan K.K.). Sự hoạt hóa thụ thể IGF-I được tính toán với hoạt tính của nhóm mà trong đó duy nhất một dung môi được xác định là 100%. Các kết quả được minh họa trong Bảng 5.

[Bảng 5]

Tác nhân	Nồng độ (nM)		
	0,5	5	50
Kháng thể kiểm soát (FLAG M2)	105	109	109
Insulin	184	1244	4619
IGF-I	208	3537	5248
IGF11-16	234	2900	2786

Sự hoạt hóa thụ thể insulin đã được đo cùng với hoạt tính của một nhóm mà trong đó duy nhất một dung môi được xác định là 100%. Các kết quả được minh

họa trong Bảng 6.

[Bảng 6]

Tác nhân	Nồng độ (nM)		
	0,5	5	50
Kháng thể kiểm soát (FLAG M2)	105	104	111
Insulin	1432	1655	1405
IGF-I	126	158	240
IGF11-16	95	96	93

Sự hoạt hóa thụ thể IGF-I bởi một tác nhân đã được đo bằng việc sử dụng dòng tế bào biểu hiện thụ thể IGF-I. Trong dòng tế bào biểu hiện thụ thể IGF-I, IGF-I và IGF11-16 đã cho thấy hiệu quả hoạt hóa trên thụ thể IGF-I so với tiêu chuẩn so sánh.

Sự hoạt hóa thụ thể insulin bằng tác nhân đã được đo bằng việc sử dụng dòng tế bào biểu hiện thụ thể insulin. Trong dòng tế bào biểu hiện thụ thể insulin, hiệu quả hoạt hóa trên thụ thể insulin bằng insulin đã được quan sát. Nồng độ phụ thuộc IGF-I đã hoạt hóa thụ thể insulin, và hiệu quả hoạt hóa đáng kể đã được quan sát thấy tại 50 nM. Ngược lại, IGF11-16 không hoạt hóa thụ thể insulin.

Điều được biết đến rằng IGF-I cho thấy khả năng phản ứng với thụ thể insulin. Điều cũng biết đến rằng sự hoạt hóa thụ thể insulin dẫn đến hiệu quả hạ đường huyết. Điều này đã được chứng minh rằng IGF11-16 tác động riêng biệt trên thụ thể IGF-I và không có hiệu quả hạ đường huyết thông qua thụ thể insulin.

Ví dụ 10: Hoạt tính tăng sinh tế bào trong nguyên bào cơ ở người

Để nghiên cứu hoạt tính tăng sinh của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I trên các nguyên bào cơ ở người, một tác nhân đã được thêm vào các nguyên bào cơ ở người, và lượng ATP của các tế bào sau 4 ngày đã được đo.

Các nguyên bào cơ xương ở người bình thường (HSMM, Lonza) đã được gieo vào đĩa 96-giếng (được phủ bằng collagen loại I) ở 0,1 ml/giếng (2×10^3 tế bào/giếng) bằng việc sử dụng môi trường SkBM-2 (Lonza, CC-3246) chứa BSA 1% và đã được ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5%. Vào ngày kế tiếp của việc gieo cấy tế bào, mỗi tác nhân được thêm vào đĩa này ở 25 µL/giếng và đã được ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5% khoảng 4 ngày. Lượng ATP nội bào đã được đo như chỉ số của sự tăng sinh tế bào với CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Chất lỏng bề mặt được lấy ra khỏi đĩa 96-giếng đã trải qua việc ủ trong 4 ngày để môi trường lỏng trong mỗi giếng là 50 µL, và đĩa này sau đó được đặt ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 30 phút. Thuốc thử CellTiter-Glo[®] đã được thêm vào đĩa này ở 50 µL/giếng, tiếp theo bằng phản ứng trong ít nhất 10 phút. Tín hiệu phát quang sau đó được đo bằng quang kế (Tristar, Berthold Japan K.K.). Hoạt tính đã được tính toán với hoạt tính của nhóm chứa duy nhất dung môi được xác định là 100%. Các kết quả được minh họa trong Bảng 7.

[Bảng 7]

Tác nhân	Nồng độ (nM)	Thí nghiệm 1	Thí nghiệm 2
		Hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào (%)	Hoạt tính gây ra sự tăng sinh tế bào (%)
Kháng thể tiêu chuẩn so sánh (FLAG M2 Ab)	0,005	99	-
IGF-I	0,005	102	103
IGF11-16	0,005	141	130
16-13	0,005	-	102
26-3	0,005	-	108
Dung dịch tiêu chuẩn so sánh 1* (chứa NaN ₃)	-	-	104
Kháng thể tiêu chuẩn so sánh (FLAG M2 Ab)	0,5	98	-
IGF-I	0,5	133	137
IGF11-16	0,5	146	143
16-13	0,5	-	109
26-3	0,5	-	119
Dung dịch tiêu chuẩn so sánh 2* (chứa NaN ₃)	-	-	112

*: Các dung dịch tiêu chuẩn so sánh 1 và 2 chứa natri azit ở lượng tương ứng 0,005 nM và 0,5 nM, mà là các lượng giống với các kháng thể 16-13 và 26-3.

IGF-I và IGF11-16 đã tăng cường hoạt tính tăng sinh tế bào, so với kháng thể tiêu chuẩn so sánh (FLAG M2, Sigma-Aldrich).

Hoạt tính tăng sinh của các nguyên bào cơ xương ở người đã được tăng cường nồng độ phụ thuộc ở 0,00005, 0,0005, 0,005, 0,05, 0,5, 5, 50, và 500 nM IGF11-16. Các giá trị EC_{50} của hoạt tính tăng sinh nguyên bào cơ của IGF11-16 và IGF-I tương ứng là 0,004 nM và 0,61 nM. Các kết quả chỉ ra rằng hoạt tính của IGF11-16 cao hơn 100 lần so với IGF-I.

Các kháng thể 16-13 và 26-3 đã được mô tả trong Tài liệu phi sáng chế 35 không cho thấy hoạt tính tăng sinh tế bào đáng chú ý so với dung môi tiêu chuẩn so sánh (chứa natri azit), và hoạt tính này yếu hơn so với IGF11-16.

Ví dụ 11: Hoạt tính tăng sinh tế bào trong nguyên bào cơ ở chuột lang

Các nguyên bào cơ ở chuột lang (các ứng dụng tế bào) được gieo vào đĩa 96-giếng (được phủ bằng collagen loại I) ở 0,1 mL/giếng (4×10^3 tế bào/giếng) bằng việc sử dụng môi trường SkBM-2 (Lonza, CC-3246) chứa BSA 1% và đã được ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5%. Vào ngày kế tiếp của việc gieo cấy tế bào, mỗi tác nhân được thêm vào đĩa này ở 25 μ L/giếng và được ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5% trong 4 ngày. Lượng ATP nội bào được đo như một chỉ số tăng sinh tế bào bằng CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Chất lỏng bề mặt được lấy ra khỏi đĩa 96-giếng mà đã trải qua việc ủ trong 4 ngày để môi trường lỏng trong mỗi giếng là 50 μ L, và đĩa này được sau đó được đặt ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 30 phút. Thuốc thử CellTiter-Glo[®] đã được thêm vào đĩa ở 50 μ L/giếng, tiếp theo bằng phản ứng trong ít nhất 10 phút. Tín hiệu phát quang sau đó được đo bằng quang kế (Tristar, Berthold Japan K.K.).

Hoạt tính tăng sinh của các nguyên bào cơ ở chuột lang được tăng cường nồng độ phụ thuộc ở 0,00005, 0,0005, 0,005, 0,05, 0,5, 5, 50, và 500 nM IGF11-16. Các giá trị EC_{50} của hoạt tính tăng sinh nguyên bào cơ của IGF11-16 và IGF-I tương ứng là 0,004 nM và 0,76 nM. Các kết quả chỉ ra rằng hoạt tính của IGF11-16 cao hơn 100 lần so với IGF-I.

Ví dụ 12: So sánh trong ống nghiệm với độ bền hiệu quả của IGF-I

Để so sánh độ bền các hiệu quả của IGF11-16 và IGF-I, môi trường này đã được thay thế sau 18 giờ kể từ khi thêm vào IGF11-16 hoặc IGF-I, và hoạt tính tăng sinh các nguyên bào cơ ở người đã được đo trong các điều kiện mà IGF11-16 và IGF-I đã bị loại bỏ.

Các nguyên bào cơ xương ở người bình thường (Human Skeletal Muscle Myoblast Cells, HSMC, Lonza) được gieo vào đĩa 96-giếng (được phủ bằng collagen loại I) ở 0,1 mL/giếng (2×10^3 tế bào/giếng) bằng việc sử dụng môi trường SkBM-2 (Lonza, CC-3246) chứa BSA 1% và đã được ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5% trong 4 ngày. Vào ngày kế tiếp của việc gieo cấy tế bào, IGF11-16 hoặc IGF-I đã được thêm vào đĩa này ở 25 µL/giếng. Sau 18 giờ kể từ khi thêm vào, môi trường này được thay thế bằng môi trường không chứa IGF11-16 hoặc IGF-I hoặc môi trường chứa cả hai, tiếp theo bằng việc ủ ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5% trong 4 ngày. Lượng ATP nội bào được đo như chỉ số tăng sinh tế bào bằng CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Chất lỏng bề mặt được lấy ra khỏi đĩa 96-giếng đã trải qua việc ủ trong 4 ngày để môi trường lỏng trong mỗi giếng là 50 µL, và đĩa này sau đó được đặt ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 30 phút. Thuốc thử CellTiter-Glo® đã được thêm vào đĩa ở 50 µL/giếng, tiếp theo bằng phản ứng trong ít nhất 10 phút. Tín hiệu phát quang sau đó được đo bằng quang kế (Tristar, Berthold Japan K.K.). Tỷ lệ (nhóm tiêu chuẩn so sánh:

0%) tương ứng với nhóm tiêu chuẩn so sánh chứa duy nhất dung môi được tính toán như hoạt tính tăng sinh tế bào. Các kết quả được minh họa trong Fig. 3.

Hoạt tính tăng sinh tế bào tăng lên tương ứng 39% và 75%, trong các nhóm mà trong đó 1 nM và 5 nM IGF-I đã được thêm vào tương ứng trong 4 ngày. Hoạt tính tăng sinh tế bào đã tăng lên tương ứng là 8% và 10%, trong các nhóm mà trong đó 1 nM và 5 nM IGF-I đã được thêm vào tương ứng trong 18 giờ và sau đó được rửa sạch, và hoạt tính này đã thấp hơn 1/5 so với hoạt tính của các nhóm này mà trong đó IGF-I đã được thêm trong 4 ngày, chỉ ra sự giảm đáng chú ý trong hiệu quả này.

Trong nhóm mà trong đó 0,5 nM IGF11-16 đã được thêm vào trong 4 ngày, hoạt tính tăng sinh tế bào đã tăng lên 49%. Hoạt tính tăng sinh tế bào của nhóm mà trong đó 0,5 nM IGF11-16 đã được thêm vào trong 18 giờ và sau đó được rửa sạch đã tăng lên 30%, mà tương ứng với 60% hoặc cao hơn hoạt tính của nhóm mà trong đó IGF11-16 đã được thêm vào trong 4 ngày.

Các hoạt tính tăng sinh tế bào của nhóm được điều trị với 0,5 nM IGF11-16 mà trong đó việc rửa sạch được thực hiện sau khi thêm một tác nhân đã được so sánh với các hoạt tính tăng sinh tế bào của các nhóm được điều trị với 1 nM và 5 nM IGF-I. Hoạt tính của IGF11-16 có ý nghĩa thống kê cao. Các kết quả này đã chứng minh rằng IGF11-16 duy trì hoạt tính tăng sinh của các nguyên bào cơ ở người ngay cả sau khi rửa sạch tác nhân và có hiệu quả cao so với IGF-I. IGF11-16 duy trì hoạt tính tăng sinh tế bào ngay cả sau khi rửa sạch. Các kết quả chỉ ra rằng không giống như tác dụng của IGF-I, IGF11-16 liên kết mạnh với thụ thể IGF-I và có hiệu quả hoạt hóa bền trên thụ thể IGF-I.

Ví dụ 13: Sự hấp thụ glucoza trong các tế bào cơ khác biệt ở người

Để nghiên cứu hiệu quả của IGF11-16 lên sự hấp thụ glucoza, lượng hấp thụ của glucoza ^3H -2-deoxy đánh dấu phóng xạ đã được đo bằng việc sử dụng các tế bào cơ khác biệt ở người đã được so với hiệu quả của IGF-I.

Các nguyên bào cơ xương ở người bình thường (Human Skeletal Muscle Myoblast Cells, HSMM, Lonza) đã được gieo vào đĩa 24-giếng (Costar, 3526) ở 0,5 mL/giếng (2×10^4 tế bào/giếng) và đã được ủ ở 37°C dưới điều kiện CO_2 5%. Môi trường SkBM-2 (Lonza, CC-3246) được bổ sung với FBS (Lonza, CC-4423W), L-Glutamin (Lonza, CC-4422W), Dexametason (Lonza, CC-4421W), rhEGF (Lonza, CC-4420W) và GA-1000 (Lonza, CC-4419W)) đã được thay thế bằng chất mới cho đến khi các tế bào được dính lại với nhau. Môi trường này được thay thế bằng 0,5 mL/giếng môi trường để phân hóa (DMEM / F12 (1:1) (Gibco, 11320) chứa huyết thanh ngựa 2% (Sigma, H1270), 50 U/mL penicillin, 50 g/mL streptomycin (Gibco, 15070-063)), và các tế bào HSMM được dính lại với nhau được ủ ở 37°C trong điều kiện CO_2 5% để bắt đầu sự phân hóa thành các tế bào cơ. Các tế bào này sau khoảng 6 ngày từ khi bắt đầu sự phân hóa đã được sử dụng làm các tế bào cơ biệt hóa ở người trong thí nghiệm hấp thụ glucoza.

Môi trường này đã được thay thế với 0,5 ml/giếng của môi trường đối (1 g/L glucoza chứa DMEM (Gibco, 11885) được bổ sung với BSA béo gốc tự do 0,1% (Seikagaku Corporation, 82-002-5), 50 U/mL penicillin, và 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin (Gibco, 15070-063)), và các tế bào cơ khác biệt ở người đã được ủ ở 37°C trong điều kiện CO_2 5% qua đêm. Vào ngày kế tiếp, môi trường này được thay thế với 0,5 mL/giếng của môi trường để bỏ đói và các tế bào đã được ủ ở 37°C trong điều kiện CO_2 5% trong 2 giờ. Các giếng này được rửa với 1 mL/giếng của PBS, và 0,5 ml/giếng của môi trường xử lý có chứa các tác nhân tương ứng được thêm vào các giếng, tiếp theo bằng việc ủ ở 37°C trong điều kiện CO_2 5%

trong 2 giờ. Môi trường xử lý đã được sản xuất để đem lại các nồng độ cuối cùng của 0,1 mmol/L glucoza, BSA 0,1%, glucoza ^3H -2-deoxy (1 $\mu\text{Ci/mL}$), và mỗi nồng độ của IGF-I tái tổ hợp ở người hoặc kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I bằng việc sử dụng đệm hấp thụ glucoza (20 mmol/L HEPES (DOJINDO, 342-01375), 150 mmol/L NaCl (SIGMA, S5150), 5 mmol/L KCl (Wako, 163-03545), 5 mmol/L MgSO_4 (Wako, 131-00405), 1,2 mmol/L KH_2PO_4 (Wako, 169-04245), 25 mmol/L CaCl_2 (Fluka, 21114), và 2 mmol/L pyruvate (Wako, 190-14881) đã hòa tan trong nước để tiêm và có độ pH 7,4 được điều chỉnh với NaOH). Các giếng được rửa ba lần bằng cách thêm 1 mL/giếng của PBS đã làm mát để ngăn cản sự hấp thụ glucoza. Các tế bào được dung giải bằng việc thêm 0,25 mL/giếng của 1 N NaOH. Toàn bộ lượng chất dung giải tế bào đã được thêm vào lọ nhỏ chứa 3 mL của chất lỏng scintillator ULTIMA GOLD (PerkinElmer Japan) và đã được khuấy. Độ phóng xạ (DPM) của ^3H đã được đo trong 3 phút bằng máy đếm chất lỏng scintillator. Tỷ lệ hấp thụ glucoza của nhóm được điều trị được tính toán với lượng hấp thụ glucoza trung bình (DPM) của nhóm không được điều trị (nhóm tiêu chuẩn so sánh) đã được xác định là 100%. Các kết quả được minh họa trong Fig. 4.

Trong 0,8, 4, 20 và 100 nM IGF-I, sự hấp thụ glucoza đã phụ thuộc tăng cường đáng kể và ở nồng độ phụ thuộc. Ngược lại, IGF11-16 không cho thấy hiệu quả đáng kể cho đến 100 nM. Các kết quả này đề xuất rằng hiệu quả hấp thụ glucoza của IGF11-16 trong các tế bào cơ khác biệt ở người là cực kỳ yếu.

Ví dụ 14: Tính hiệu quả ngoài cơ thể sống (hiệu quả của sự gia tăng khối lượng cơ ở chuột lang)

Để xác minh tính hiệu quả ngoài cơ thể sống của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I, IGF11-16 đã được đưa vào các con chuột lang trong một lần đưa vào,

và khối lượng cơ sau 2 tuần đã được đo để so sánh với hiệu quả khi IGF-I được đưa vào liên tục. Hiệu quả của việc gia tăng khối lượng cơ đã được xác định như hiệu quả gia tăng trọng lượng cơ của chuột lang từ 5% hoặc cao hơn so với hiệu quả của nhóm tiêu chuẩn so sánh.

IGF11-16 (0,03, 0,1 hoặc 0,3 mg/kg) đã được đưa vào các con chuột lang bình thường dưới da hoặc qua tĩnh mạch trong một lần đưa vào. IGF-I tái tổ hợp ở người (Mecasermin) là tiêu chuẩn so sánh tích cực đã được ấn vào dưới da bằng bơm thẩm thấu (Alzet) và được đưa vào liên tục với liều 1 mg/kg /ngày. Sau hai tuần kể từ khi đưa vào các tác nhân, các con chuột lang đã được an tử bằng việc hút hết máu dưới điều kiện mất cảm giác, và trọng lượng của các cơ đuôi dài các chân đã được đo. Các kết quả được minh họa trong Fig. 5.

Trong nhóm (iv) của việc đưa vào qua tĩnh mạch IGF11-16 với 0,03, 0,1 hoặc 0,3 mg/kg, khối lượng cơ đã tăng đáng kể và liều phụ thuộc, so với nhóm tiêu chuẩn so sánh đã xử lý duy nhất với dung môi. Ngay cả trong nhóm (sc) của việc đưa vào dưới da IGF11-16 ở 0,3 mg/kg, khối lượng cơ đã tăng đáng kể so với nhóm tiêu chuẩn so sánh.

Lượng cơ tăng lên trong các nhóm được đưa vào là 0,03 đến 0,3 mg/kg IGF11-16 trong một lần đưa vào tương đương với lượng cơ tăng lên trong nhóm (tiêm truyền) của việc đưa vào liên tục 1 mg/kg/ngày IGF-I tái tổ hợp ở người. Các kết quả chỉ ra rằng IGF11-16 cho thấy tính hiệu quả ngay cả ngoài cơ thể sống bằng việc đưa vào qua tĩnh mạch hoặc dưới da trong một lần đưa vào.

Điều đã được chứng minh rằng IGF11-16 cho thấy tính hiệu quả tương đương với tính hiệu quả bằng việc đưa IGF-I vào liên tục trong một lần đưa vào. Trong sử dụng lâm sàng, IGF-I (Mecasermin) được đưa vào một hoặc hai lần một

ngày. Ngược lại, IGF11-16 được đưa vào mỗi tuần một lần cho thấy tính hiệu quả ngoài cơ thể sống tương đương với tính hiệu quả trong sự đưa liên tục IGF-I vào, chỉ ra rằng IGF11-16 có độ bền tốt hơn so với IGF-I.

Ví dụ 15: Hiệu quả hạ đường huyết ngoài cơ thể sống (hiệu quả hạ đường huyết ở chuột lang)

Để xác minh xem liệu kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I có hiệu quả hạ đường huyết ngoài cơ thể sống hay không, IGF11-16 đã được đưa vào các con chuột lang trong một lần đưa vào, và các nồng độ đường huyết được đo theo thời gian và được so sánh với hiệu quả hạ đường huyết của IGF-I trong một lần đưa vào. Hiệu quả hạ đường huyết được xác định là hiệu quả hạ mức đường huyết xuống 50 mg/dL hoặc thấp hơn hoặc dẫn đến hạ đường huyết.

IGF-I được đưa vào dưới da của các con chuột lang một lần duy nhất, và hiệu quả hạ đường huyết đã được nghiên cứu. Các con chuột lang bị cho nhịn đói trong 12 giờ, và IGF-I tái tổ hợp ở người (Mecasermin) được đưa vào dưới da của các con chuột lang ở 0,3, 1, 3, và 10 mg/kg một lần duy nhất. Các con chuột lang bị cho nhịn đói trong 24 giờ sau khi đưa vào. Máu được thu thập từ các con chuột lang còn tỉnh trước sự đưa vào (0 giờ) và tại 1, 2, 4, 8, 10, và 24 giờ sau khi đưa vào và được đo nồng độ đường huyết với Glutest Sensor (Sanwa Kagaku Kenkyusyo). Các kết quả được minh họa trong Fig. 6.

IGF-I cho thấy hiệu quả hạ đường huyết đáng kể ở 0,3 mg/kg hoặc cao hơn. Sự hạ đường huyết đã được quan sát ở 1 mg/kg hoặc cao hơn. Sự tử vong đã được gây ra ở 3 mg/kg hoặc cao hơn.

IGF11-16 được đưa vào dưới da của các con chuột lang một lần duy nhất, và hiệu quả hạ đường huyết đã được nghiên cứu. Các con chuột lang bị cho nhịn đói

trong 12 giờ, và IGF11-16 đã được đưa vào dưới da của các con chuột lang ở 10, 30, và 100 mg/kg một lần duy nhất. Các con chuột lang bị cho nhịn đói trong 24 giờ sau khi đưa vào. Máu được thu thập từ các con chuột lang còn tỉnh trước khi đưa vào (0 giờ) và tại 2, 4, 8, 10, và 24 giờ sau khi đưa vào và được đo mức đường huyết bằng Glutest Sensor (Sanwa Kagaku Kenkyusyo). Các kết quả được minh họa trong Fig. 7.

IGF11-16 không cho thấy sự khác biệt đáng kể về mức đường huyết, thậm chí ngay trong nhóm mà đưa vào 100 mg/kg, so với nhóm tiêu chuẩn so sánh mà chỉ dung môi được đưa vào. Các kết quả chỉ ra rằng việc đưa IGF11-16 vào dưới da không có hiệu quả hạ đường huyết và không ảnh hưởng đến mức đường huyết.

IGF11-16 được đưa vào qua tĩnh mạch của các con chuột lang một lần duy nhất, và hiệu quả hạ đường huyết đã được nghiên cứu. Các con chuột lang bị cho nhịn ăn trong 12 giờ, và IGF11-16 được đưa vào qua tĩnh mạch của các con chuột lang ở mức 0,1, 1,5, 6, và 20 mg/kg. Các con chuột lang đã được nhịn ăn trong 24 giờ sau khi đưa vào. Máu được thu thập từ các con chuột lang còn tỉnh trước khi đưa vào (0 giờ) và tại 0,5, 1, 2, 4, 8, và 24 giờ sau khi đưa vào và được đo mức đường huyết bằng Glutest Sensor (Sanwa Kagaku Kenkyusyo). Các kết quả được minh họa trong Fig. 8.

IGF11-16 không cho thấy sự khác biệt đáng kể trong mức đường huyết, thậm chí ngay trong nhóm mà đưa vào 20 mg/kg, so với nhóm tiêu chuẩn so sánh mà chỉ dung môi được đưa vào. Các kết quả chỉ ra rằng việc đưa IGF11-16 vào qua tĩnh mạch cũng không có hiệu quả hạ đường huyết và không ảnh hưởng đến mức đường huyết.

IGF11-16 không có hiệu quả hạ đường huyết đáng kể ở cả việc đưa vào dưới da và qua tĩnh mạch, không giống như IGF-I, và không ảnh hưởng đến mức đường huyết, chỉ ra rằng IGF11-16 có khả năng là tác nhân khắc phục tác dụng phụ của IGF-I, hạ đường huyết.

Ví dụ 16: Tính hiệu quả ngoài cơ thể sống (hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng ở chuột lang)

Để xác minh tính hiệu quả ngoài cơ thể sống của kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I trên xương, hiệu quả này được so sánh với IGF-I được đưa vào liên tục và hormon tăng trưởng (GH) được đưa vào lặp lại mỗi ngày một lần. IGF11-16 được đưa vào các con chuột lang bị cắt bỏ tuyến yên một lần duy nhất. Sau hai tuần, độ dài của xương chày và độ dày của sụn đĩa tăng trưởng đã được đo như các chỉ số của hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng. IGF11-16 (0,3 mg/kg và 1 mg/kg) đã được đưa vào dưới da của các con chuột lang bị cắt bỏ tuyến yên một lần duy nhất. Như tiêu chuẩn so sánh, IGF-I tái tổ hợp ở người (Mecasermin) được ấn vào dưới da với bơm thẩm thấu (Alzet) và được đưa vào liên tục tại 1 mg/kg/ngày. Như tiêu chuẩn so sánh khác, GH tái tổ hợp ở người (Genotropin®) đã được đưa vào dưới da ở liều 1 mg/kg lặp lại mỗi ngày một lần. Sau hai tuần kể từ khi đưa tác nhân vào, các con chuột lang đã được an tử bằng việc hút hết máu dưới điều kiện mất cảm giác, và độ dày của sụn đĩa tăng trưởng của xương chày gần gốc và độ dài của xương chày đã được đo. Các kết quả được minh họa trong Fig. 9 và 10.

Trong nhóm (IGF11-16) mà có IGF11-16 được đưa vào dưới da ở 0,3 mg/kg và 1 mg/kg, độ dày của sụn đĩa tăng trưởng và độ dài của xương chày phụ thuộc vào liều lượng và kéo dài đáng kể cho thấy hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng, so với ở trong nhóm tiêu chuẩn so sánh (dung môi) mà trong đó các con chuột lang bị cắt bỏ tuyến yên được điều trị duy nhất bằng dung môi.

Hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng của nhóm dùng IGF11-16 một lần duy nhất ở 0,3 mg/kg tương đương với hiệu quả của nhóm đưa (IGF-I) được đưa vào liên tục của IGF-I tái tổ hợp ở người với 1 mg/kg/ngày. Hiệu quả thúc đẩy tăng trưởng của nhóm đưa vào IGF11-16 một lần duy nhất với 1 mg/kg tương đương với hiệu quả của nhóm (GH) đưa vào lặp lại GH tái tổ hợp ở người với 1 mg/kg/ngày. Các kết quả chỉ ra rằng việc đưa IGF11-16 vào một lần duy nhất cho thấy tính hiệu quả tương đương với hiệu quả của việc đưa IGF-I vào liên tục và với hiệu quả của việc đưa GH vào lặp lại mỗi ngày một lần. Trong sử dụng lâm sàng, IGF-I tái tổ hợp ở người (Mecasermin) và GH tái tổ hợp ở người (Genotropin®) được đưa vào bằng việc tiêm dưới da một hoặc hai lần mỗi ngày và sáu hoặc bảy lần mỗi tuần, tương ứng. Ngược lại, IGF11-16 được đưa vào một lần mỗi tuần cho thấy tính hiệu quả ngoài cơ thể sống tương đương với tính hiệu quả trong việc đưa IGF-I vào liên tục và tính hiệu quả trong việc đưa GH vào lặp lại liên tục mỗi ngày một lần, chỉ ra rằng IGF11-16 có độ bền tốt so với IGF-I và GH.

Ví dụ 17: Động lực học của IGF I và IGF11-16 trong máu

Động lực học của IGF-I trong máu

Các con chuột lang bị cho nhịn ăn trong 12 giờ, và IGF-I tái tổ hợp ở người được đưa vào dưới da của các con chuột lang ở 0,3, 1, 3, và 10 mg/kg. Các con chuột lang bị cho nhịn ăn trong 24 giờ sau khi đưa vào. Máu được thu thập từ các con chuột lang còn tỉnh trước khi đưa vào (0 giờ) và tại 1, 2, 4, 8, 10, và 24 giờ sau khi đưa vào. Nồng độ IGF-I ở người trong huyết tương đã được đo bằng ELISA (DG100, R & D). Các kết quả được minh họa trong Fig. 11.

Nồng độ IGF-I trong huyết tương đã tăng liều dùng phụ thuộc và, sau 24 giờ kể từ khi đưa vào, đã giảm xuống khoảng 50% nồng độ IGF-I tối đa trong huyết

tương. Trong nhóm 0,3 mg/kg, nồng độ IGF-I tại 24 giờ sau khi đưa vào thấp hơn giới hạn thấp của phép đo. Trong nhóm 10 mg/kg, các con chuột lang đã chết do sự hạ đường huyết sau 4 giờ kể từ khi đưa vào, và huyết tương không thể thu thập.

Động lực học của IGF11-16 trong máu

Các con chuột lang bị cho nhịn ăn trong 12 giờ, và kháng thể chất chủ vận thụ thể IGF-I được đưa vào dưới da của các con chuột lang ở 0,3, 1, 3, 10, 30, và 100 mg/kg. Các con chuột lang bị cho nhịn ăn trong 24 giờ sau khi đưa vào và sau đó được cho ăn lại. Máu được thu thập từ các con chuột lang còn tỉnh trước khi đưa vào (0 giờ) và tại 2, 4, 8, 10, 24, 48, và 72 giờ sau khi đưa vào. Nồng độ IGF11-16 trong huyết tương được đo bằng ELISA. Các kết quả được minh họa trong Fig. 12.

Nồng độ IGF11-16 trong huyết tương đã tăng liều phụ thuộc và nồng độ IGF11-16 trong huyết tương sau 48 giờ kể từ khi đưa vào đã được giữ ở khoảng 50% hoặc cao hơn nồng độ tại 24 giờ sau khi đưa vào, chỉ ra rằng động lực học của IGF11-16 trong máu là tốt trong độ bền so với động lực học của IGF-I.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Sáng chế có thể đề xuất kháng thể mà liên kết riêng với thụ thể IGF-I của động vật có xương sống, và bằng cách đó làm gia tăng khối lượng cơ hoặc độ dày của sụn đĩa đệm tăng trưởng thông qua thụ thể IGF-I, nhưng không làm giảm mức đường huyết. Do đó, sáng chế có thể được sử dụng trong việc điều trị, phòng ngừa, hoặc chẩn đoán các bệnh liên quan đến kháng thể kháng thụ thể IGF-I.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I (kháng thể kháng thụ thể IGF-I) hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó mà liên kết riêng với thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin dạng I thuần chủng ở người (thụ thể IGF-I thuần chủng ở người) có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 2 ở điểm liên kết chứa axit amin tại vị trí 315 và 316 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2, và thể hiện hoạt tính gây ra sự tăng trưởng của tế bào có nguồn gốc từ người,

trong đó kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó bao gồm trình tự axit amin chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-1 (CDR-H1), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 3 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-2 (CDR-H2), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 4 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nặng CDR-3 (CDR-H3), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 5 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-1 (CDR-L1), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 6

thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-2 (CDR-L2), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 7 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin;

vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR-3 (CDR-L3), có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 8 hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 8 thông qua sự thay thế, sự loại bỏ hoặc chèn vào bất kỳ một hoặc hai vị trí axit amin.

2. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm 1, mà liên kết với epitop có chứa ProSerGlyPheIleArgAsnGlySerGlnSerMet trong trình tự của miền CR của thụ thể IGF-I.

3. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 2, mà liên kết riêng với một thụ thể IGF-I thuần chủng của động vật được chọn từ khỉ, thỏ, chuột lang, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột to, hoặc chuột nhắt tại epitop có chứa ProSerGlyPheIleArgAsnX₁X₂GlnSerMet (trong đó X₁ biểu thị Gly hoặc Ser và X₂ biểu thị Ser hoặc Thr) trong trình tự axit amin của miền CR của thụ thể IGF-I của động vật này, và thể hiện hoạt tính gây ra sự tăng trưởng của tế bào của động vật này.

4. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3, mà có khả năng phản ứng chéo với

thụ thể IGF-I của người hoặc động vật không phải người bao gồm chuột lang, khỉ, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột to, hoặc chuột nhắt.

5. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 4, mà gây ra phản ứng kháng nguyên-kháng thể với cường độ ái lực ở hằng số phân ly cân bằng (KD) $1 \times 10^{-8} \text{M}$ hoặc thấp hơn.

6. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 đến 5, mà có ít nhất một trong các dấu hiệu sau:

1) thể hiện hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống;

2) thể hiện hoạt tính để gây ra sự tăng trưởng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài của cơ thể của động vật có xương sống;

3) không gây ra sự hấp thụ glucoza bởi các tế bào cơ khác biệt khi đưa vào cơ thể với liều lượng đủ để gây ra sự tăng trưởng của tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống; và

4) không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống với liều lượng đủ để gây ra sự gia tăng khối lượng cơ và/hoặc chiều dài cơ thể của động vật có xương sống.

7. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 đến 6, mà có ít nhất một trong các dấu hiệu sau:

1) ngăn cản sự tăng trưởng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống gây ra bởi IGF-I;

2) ngăn cản sự tăng sinh tế bào gây ra bởi IGF-I ở động vật có xương sống bị mắc bệnh tăng sinh tế bào;

3) không ảnh hưởng đến việc hấp thụ glucoza bởi các tế bào cơ khác biệt với liều lượng đủ để ngăn cản sự tăng trưởng tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống gây ra bởi IGF-I; và

4) không làm thay đổi mức đường huyết của động vật có xương sống bị bệnh tăng sinh tế bào với liều lượng đủ để ngăn cản sự tăng sinh tế bào gây ra bởi IGF-I ở động vật có xương sống.

8. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, mà là Fab, scFv, kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đồng đặc hiệu, hoặc dẫn xuất của chúng.

9. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm 1 chứa thêm chuỗi khung của globulin miễn dịch.

10. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm 9, trong đó chuỗi khung của globulin miễn dịch là chuỗi khung của mỗi lớp globulin miễn dịch ở người hoặc động vật không phải người bao gồm chuột lang, khỉ, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột nhắt, hoặc chuột lớn.

11. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 10, mà gồm một trình tự axit amin chứa:

vùng biến đổi chuỗi nặng, có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 9 hoặc trình tự axit amin có độ tương tự 90% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 9; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ, có trình tự axit amin được xác định trong SEQ ID NO: 10 hoặc trình tự axit amin có độ tương tự 90% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO: 10.

12. Kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 11 chứa thêm một vùng ổn định của mỗi lớp globulin miễn dịch ở người hoặc động vật không phải con người bao gồm chuột lang, khỉ, thỏ, bò, lợn, ngựa, cừu, chó, gà, chuột nhắt, hoặc chuột lớn.

13. Phân tử axit nucleic bao gồm chuỗi polynucleotit mã hóa kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12.

14. Vector nhân dòng hoặc vector biểu hiện chứa ít nhất một phân tử axit nucleic theo điểm 13.

15. Tế bào tái tổ hợp có nguồn gốc từ tế bào chủ thông qua sự chuyển nhiễm của vector theo điểm 14.

16. Quy trình sản xuất kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12, bao gồm:

nuôi cấy tế bào tái tổ hợp theo điểm 15; và

tinh chế kháng thể kháng thụ thể IGF-I, hoặc đoạn, hoặc dẫn xuất được sản xuất từ tế bào tái tổ hợp.

17. Dược phẩm chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12, phân tử axit nucleic theo điểm 13, vector theo điểm 14, hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm 15.

18. Dược phẩm theo điểm 17, chứa thêm thành phần hoạt tính phụ gia khác ngoài kháng thể kháng thụ thể IGF-I, hoặc đoạn, hoặc dẫn xuất theo điểm bất kỳ

trong số các điểm 1 đến 12, phân tử axit nucleic theo điểm 13, vector theo điểm 14, hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm 15.

19. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó thành phần hoạt tính là một hoặc nhiều thành phần được lựa chọn từ hormon tăng trưởng hoặc chất tương tự của chúng, insulin hoặc chất tương tự của chúng, IGF-II hoặc chất tương tự của chúng, kháng thể kháng myostatin, chất đối vận myostatin, kháng thể thụ thể loại IIB kháng activin, chất đối vận thụ thể loại IIB activin, thụ thể loại IIB activin có thể hòa tan hoặc chất tương tự của chúng, ghrelin hoặc chất tương tự của chúng, follistatin hoặc chất tương tự của chúng, chất chủ vận beta-2, và chất điều biến thụ thể hormon nam chọn lọc.

20. Dược phẩm theo điểm 18 hoặc 19, trong đó thành phần hoạt tính chứa một thành phần được lựa chọn từ nhóm bao gồm: corticosteroid, thuốc chống nôn mửa, hydroclorua ondansetron, hydroclorua granisetron, metoclopramid, domperidon, haloperidol, cyclizin, lorazepam, prochlorperazin, dexametason, levomepromazin, tropisetron, vắc-xin ung thư, chất ức chế GM-CSF, vắc-xin DNA GM-CSF, vắc-xin trên cơ sở tế bào, vắc-xin tế bào đuôi gai, vắc-xin virut tái tổ hợp, vắc-xin protein sốc nhiệt (HSP), vắc-xin u đồng đẳng, vắc-xin nguyên bào nhiễm, chất giảm đau, ibuprofen, naproxen, cholin magie trisalicylat, oxycodon hydroclorua, chất ức chế tạo mạch máu mới, chất chống đông máu, kháng thể kháng PD-1, nivolumab, pembrolizumab, kháng thể kháng PD-L1, atezolizumab, kháng thể kháng CTLA4, ipilimumab, kháng thể kháng CD20, rituximab, kháng thể kháng HER2, trastuzumab, kháng thể kháng CCR4, mogamulizumab, kháng thể kháng VEGF, bevacizumab, kháng thể kháng thụ thể VEGF, đoạn thụ thể VEGF có thể hòa tan, kháng thể kháng TWEAK, kháng thể kháng thụ thể TWEAK, đoạn thụ thể TWEAK có thể hòa tan, AMG 706, AMG

386, chất chống tăng sinh, chất ức chế enzyme truyền protein farnesyl, chất ức chế alpha v beta 3, chất ức chế alpha v beta 5, chất ức chế p53, chất ức chế thụ thể Kit, chất ức chế thụ thể ret, chất ức chế PDGFR, chất ức chế bài tiết hormon tăng trưởng, chất ức chế angiopoietin, chất ức chế đại thực bào thâm nhiễm khối u, chất ức chế c-fms, kháng thể kháng c-fms, chất ức chế CSF-1, kháng thể kháng CSF-1, đoạn c-fms có thể hòa tan, pegvisomant, gemcitabine panitumumab, irinotecan, và SN-38.

21. Thuộc y tế để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng gắn liền với IGF-I hoặc IGF-II, chứa kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12, phân tử axit nucleic theo điểm 13, vector theo điểm 14, hoặc tế bào tái tổ hợp theo điểm 15.

22. Phương pháp nuôi cấy các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống trong ống nghiệm, bao gồm việc cho tiếp xúc tế bào có nguồn gốc từ động vật với kháng thể kháng thụ thể IGF-I hoặc đoạn của nó hoặc dẫn xuất của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 12, phân tử axit nucleic theo điểm 13, vector theo điểm 14, và tế bào tái tổ hợp theo điểm 15 khi nuôi cấy các tế bào.

23. Phương pháp theo điểm 22, trong đó việc cho tiếp xúc đã nêu được thực hiện nhằm mục đích thúc đẩy tăng trưởng hoặc gây ra sự khác biệt của các tế bào có nguồn gốc từ động vật có xương sống.

24. Phương pháp theo điểm 22 hoặc 23, trong đó kháng thể kháng thụ thể IGF-I, đoạn, hoặc dẫn xuất được hấp phụ bởi, hoặc được giữ cố định với pha rắn.

FIG. 1

IGF1R_CHUỘT NHẤT	EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTIDWSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGD	180
IGF1R_CHUỘT TO	EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTIDWSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGD	180
IGF1R_NGƯỜI	EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGD	180
IGF1R_CHUỘT LANG	EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYIVGNKSPKECGD	180
IGF1R_THỎ	EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYIVGNKSPKECGD	180
	*****;*****;*****	
IGF1R_CHUỘT NHẤT	LCPGTLEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSVCGKRACTENNECCHPECLGSCH	240
IGF1R_CHUỘT TO	LCPGTLEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSVCGKRACTENNECCHPECLGSCH	240
IGF1R_NGƯỜI	LCPGTMEEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSTCGKRACTENNECCHPECLGSCH	240
IGF1R_CHUỘT LANG	LCPGTMEEEKPLCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSTCGKRACTEYQECCHPECLGSCH	240
IGF1R_THỎ	MCPGTLEEKPLCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPSTCGKRACTENNECCHPECLGSCH	240
	:***:***:***:*****;*****;***** :*****	
IGF1R_CHUỘT NHẤT	TPDDNTTCVACRHHYYKGVCPACPPGTYRFEGWRCVDRDFCANIPNAESSDSGDFVIHD	300
IGF1R_CHUỘT TO	TPDDNTTCVACRHHYYKGVCPACPPGTYRFEGWRCVDRDFCANIPNAESSDSGDFVIHD	300
IGF1R_NGƯỜI	APDNDTACVACRHHYYAGVCPACPPNTYRFEGWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHD	300
IGF1R_CHUỘT LANG	APDDDTACVACRHHYYAGVCPACPPGTYRFEGWRCVDRDFCANIPNAESSDSEGFVIHD	300
IGF1R_THỎ	APDDDTACVACRHHYYSGVCPACPPNTYRFEGWRCVDRDFCANIPNADGGDSEGFVIHD	300
	:*:*:*:*****:* :*****;*****;***** :*:.*:*****	
IGF1R_CHUỘT NHẤT	DECMQECPSGFIRNSTQSMYCIPEGPCPKVCGDEEEKTKTKIDSVTSAQMLQGCTILKGN	360
IGF1R_CHUỘT TO	DECMQECPSGFIRNSTQSMYCIPEGPCPKVCGDEEEKTKTKIDSVTSAQMLQGCTILKGN	360
IGF1R_NGƯỜI	DECMQECPSGFIRNGSQSMYCIPEGPCPKVCE-EEKTKTKIDSVTSAQMLQGCTIFKGN	359
IGF1R_CHUỘT LANG	DECMQECPSGFIRNGSQSMYCIPEGPCPKVCE-EEKTKTKIDSVTSAQMLQGCTIFKGN	359
IGF1R_THỎ	DECMQECPSGFIRNGSQSMFCIPEGPCPKVCE-EDKTKTKIDSVNSAQMLQGCTIFKGN	359
	:*****;***:*****;***** :*****;*****;***	

FIG. 2

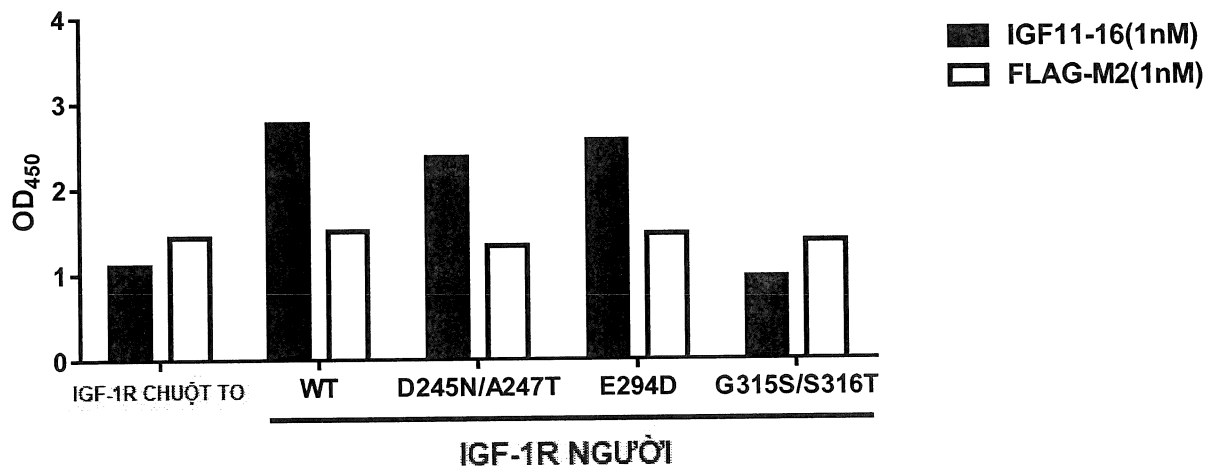


FIG. 3

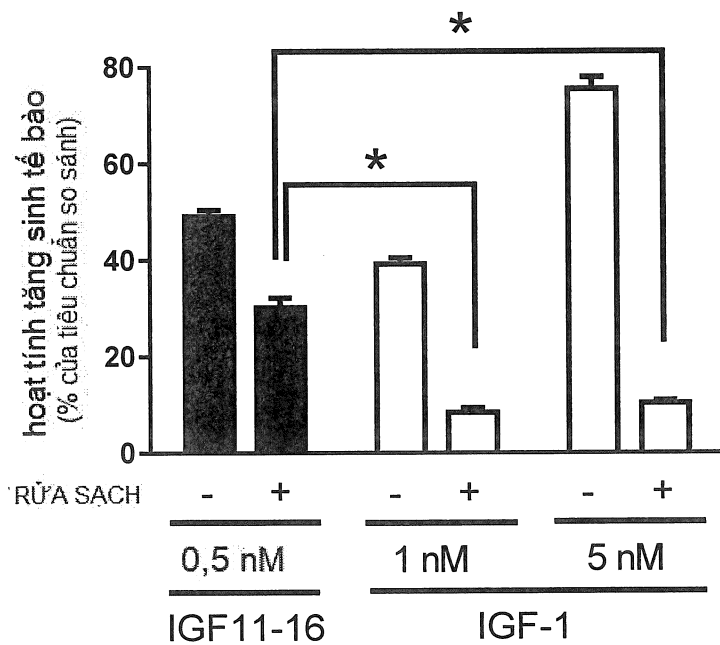
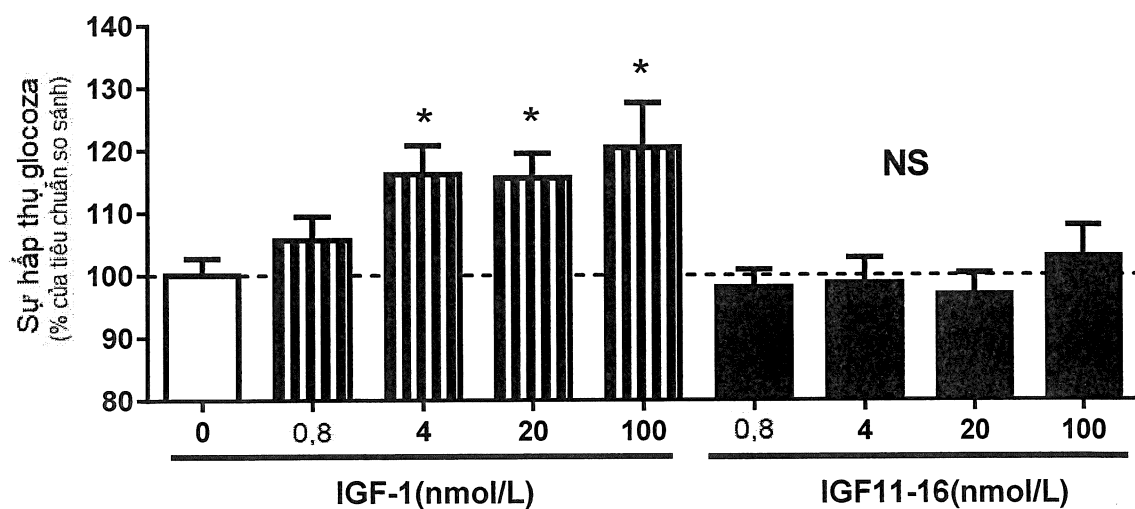


FIG. 4

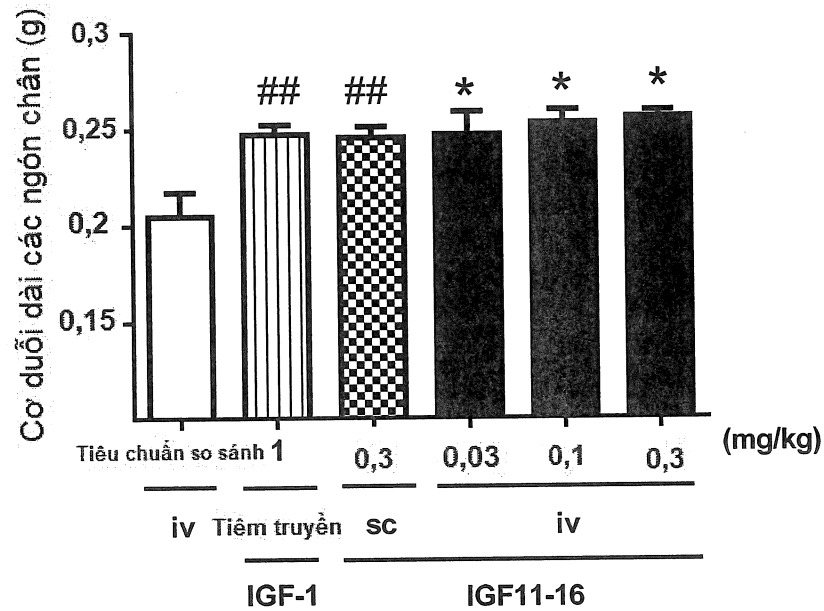


Các kết quả là các phương thức và SEM từ 3 thí nghiệm độc lập (n=10-16, n=2-8 trong mỗi thí nghiệm)

*: p<0,05, thử nghiệm Williams với tiêu chuẩn so sánh

NS: p>0,05, thử nghiệm Steel với tiêu chuẩn so sánh

FIG. 5

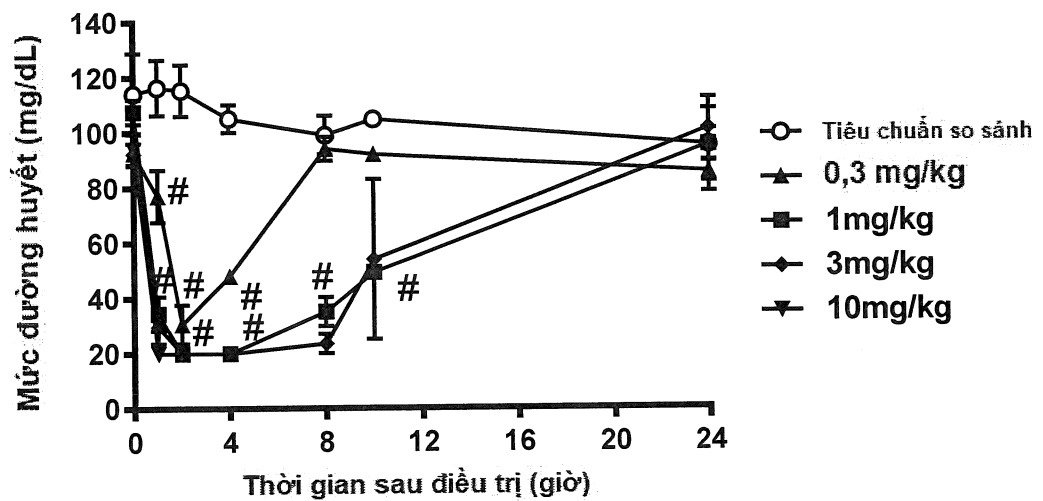


Phương thức, SEM, n=6-8

##: $p < 0,01$, thử nghiệm Dunnett với tiêu chuẩn so sánh

*: $p < 0,05$, thử nghiệm Shirley-Williams với tiêu chuẩn so sánh

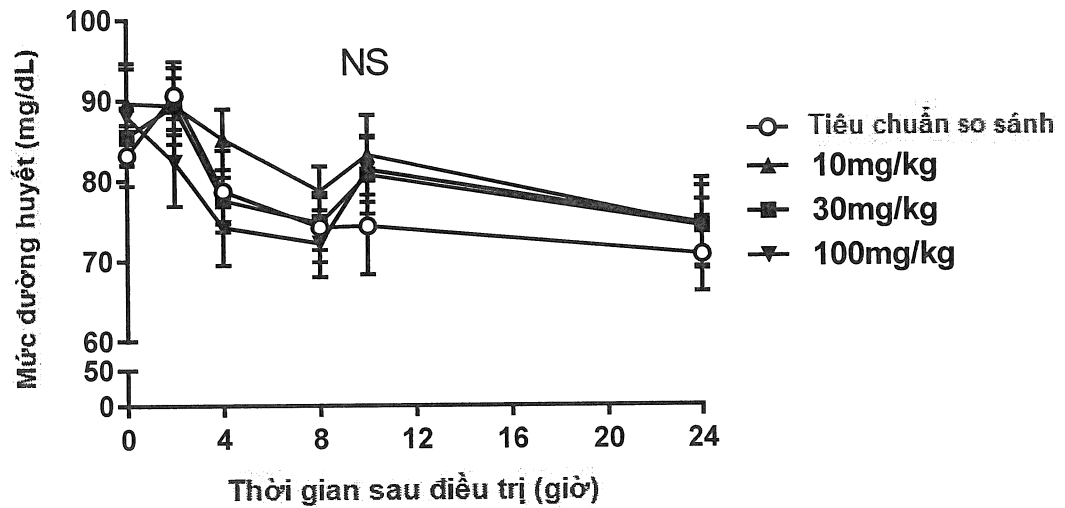
FIG. 6



Phương thức, SEM, n=2-3

#: $p < 0,05$, phân tích ANOVA hai yếu tố với tiêu chuẩn so sánh

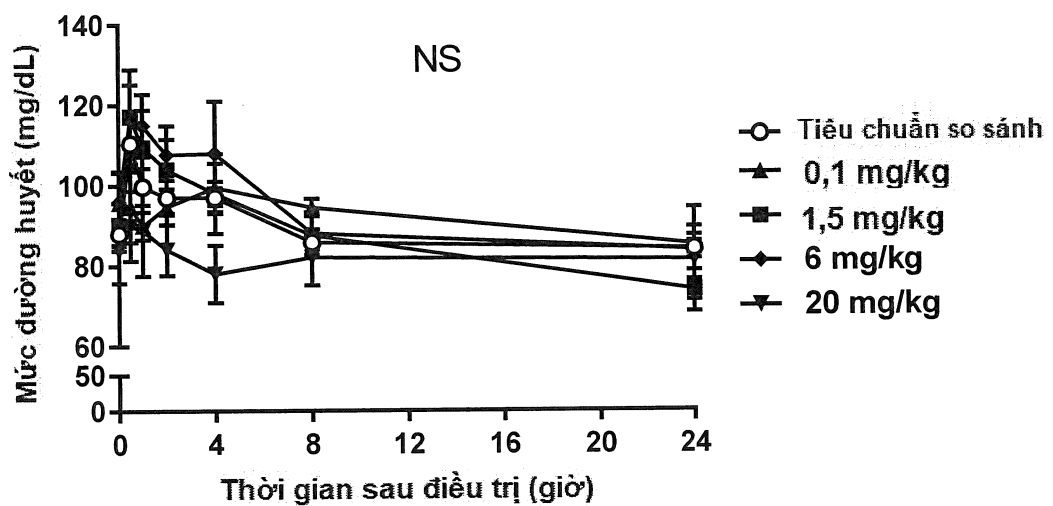
FIG. 7



N=6, Phương thức, SEM

NS: $p > 0,05$, phân tích ANOVA hai yếu tố với tiêu chuẩn so sánh

FIG. 8



Phương thức, SEM, n=3-4

NS: $p > 0,05$, phân tích ANOVA hai yếu tố với tiêu chuẩn so sánh

FIG. 9

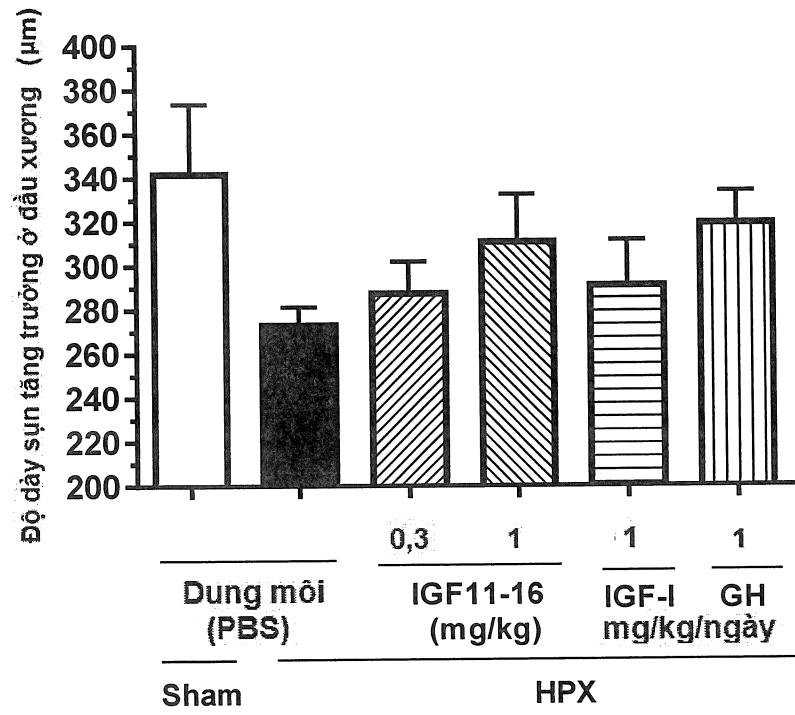


FIG. 10

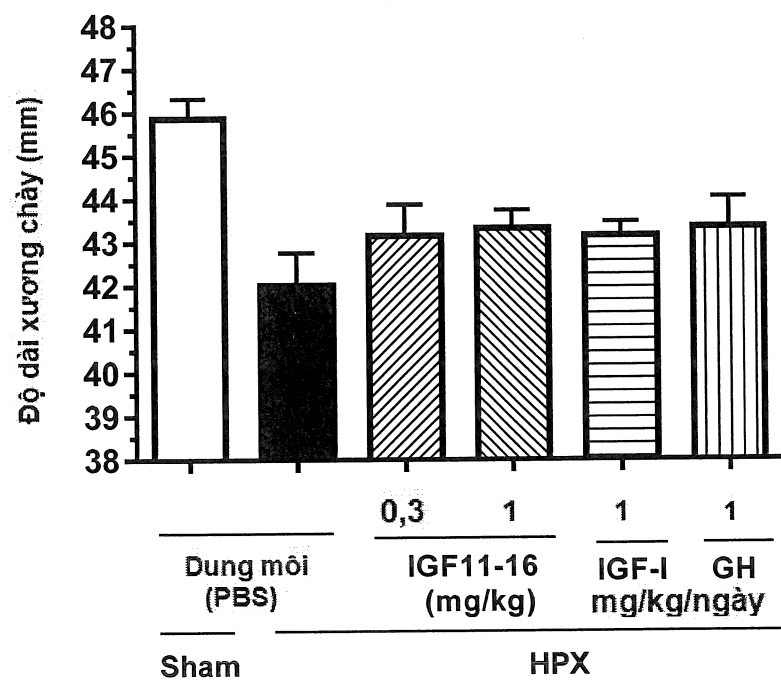


FIG. 11

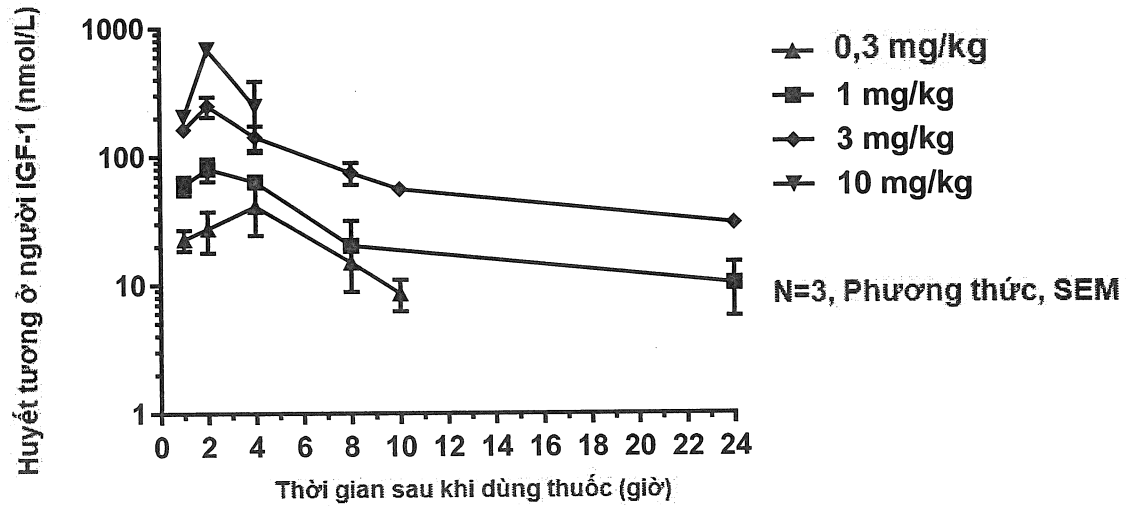
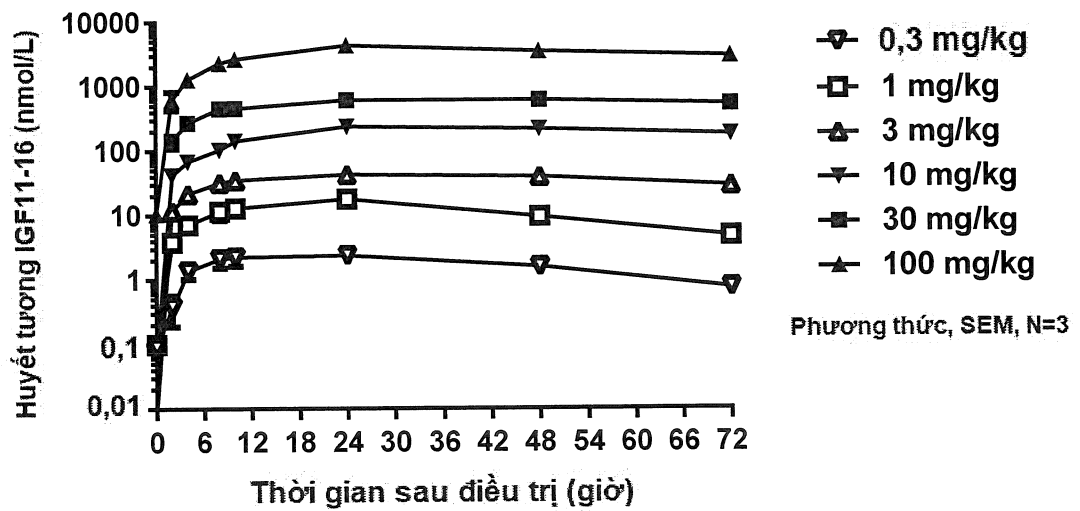


FIG. 12



TRÌNH TỰ LIỆT KÊ

<110> Teijin Pharma Limited

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG THỤ THỂ YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG TƯƠNG TỰ INSULIN DẠNG I (IGF-I), QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P46138

<160> 30

<170> Sáng chế phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Người tinh khôn

<400> 1

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

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

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

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

Lys	Pro	Ala	Lys	Ser	Ala
65					70

<210> 2

<211> 1367

<212> PRT

<213> Người tinh khôn

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhất nhà

<400> 3

Ser Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nhất nhà

<400> 4

Glu Thr Asn Pro Ser Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Chuột nhất nhà

<400> 5

Gly Arg Gly Arg Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 7

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 8

Leu Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 9

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Thr Asn Pro Ser Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Ile Gly Arg Gly Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 10

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

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

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

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

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

Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Gly	Gln	Ser	Tyr	Pro	Tyr
				85					90				95		

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

<210> 11

<211> 1367

<212> PRT

<213> Chuột lang nhà

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 1367

<212> PRT

<213> Khử đuôi dài

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 1426

<212> PRT

<213> Thỏ châu Âu

<400> 13

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Arg Thr Ser Ala Trp Gly Leu
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Gly Arg Asn Gly Thr Ala Val Asp Met Tyr Asn Ser Thr Asp
755 760 765

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ala Glu Leu Gln Arg Glu Arg Gln Arg Gln Arg Gln Asn Phe
1100 1105 1110

Ile Arg Arg Phe Ala Pro Arg Met Ala Ala Thr Ala Arg Ala Gly
1115 1120 1125

Pro Gly Arg Ser Gln Gln Pro Gly Ala Ser Ser Gly Ser Pro Thr
1130 1135 1140

Arg Val Gln Gly Pro Lys Asp Leu Gly His Leu Pro Leu Pro Ser
1145 1150 1155

Gln Asn Arg Ala Pro Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile Gln
1160 1165 1170

Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala Asn
1175 1180 1185

Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala
1190 1195 1200

Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg Asp
1205 1210 1215

Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu Leu
1220 1225 1230

Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val Phe
1235 1240 1245

Thr Thr His Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu
1250 1255 1260

Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Phe Ser Asn Glu
1265 1270 1275

Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys Pro
1280 1285 1290

Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys Trp
1295 1300 1305

Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile Gly
1310 1315 1320

Ser Val Arg Asp Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser Phe
1325 1330 1335

Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Pro Pro Glu Ala Glu Glu Leu Asp
1340 1345 1350

Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser Ala
1355 1360 1365

Asn Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Leu Gln Pro Asp Arg His Lys
1370 1375 1380

Ala Glu Asn Gly Pro Ser Ala Gly Ala Met Val Leu Arg Ala Ser
1385 1390 1395

Phe Asp Glu Arg Arg Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg Thr
1400 1405 1410

Asp Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
1415 1420 1425

<210> 14

<211> 1370

<212> PRT

<213> Chuột nâu

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys
1370

<210> 15

<211> 1369

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Ala Ser Ser Ala Ser Leu Pro Leu Pro Glu Arg His Ser
 1310 1315 1320

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

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

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

Cys

<210> 16

<211> 4128

<212> ADN

<213> Người tinh khôn

<400> 16

atgaagtctg gctccggagg agggctccccg acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc	60
gccgcgctct cgctctggcc gacgagtgga gaaatctgcg ggccaggcat cgacatccgc	120
aacgactatc agcagctgaa ggcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac	180
atcctgtca tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gtttcccaa gtcacggtc	240
attaccgagt acttgctgct gtccgagtg gctggcctcg agagcctcgg agacctcttc	300
cccaacctca cggcatccg cggctggaaa ctcttctaca actacgccct ggtcatcttc	360
gagatgacca atctcaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcggggggcc	420
atcaggattg agaaaaatgc tgacctctgt tacctctcca ctgtggactg gtccctgatc	480
ctggatgagg tgtccaataa ctacatttg ggaataaagc ccccaaagga atgtggggac	540
ctgtgtccag ggaccatgga ggagaagccg atgtgtgaga agaccaccat caacaatgag	600
tacaactacc gctgtggac cacaaaccgc tgccagaaaa tgtgccaag cacgtgtggg	660
aagcgggagt gcaccagaaa caatgagtgc tgccaccccg agtgccctggg cagctgcagc	720
ggcctgaca acgacacggc ctgtgtagct tgccgccact actactatgc cgggtgtctgt	780
gtgcctgcct gccgccccaa cacctacagg tttagggct ggcgctgtgt ggaccgtgac	840
ttctgcgcca acatcctcag cgccgagagc agcgactccg aggggtttgt gatccacgac	900
ggcgagtga tgcaggagtg cccctgggc ttcacccga acggcagcca gagcatgtac	960
tgcatccctt gtgaaggctc ttgccgaag gtctgtgagg aagaaaagaa aacaaagacc	1020

attgattctg ttacttctgc tcagatgctc caaggatgca ccatcttcaa gggcaatttg	1080
ctcattaaca tccgacgggg gaataacatt gcttcagagc tggagaactt catggggctc	1140
atcgaggtagg tgacgggcta cgtgaagatc cgccattctc atgccttggt ctccctgtcc	1200
ttcctaataaa accttcgcct catcctagga gaggagcagc tagaaggga ttactccttc	1260
tacgtcctcg acaaccagaa ctigcagcaa ctgtgggact gggaccaccg caacctgacc	1320
atcaaagcag ggaaaatgta ctttgctttc aatcccaa atgtgtgttc cgaaatttac	1380
cgcattggagg aagtgcggg gactaaagg cgccaaagca aaggggacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg agagagcctc ctgtgaaagt gacgtcctgc atttcacctc caccaccacg	1500
togaagaatc gcatcatcat aacctggcac cggatccggc cccctgacta cagggatctc	1560
atcagcttca ccgtttacta caaggaagca ccccttaaga atgtcacaga gtatgatggg	1620
caggatgcct gggctccaa cagctggaac atggtggacg tggacctccc gcccaacaag	1680
gacgtggagc ccggcatctt actacatggg ctgaagccct ggactcagta cgccgtttac	1740
gtcaaggctg tgacctcac catggtggag aacgaccata tccgtggggc caagagtga	1800
atcttgtaca ttgcaccaa tgcttcagtt ccttcattc ccttgacgt tctttcagca	1860
tcgaactcct ctctcagtt aatcgtgaag tggaaccctc cctctctgcc caacggcaac	1920
ctgagttact acatttgtcg ctggcagcgg cagcctcagg acggctacct ttaccggcac	1980
aattactgct ccaaagacaa aatccccatc aggaagtatg ccgacggcac catcgacatt	2040
gaggaggtca cagagaaccc caagactgag gtgtgtggtg gggagaaagg gccttgctgc	2100

gcctgcccc aaactgaagc cgagaagcag gccgagaagg aggaggctga ataccgcaaa	2160
gtctttgaga atttcctgca caactccatc ttctgtccca gacctgaaag gaagcggaga	2220
gatgtcatgc aagtggccaa caccaccatg tccagccgaa gcaggaacac cacggccgca	2280
gacacctaca acatcaccga cccggaagag ctggagacag agtacccttt ctttgagagc	2340
agagtggata acaaggagag aactgtcatt tctaaccttc gccctttcac attgtaccgc	2400
atcgatatcc acagctgcaa ccacgaggct gagaagctgg gctgcagcgc ctccaacttc	2460
gtctttgcaa ggactatgcc cgcagaagga gcagatgaca ttcttgggcc agtgacctgg	2520
gagccaaggc ctgaaaactc catcttttta aagtggccgg aacctgagaa tccaatgga	2580
ttgattctaa tgtatgaaat aaaatacggg tcacaagttg aggatcagcg agaattgtgtg	2640
tccagacagg aatacaggaa gtatggaggg gccaaagctaa accggctaaa cccggggaac	2700
tacacagccc ggattcaggc cacatctctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg	2760
ttcttctatg tccaggccaa aacaggatat gaaaacttca tccatctgat catcgctctg	2820
cccgtcgtg tctgttgat cgtgggaggg ttggtgatta tgctgtacgt ctccataga	2880
aagagaaata acagcaggct ggggaatgga gtgctgtatg cctctgtgaa cccggagtac	2940
ttcagcgtg ctgatgtgta cgttctgat gagtgggagg tggctcggga gaagatcacc	3000
atgagccggg aacttgggca ggggtcgttt gggatggtct atgaaggagt tgccaagggt	3060
gtggtgaaag atgaacctga aaccagagtg gccattaaaa cagtgaacga ggccgcaagc	3120
atgcgtgaaa ggattgagtt tctcaacgaa gcttctgtga tgaaggagtt caattgtcac	3180

catgtggtgc gattgctggg tgtggtgtcc caaggccagc caacactggt catcatggaa	3240
ctgatgacac ggggcgatct caaaagtat ctccggtctc tgaggccaga aatggagaat	3300
aatccagtcc tagcacctcc aagcctgagc aagatgattc agatggccgg agagattgca	3360
gacggcatgg catacctcaa cgccaataag ttctgtccaca gagaccttgc tgcccggaa	3420
tgcatggtag ccgaagattt cacagtcaaa atcggagatt ttggtatgac gcgagataac	3480
tatgagacag actattaccg gaaaggaggg aaagggtgctc tgcccgctgc ctggatgtct	3540
cctgagtccc tcaaggatgg agtccttcacc acttactcgg acgtctggtc ctccggggtc	3600
gtcctctggg agatcgccac actggccgag cagccctacc agggcttgtc caacgagcaa	3660
gtccttcgct tcgtcatgga gggcggcctt ctggacaagc cagacaactg tcctgacatg	3720
ctgtttgaac tgatgcgcat gtgctggcag tataacccca agatgaggcc ttccttcctg	3780
gagatcatca gcagcatcaa agaggagatg gaggcctggc tccgggaggt ctcttctac	3840
tacagcgagg agaacaagct gcccgagccg gaggagctgg acctggagcc agagaacatg	3900
gagagcgtcc ccttggaacc ctccgacctc tcgtcctccc tgccactgcc cgacagacac	3960
tcaggacaca aggccgagaa cggccccggc cctgggggtgc tggctcctcg cgccagcttc	4020
gacgagagac agccttacgc ccacatgaac gggggccgca agaacgagcg ggccttgccg	4080
ctgccccagt ctccgacctg cgattataag gatgacgatg acaagtag	4128

<210> 17

<211> 4128

<212> ADN

<213> Chuột lang nhà

<400> 17

atgaagtctg gctccggagg aggggtcccg acctogctgt gggggctcct gtttctctct	60
gctgcgctct cgctctggcc gacgagtgga gaaatctgtg ggccgggcat cgacatccgc	120
aatgactatc agcagctaaa acgcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac	180
atcctgtctc tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gtttcccaa gtcaccgtc	240
atcaccgagt acttgctgct gttccgggtc gctggcctcg agagcctcgg agacctcttc	300
ccgaacctca ccgtcatccg cggctggaaa ctctttata actacgccct ggtcatcttc	360
gagatgacca acctgaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac toggggggcc	420
atcaggattg agaagaatgc tgacctgtgc tacctctcca cagtggactg gtogctgac	480
ctggatgogg tgtccaataa ctacattgtg gggaacaagt ccccaaagga atgtggagac	540
ctgtgtccag ggaccatgga ggagaaacca ttgtgcgaga agaccaccat caacaatgag	600
tacaactacc gctgtggac cacaatcgc tgccagaaaa tgtgccaag tgccctgagg	660
aagcgtgctg gcaccgagta ccaggagtgc tgccatcctg agtgccctgg cagctgccat	720
gcacccgacg acgacacggc ctgtgtggcc tgcagacact tctactatgc tggcatctgc	780
gtgcccgcct gtccaccggc cacctaccgc ttcgagggtc ggcgtgtgt gcaccgagac	840
ttctgcgcca acatccccaa tgctgagagc agtgactccg agggcttcgt catccatgac	900
ggggagtgca tgcaggagtg tccctcgggc ttcatccga acggcagcca gagcatgtac	960

tgcatccctt gtgaaggtcc ttgccccaaag gtctgcgagg aagaaaagaa gacgaaaacc	1020
attgactctg tgacttctgc tcagatgctc caaggggtgca ccatcttcaa gggcaacctg	1080
ctcattaata tccgacgggg caataacatt gcgtcggaac tggagaactt catggggctc	1140
attgagggtg tgactggcta cgtgaagatc cgccattccc atgccttggt ctcttgtcc	1200
ttcctgaaaa accttcgcct gatcctgggg gaggagcagc tggaaaggaa ctactcctc	1260
tacgtcctgg acaaccagaa cctgcagcag ctgtgggatt gggaccaccg caacctcacc	1320
atcaaatctg ggaagatgta ctttgctttc aatcccaaac tgttgtctc tgaatttac	1380
cgcatggaag aagtgcggg gacgaaagg cgccagagca aaggggacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg aacgagcctc ctgtgaaagt gacgtattgc gtttcacctc caccaccaca	1500
tcgaagaacc gcattatcat cacctggcac cggtagcggc cccagacta cagggatctc	1560
atcagcttca ctgtttacta caaggaggca ccgtttaaaa atgtcaccga gtatgatggg	1620
caggatgctt gtggctccaa cagttggaac atggtggacg tggacctgcc tcctaacaag	1680
gacgcggagc ctggcatcct actgcatggg ctgaagccct ggacacagta cgcggtctat	1740
gtcaaggccg tgacctcac catggtagag aacgaccaca tccgtggggc caagagtga	1800
atcttgtaca ttgcaccaa tgcttcagtt ccttcattc ccctggatgt ccttcggca	1860
tccaactcct cttctcagct catcgtcaag tggaaccccc catctctgcc caacggaaac	1920
ctgagttatt atatcgtgcg gtggcagcgg cagcctcagg acagctacct ataccggcac	1980
aattactgct ccaaagacaa aatccccatc agaaagtatg cggatggcac catcgatgtc	2040

gaagaggtca ccgagaaccc caagactgaa gtatgtggtg gcgagaaagg gccttgctgc	2100
gcttgcccca aaaccgaagc cgagaagcag gccgagaagg aggaggccga gtaccggaaa	2160
gtgtttgaga atttcctgca caactccatc ttcgtgccga ggcttgaaag gaggcggcga	2220
gatgttgccg agatggccaa caccaccatg tccagccgca gcaggaacac cacggtggct	2280
gataoctaca atgccacaga tccagaggag ctagagaccg aatacccctt ctttgagagc	2340
agagtggata acaaggaaag aactgtaatt tcaaacctcc ggccctttac ctgtaccgc	2400
attgacatcc acagctgtaa ccatgaggct gagaagctgg gctgcagcgc ttctaacttt	2460
gtttttgcaa gaaccatgcc cgcagaagga gcagatgaca ttcttgccc ggtgacgtgg	2520
gaagcaaggc ctgaaaactc catcttttta aagtggccag agcctgagaa tctaattgga	2580
ttgattctaa tgtacgaaat aaaatacggg tcacaagttg aggatcagcg agaattgtgtg	2640
tccagacagg aatacaggaa atacggagg gccaaagctta gccggctaaa cccagggaac	2700
tatacagccc ggattcaagc tacctcgctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg	2760
tttttctatg tcccagccaa aacaacgtat gaaaacttca tccatctgat catcgctctg	2820
ccagtcgcca tcctgttgat tgtggcaggc ttggcgataa tgctgtacgt cttccatagg	2880
aagagaaaca gcagcaggct ggggaatgga gtgtgttac cctctgtgaa cccggagtac	2940
ttcagtgtg cggatgtgta cgttcctgat gaggggagg tagcgcgaga gaagatcacc	3000
atgagccggg agctggggca aggctccttt gggatggtct acgaaggagt ggctaaaggt	3060
gtggtgaaag acgagcctga gaccgggta gccatcaaga cagtgaacga ggccgcaagc	3120

atgcgtgaaa ggatcgagtt tctcaatgag gcctctgtga tgaaggagtt caactgtcat	3180
catgtggtgc gactgctagg cgtggtgtcc cagggccagc ccacactggt catcatggag	3240
ctgatgacgc ggggggatct caagagctat ctcaggcttt tgaggccgga agtagagaat	3300
agcccatcc tggcacctcc aagcctcagc aagatgatcc agatggccgg agagattgca	3360
gatggcatgg catacctcaa cgccaacaag tttgtccaca gagaccttgc tgcccgcaat	3420
tgcatggtag ctgaagattt cacagtcaaa attggagatt ttgggatgac gogagatatt	3480
tacgagacag actactaccg gaaaggaggg aaagggtgc tgctgtgcg ctggatgtct	3540
cctgagtccc tcaaggatgg agtcttcacc actcattcgg acgtctggtc cttcggggtc	3600
gtcctctggg agatcgccac gctggctgag cagccatacc agggcttgtc caacgagcaa	3660
gtccttcgct tcgtcatgga ggggtgcctc ctggacaaac ccgacaactg ccagacatg	3720
ctgtttgagc tgatgcgcat gtgtggcag tacaaccca agatgaggcc ttccttcctg	3780
gagatcatca gcagcgtcaa agacgagctg gaggccggt tccgggaggt ctcttctac	3840
tacagcgagg agaacaagcc gcccgagccg gaggagctgg acctggagcc cgagaacatg	3900
gagagcgtcc cgctggaccc atcagcctcc tcgtctccc tgccgccgcc cgacagacac	3960
tcaggacaca agggcgagaa cggcccgggc cccggcgtgc tggctgtccg cgccagcttc	4020
gacgagagac agccttacgc gcacatgaac ggaggccgca cgaacgagag ggccttgccg	4080
ctgccccagt cgtcaacctg cgattataag gatgacgatg acaagtga	4128

<210> 18

<211> 4128

<212> ADN

<213> Khỉ đuôi dài

<400> 18

atgaagtctg gctctggaga agggccccg acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc	60
gccgcgctct cgctctggcc gacgagtgga gaaatctgtg ggccgggcat cgacatccgc	120
aacgactatc agcagctgaa ggcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac	180
atcctgtctca tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gcttccccaa gtcacggtc	240
atcaccgagt acttgcgtgtt gttccgagt gctggcctag agagcctcgg agacctgttc	300
cccaacctca cggtaatccg cggctggaaa ctcttctaca actacgccct ggtcatcttt	360
gagatgacca atctcaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcggggggcc	420
atcaggattg agaaaaatgc tgacctctgt tacctctcca ctgtggactg gtccctgac	480
ctggatgcag tgtccaataa ctacattgtg gggaataagc ccccaaagga atgcggggac	540
ctgtgtccgg ggaccatgga ggagaagccg atgtgcgaga agaccaccat caacaatgag	600
tacaactacc gctgtggac cacaaaccgc tgccagaaaa tgtgcccagag tgcctgtggg	660
aagagggcat gcaccagaaa caacgagtgc tgccacccc agtgcctggg cagctgcagc	720
ggcctgaca acgacacggc ctgtgtagct tgccgccact actactacgc cgggtgtctgc	780
gtgcctgcct gccgccccaa cacctacagg tttagaggct ggcgctgtgt ggaccgtgac	840
ttctgcgcca acatcctcag tgccgagagc agcgactccg agggtttcgt gatccacgac	900
ggcgagtgca tgcaggagtg cccctcaggc ttcacccgca acggcagcca gagcatgtac	960

tgcatccctt gtgaaggctc ttgccccaaag gtctgtgagg aagaaaagaa aacaaagacc	1020
attgattctg ttacttctgc tcagatgctt caaggatgca ccatcttcaa gggcaatttg	1080
ctcattaaca tccgacgggg gaataacatt gcttcagaac tggagaactt catggggctc	1140
atcgagggtg tgacgggcta cgtgaagatc cgccattccc atgccttggt ctccttgctc	1200
ttcctaaaaa accttcgcct catcttagga gaggagcagc tagaaggga ttactccttc	1260
tacgtcctcg acaaccagaa ctgacagcaa ctatgggact gggaccaccg caacctgacc	1320
atcaaagcag gaaaaatgta ctttgctttc aatcccaa atgtgtgtttc ggaaatttac	1380
cgcatggagg aagtgcggg gactaaagg cgccaaagca aaggggacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg aaagagcctc ctgtgaaagt gacgtcctgc atttcacctc caccaccag	1500
tggaagaatc gcatcatcat aaacctggcac cggtaccggc cccctgacta cagggatctc	1560
atcagcttca ccgtttacta caaggaagca ccttttaaga atgtcacgga gtatgatggg	1620
caggatgcct gcggctccaa cagctggaac atggtggacg tggacctccc gcccaacaag	1680
gacgtggagc ccggcatctt actgcatggg ctgaagccct ggactcagta cgccgtttac	1740
gtcaaggctg tgacctcac catggtggag aacgaccata tccgtggggc caagagtga	1800
atcttgtaca ttgcaccaa tgcttcagtt ccttcattc ccttgacgt tctttcagca	1860
tcgaactcct cttctcagtt aatcgtgaag tggaaccctc cctctctgcc caacggcaac	1920
ctgagttact acattgtgcg ctggcagcgg cagcctcagg acggctacct ttaccggcac	1980
aattactgct ccaaagacaa aatccccatc aggaagtatg ccgacggcac cattgacatt	2040

gaggagggtca cagagaaccc gaagactgag gtgtgtggtg gagagaaagg gccttgctgc	2100
gcctgcccc aactgaagc tgagaagcag gccgagaagg aggaggctga gtaccgcaaa	2160
gtctttgaga atttctgca caactccatc tttgtgcca gacctgaaag gaagcggaga	2220
gatgtcatgc aagtggccaa caccaccatg tccagccgaa gcaggaacac cacggtggca	2280
gacacctaca acatcacaga tctggaagag ctagagacag agtacccttt ctttgagagc	2340
agagtggata ataaggagag aactgtcatt tctaaccttc ggcctttcac attgtaccgc	2400
attgatatcc acagctgcaa ccacgaggct gagaaactgg gctgcagcgc ctccaacttt	2460
gtctttgcaa ggactatgcc tgcagaagga gcagatgaca ttcctgggcc agtgacctgg	2520
gagccaaggc ctgaaaactc catcttttta aagtggccag aacctgagaa tcccaatgga	2580
ttgattctaa tgtatgaaat aaaatacggg tcacaagttg aggatcagcg agaattgtgtg	2640
tccagacagg aatacaggaa gtatggaggg gccaaagctaa accggctaaa cccggggaac	2700
tacacagccc ggattcaggc tacatctctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg	2760
ttcttctatg tccaggccaa aacaggatac gaaaacttca tccatctgat catcgctctg	2820
cccgtcgtg tcctgttgat cgtgggaggg ttggtgatca tgctgtacgt cttccataga	2880
aagagaaata acagcaggct ggggaatgga gtgctgtacg cgtctgtgaa cccggagtac	2940
ttcagcgctg cggatgtgta cgttctgat gagtgggagg tggctcgga gaagatcacc	3000
atgagccggg aacttgggca ggggtcgttt gggatggtct atgaaggagt tgccaagggt	3060
gtggtgaaag acgaacctga aaccagagtg gccattaaaa cagtgaacga ggccgcgagc	3120

atgcgtgaaa ggatcgagtt tctcaacgag gcttctgtga tgaaggagtt caattgtcac	3180
catgtggtgc ggttgctggg tgtggtgtcc cagggccagc caacgctggt catcatggaa	3240
ctgatgacgc ggggcgatct caaaagttat ctccggtctc tgaggccaga aatggagaat	3300
aatccagtcg tagcacctcc aagcctaagc aagatgattc agatggctgg agagattgca	3360
gacggcatgg catacctcaa cgccaacaag ttctgccaca gagaccttgc tgcccggaa	3420
tgcattgtag ccgaggattt cacagtcaaa attggagatt ttgggatgac gcgagatato	3480
tatgagacag actattaccg gaaaggaggg aaagggtgtg tgcccgctgc ctggatgtct	3540
cccaggtccc tcaaggatgg agtcctcacc acttactcgg acgtctggtc ctccggggtt	3600
gtctcttggg agatcgccac actggccgag cagccctacc agggcttgtc caacgagcaa	3660
gtctttcgtc tcgtcatgga gggcggcctt ctggacaagc cagacaactg ccccgacatg	3720
ctgtttgaat tgatgcgcat gtgctggcag tacaacccca agatgaggcc ttccttcctg	3780
gagatcatca gcagcatcaa agacgagatg gagcctggct tccgggaggt ctctttctac	3840
tacagtgagg agaacaagct gcccgagccg gaggagctgg acctggagcc agagaacatg	3900
gagagcgtcc ccctggaccc ctccgacctc tctctctccc tgccactgcc cgacagacac	3960
tcaggacaca aggccgagaa cggccccggc cctggagtgc tgggtgctcg cgccagcttc	4020
gatgagagac agccttacgc acacatgaac ggtggccgca agaacgagcg ggccttgccg	4080
ctgccccagt ctccgacctg cgattataag gatgacgatg acaagtga	4128

<210> 19

<211> 4302

<212> ADN

<213> Thỏ châu Âu

<400> 19

atgaagtctg gctccggagg aggggtcccgg acctcggcgt gggggctcct gtttctctcc	60
gcccgcgtct cggctctggcc gacgagtgga gaaatctcgc ggccgggcat cgacatccgc	120
aatgacttcc agcagctgaa gcgcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctctctccac	180
atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgcaactacc gcttcccaa gctcaccgtc	240
atcaccgagt acctgctgct gttccgcgtg gccggcctgg agagcctcgg ggacctgttc	300
cccaacctca cggtcacccg cggctggaag ctcttctaca actatgccct ggtcattttc	360
gagatgacta acctcaaaga catagggctc tataacctga ggaacatcac ccggggggcc	420
atcaggatcg agaagaacgc cgacctctgc tacctctcca cgggtggactg gtctctcatc	480
ctggacgccg tgtccaacaa ctacattgtg gggaacaagt ccccaaagga gtgcggggac	540
atgtgtccag ggaccttga ggagaagccg ttgtgcgaga agaccgccat caacaacgag	600
tacaactacc gctgctggac caccaaccgc tgccagaaaa tgtgccccag cgcgtgcggg	660
aagcgggcat gcaccagaaa caacgaatgc tgccaccccg agtgccctggg cagctgccac	720
gcgcctgacg acgacacggc ctgcgtcgcc tgccgccact actattttctc cggcgtctgc	780
gtgccgcct gcccgcccaa cacctaccga ttcgagggtt ggcgctgcgt ggaccgcgac	840
ttctgcgcca acatccctaa cgccgatggc ggcgactccg agggctttgt catccacgac	900

ggcgagtgc tgcaggagtg cccgtcgggc ttcattccgca acggcagcca gagcatgttc	960
tgcatccct gtgaaggctc gtgccccaaag gtctgtgagg aagacaagaa aacaaagacc	1020
attgattctg ttaattctgc tcaaattgtc caaggctgca ccatcttcaa ggggaatctg	1080
ctcattaaca tccgacgagg caataacatt gcctcggagc tggagaactt catggggctc	1140
atcgaggctg tgacgggcta cgtgaagatc agccactcgc acgccttggt ctcttctgc	1200
ttctgaaga acctccgcca gatcctaggg gaggagcagc tggaaaggaa ctactcctc	1260
tacgtcctgg acaaccagaa ctgacagcag ctctgggact gggaccaccg caacctgacc	1320
atcaaagctg ggaagatgta ctgcgcttc aaccccaaac tgtgcgtgtc ggaaatttac	1380
cgcattggagg acgtgacggg gacgaaagga cgccagagca agggcgacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg agagagcctc ctgtgagagc gacatcctgc atttcacctc caccaacacg	1500
tggagaagcc gcatcatcct aacctggcac cgctaccgcc cccctgacta cagggatctc	1560
atcagcttca ccgtctacta caaggaggca ccctttaaaa atgtgacgga gtatgatggg	1620
caggacgcct gcggctccaa cagctggaac atggtggacg tggacctccc tcccaacaag	1680
gacctagagc ctggtattct actgcaaggg ctgaagccct ggactcagta cgccgtctac	1740
gtcaaggccg tgacctcac catggtggag aatgaccaca tccgaggggc caagagtga	1800
atcttgtaca ttcgaccaa cgctcagtt ccttccatcc ccttggaat cctctcggca	1860
tccaactcct cgtctcagct gatcgtgaag tggagcccc cgtccctgcc caacgggaac	1920
ctgagctact acatcgtgag gtggcagcgg cagccccagg acggctacct gtaccggcac	1980

aactactgct ccaaagacaa aattcccatc aggaagtatg cggacggcac catcgacgtg	2040
gaggaggatga cggagaaccc caagacggag gtctgtggcg gagagaaggg gccttgctgc	2100
gcgtgcccc aagaccgaagc cgagaagcag gctgagaagg aggaggcgga gtaccgcaag	2160
gtgttcgaga acttcctgca caactccatc ttctgtccca gacccgagag gaagcggaga	2220
gatgtcgccc aggtggccaa caccacgtg tccggccgag gcaggaacgg cacggcgggtg	2280
gacatgtaca acagcacgga cctggaggag ctggagacag aatacccttt ctttgagacc	2340
agagtggaca aggagataac ggtcatatct aacctgcggc cgtttacttc ctaccgcatc	2400
gatatccaca gctgcaacca cgaggcggag aagctggggg gcagtgcctc caactttgtc	2460
tttgcgagaa ccaagcctgc agaaggagcg gatgacattc cgggccctgt gacctgggaa	2520
gcaaggcctg aaaactccat ctttctgaag tggccggaac ctgagaaccc caacggattg	2580
atcctaattgt atgagataaa ataccgggtct cagatcgagg accagaggga atgtgtgtcc	2640
agacagcagt accgaaagta tggaggagcc aagctcaacc ggctaaaccc ggggaactat	2700
acagcccgga ttcaggctac gtcgtctctc gggaacgggt cgtggacgga gcctgtgttc	2760
ttctatgtcc cagccaaagc cacctacgag agcttcatgc acctgatcat cgcgtgcgcg	2820
gtcgccatcc tgctcatcgt gggagggctg ctgatcgtgc tgtacgtctt ccacaggaag	2880
agaagtaaca gcagactggg gaacggagtg ctgtacgcct ctgtgaaccc ggagtacttc	2940
agtgcagccg acgtatacgt ccctgacgag tgggaggtgg cgcgggagaa gatcaccatg	3000
agccgcgagc ttggccaggg ctccttcggg atgtctacg aaggcgtcgc caaggcgtg	3060

gtaaaggatg agccggaaac cagggtggcc atcaagacgg tgaacgaggc cgccagcatg	3120
cgggagagga tcgagtttct caacgaggcg tctgtgatga aggagttcaa ttgtcaccac	3180
gtggtgcggt tgctgggggt ggtgtcccag ggccagccca ccctggtcac catggagctg	3240
atgacgcgag gggacctcaa gagctatctc aggtccctgc gaccggaagt ggaggctgaa	3300
ttacagagag aaagacagag acagagacag aacttcaccc gccggttcgc tcctcggatg	3360
gccgcaacag ccagggtctg gccaggccga agccaacagc caggagcttc ttctgggtct	3420
cccacgaggg tgcaggggcc caaggacctg ggccatcttc cgctgccttc ccagaatcgg	3480
gccccagccc ctccgagtct gagtaagatg atccaaatgg ccggggagat tgcagatggc	3540
atggcatacc tcaacgcaa caagttcgtg cacagagacc ttgctgcccg gaactgcatg	3600
gtggccgagg atttcacagt caagatcgga gatttcggaa tgacgcggga catctacgag	3660
acggactact accggaaagg ggggaaaggc ttgctgcccg tgcgctggat gtccccgag	3720
tccctcaaag atggagtctt caccacccac tctgacgtct ggtccttcgg agtcgtctc	3780
tgggagatcg ccacgtggc agagcagccg taccaggat tctccaacga gcaggtcctg	3840
cgcttcgtca tggagggcgg ccttctggac aagccggaca actgccccga catgctgttt	3900
gagctgatgc gcatgtgtg gcaatacaac cccaagatgc ggccttcctt cctggagatc	3960
atoggcagtg tcagagacga gatggagccc ggcttcgcg aggtctcctt ctactacagc	4020
gaggagaaca agccgcccga ggccgaggag ctgcacctgg agcccagaa catggagagc	4080
gtgcccttg acccctccgc gaacgccgt gccgccgtcg ccgccctgca gcccgacagg	4140

cacaaggccg agaacggccc gagtgcaggg gcgatggtcc tgcgagccag ctttgacgag 4200
 aggcgaccct acgcgcacat gaatgggggc cgcacagacg agcggggccct gccgctgcgc 4260
 cagtcttcga cctgcgatta taaggatgac gatgacaagt ga 4302

<210> 20
 <211> 4140
 <212> ADN
 <213> Chuột nâu

<400> 20
 atgaagtctg gctccggagg aggggtcccc acctcgtgt gggggctcgt gtttctctcc 60
 gccgcgctct cgctctggcc gacgagtgga gaaatttgtg ggcccggcat tgacatccgc 120
 aacgactatc agcagctgaa gcgcctggaa aactgcacgg tgatcgaggg ctctctccac 180
 atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgaagctacc gcttccccaa gctcacagtc 240
 atcaccgagt acttgctgct gtttcgagtg gccggcctcg agagcctggg agacctcttc 300
 ccgaacctca cagtcatccg tggctggaaa ctcttctaca attacgcact ggtcatcttc 360
 gagatgacca atctcaagga tattgggctt tataatctga ggaacattac tcggggggcc 420
 atcaggattg agaaaaacgc tgacctctgt tacctctcca ccatagactg gtctctcatc 480
 ttggatgcgg tgtccaataa ctacattgtg gggaacaagc ccccaaagga atgtggggac 540
 ctgtgtccag ggaccttgga ggagaagccc atgtgtgaga agaccacat caacaatgag 600
 tacaactacc gctgctggac cacaaatcgc tgccagaaaa tgtgccaag tgtgtgtggg 660
 aagcgagcct gcaccgagaa caatgagtgc tgccaccgg agtgccctagg cagctgccac 720

acaccggacg acaacacaac ctgcgtggcc tgccgacact actactacaa aggcgtgtgc	780
gtgcctgcct gcccgctgg cacctacagg ttcgagggtt ggcgctgtgt ggaccgggat	840
ttctgcgcca acatcccca cgcgagagc agtgactcag atggcttcgt catccacgat	900
ggcgagtga tgcaggagtg tccatcaggc ttcatccgca acagcaccga gagcatgtac	960
tgtatccct gtgaaggccc ctgcccgaag gtctgcggcg atgaagaaaa gaaaacgaaa	1020
accatcgatt ctgtgacgtc tgcccagatg ctccaagggt gcaccatttt gaagggaat	1080
ctgcttatta acatccggcg aggcaataac attgcctcgg aattggagaa ctcatgggg	1140
ctcatcgagg tggtagctgg ctacgtgaag atccgccatt cccatgcctt ggtctccttg	1200
tccttcctga agaaccctcg tctcatctta ggagaggagc agctagaagg aaactactcc	1260
ttctatgtcc tggacaacca gaacttgag cagctgtggg actggaacca ccggaacctg	1320
accgtcaggt cagggaataat gtacttcgct ttcaatccca agctgtgtgt ctctgaaatt	1380
taccgaatgg aggaggtgac aggaacaaag ggacggcaga gcaaaggaga cataaacacc	1440
aggaacaacg gagagcgagc ttctgtgaa agtgatgttc tccgtttcac ctccaccacc	1500
acctggaaga accgcatcat cataacgtgg caccgggtacc ggccgccgga ctaccgggat	1560
ctcatcagtt tcacagtcta ctacaaggag gcacccttta aaaacgtcac ggaatacgac	1620
gggcaggatg cctgtggctc caacagctgg aacatggtgg acgtggacct gcctccgaac	1680
aaggaggggg agcctggcat ttgtctgcat gggctgaagc cctggacca gtatgcagtc	1740
tatgtcaagg ctgtgacct caccatggtg gaaaacgacc acatccgtgg ggccaaaagt	1800

gaaatcttgt acattcgac caacgttca gtctctcca ttcctctaga tgtcctctcg	1860
gcatcaaaact cctcctctca gctgatcgtg aagtggaaacc ccccaactct gcccaatggt	1920
aacttgagtt actacattgt gaggtggcag cggcagccgc aggatggcta tctgttccgg	1980
cacaactact gctocaaaga caaaataccc atcagaaagt acgocgatgg taccatcgat	2040
gtggaggagg tgacagaaaa tccaagaca gaagtgtcgc gtggtgataa agggccgtgc	2100
tgtgcctgtc ctaaaaccga agctgagaag caggctgaga aggaggaggc tgagtaccgt	2160
aaagtctttg agaatttctt tcacaactcc atctttgtgc ccagacctga gaggaggcgg	2220
agagatgtcc tgcagggtgc taacaccacc atgtccagcc gaagcaggaa caccacggtg	2280
gctgacacct acaatatcac agaccggaa gagttcgaga cagaataccc tttctttgag	2340
agcagagtgg ataacaagga gaggactgtc atttccaacc tccggccttt cactctgtac	2400
cgtatcgata tccacagctg caaccacgag gctgagaagc tgggctgcag cgcctccaac	2460
tttgtctttg caagaacct gccagcagaa ggagcagatg acattcctgg cccagtgacc	2520
tgggagccaa gacctgaaaa ctccatcttt ttaaagtggc cagaaccgga gaacccaac	2580
ggattgattc taatgtatga aataaaatac ggatcgcaag tcgaggatca gcgggaatgt	2640
gtgtccagac aggagtacag gaagtatgga ggggccaac ttaaccgtct aaaccaggg	2700
aactatacgg cccgattca ggctacctcc ctctctggga atgggtcgtg gacagatcct	2760
gtgttttct atgtcccagc caaaacaacg tatgagaatt tcatgcatct gatcattgct	2820
ctgcgggttg ccatcctgct gattgtgggg ggcctggtaa tcatgctgta tgtcttccat	2880

agaaagagga ataacagcag attgggcaac ggggtgctgt acgcctctgt gaaccccgag	2940
tatttcagcg cagctgatgt gtacgtgcct gatgaatggg aggtagctcg ggagaagatc	3000
accatgaacc gggagctcgg acaagggtcc ttcgggatgg tctatgaagg agtggccaag	3060
ggcgtgggtca aggacgagcc tgaaccaga gtggccatca agacagtga tgaggctgca	3120
agtatgcgtg agagaattga gtttctcaac gaggcctcag tgatgaagga gttcaactgt	3180
caccatgtgg tccggttgct ggggtgtagta tccaaggcc agcccacct ggtcatcatg	3240
gaactaatga cacgtggcga tctcaaaagt tatctcgggt ctctaaggcc agaggtggag	3300
cagaataatc tagtcctgat tcctccgagc ttaagcaaga tgatccagat ggctggagag	3360
attgcagatg gcatggccta cctcaatgcc aacaagttcg tccacagaga cctggctgct	3420
cggaactgca tggtagctga agatttcaca gtcaaaattg gagattttgg tatgacacga	3480
gacatctacg agacggacta ctaccgaaa ggcgggaagg gcttgctgcc tgtgcgctgg	3540
atgtctcccg agtccctcaa ggatggcgctc ttcaccactc attccgatgt ctggtccttt	3600
ggggtcgtcc tctgggagat cgccactctg gctgagcagc cgtaccaggg cctgtccaac	3660
gagcaagttc ttcgtttcgt catggagggc ggccttctgg acaagccgga taactgcccc	3720
gatatgctgt ttgaacttat gcgcatgtgc tggcagtaca accccaagat gcggccctcc	3780
ttcctggaga tcatcggaag catcaaggat gagatggagc ccagtttcca ggaggtctcc	3840
ttctactaca gcgaggagaa caagcctcca gagccggagg agctggagat ggagctggag	3900
ctggagcccc agaacatgga gagcgtcccg ctggaccctt cggcctcctc agcctccctg	3960

cctctgcctg aaagacactc aggacacaag gctgagaacg gccctggcgt gctggttctc 4020

cgtgccagtt ttgatgagag acagccttac gtcacatga atgggggacg cgccaacgag 4080

agggccttgc ctctgcccc a gtcctcaacc tgcgattata aggatgacga tgacaagtga 4140

<210> 21

<211> 4146

<212> ADN

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 21

atgaagtctg gctccggagg aggggtcccc acctcgctgt gggggctcgt gtttctctcc 60

gccgcgtctt ctctctggcc gacgagtgga gaaatctgtg ggcccgcat tgacatccgc 120

aacgactatc agcagctgaa gcgcctggaa aactgcacgg tgatcgaggg ctctctccac 180

atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgaagctacc gcttcccaa gtcaccgtc 240

atcactgagt acttgctgct ctccgagtc gctggcctog agagcctggg agacctcttc 300

cccaacctca cagtcacccg tggctggaaa ctcttctaca actacgcact ggtcatcttc 360

gagatgacca atctcaagga tattgggctt tataatctga ggaacattac tcggggggcc 420

atcaggattg agaagaacgc cgacctctgt tacctctcca ccatagactg gtctctcatc 480

ttggatgcgg tgtccaataa ctacattgtg gggaacaagc cccgaagga atgtggggac 540

ctgtgtccag ggacattgga ggagaagccc atgtgtgaga agaccaccat caacaatgag 600

tacaactacc gctgctggac cacaatcgc tgccagaaaa tgtgccaag tgtgtgoggg 660

aagcgcgcct gcaccgagaa caacgagtgc tgccacccgg agtgcctggg cagctgccac	720
acaccggacg acaacacaaac ctgcgtggcc tgcagacact actactaaa aggcggtgtgt	780
gtgcctgcct gccgcctgg cacctacagg ttcgagggtt ggcgtgtgt ggatgcgat	840
ttctgcgcca acatcccaaa cgctgagagc agtgactcgg atggcttcgt tatccacgac	900
gatgagtgc tgcaggagtgc tccctcaggc ttcatccgca acagcaccga gagcatgtac	960
tgtatccctt gcgaaggccc ctgccccaaa gtctgcggcg atgaagagaa gaaaacgaaa	1020
accatcgatt cggtgacttc tgctcaaatt ctccaaggat gcaccatcct gaagggaat	1080
ctgcttatta acatccggag aggcaataac attgcctcgg agttggagaa ctcatgggg	1140
ctcatcgagg tggtagaccg ctacgtgaag atccgccatt ctcatgcctt ggtctccttg	1200
tcttctctga agaaccttcg tctcatctta ggagaggagc agctggaagg gaactactcc	1260
ttctatgtcc tagacaacca gaacttgcag cagctgtggg actggaacca ccggaacctg	1320
accgtcaggt ccggaagat gtactttgct ttcaatccca agctgtgtgt ctccgaaatt	1380
taccgcatgg aggaagtgc cggaaccaag ggacgccaga gcaaaggga cataaacacc	1440
aggaacaacg gagagcgagc ttctgtgaa agtgatgttc tccgtttcac ctccaccag	1500
acctggaaga accgaatcat cataacgtgg caccggtacc ggccgccgga ctaccgggat	1560
ctcatcagct tcacagtta ctacaaggag gcaccattta aaaacgttac ggaatatgac	1620
gggcaggatg cctgtggctc caacagctgg aacatggtgg atgtagacct gcctccgaac	1680
aaggagggcg agcctggcat ttactgcat gggctgaagc cctggacca gtatgctgtc	1740

tatgtcaagg ctgtgaccct caccatgggtg gaaaacgacc atatccgtgg ggccaaaagt	1800
gaaatcttgt acattgcac caatgottca gtcccttcca ttcccctaga tgtcctctca	1860
gcatcaaact cticctctca gctgattgtg aagtggatc ctccaactct gcccaatggt	1920
aacttgagtt actacattgt gaggtggcag cggcagcccc aggatggta cctgtaccgg	1980
cacaactact gtcctaaaga caaaataccc atcagaaagt acgccgatgg taccatcgac	2040
gtggaggagg tgacggaaaa tccaagaca gaagtgtgtg gtggtgataa agggccatgc	2100
tgcgcttgcc ctaaaactga agctgagaag caggctgaga aggaggaggc tgagtaccgt	2160
aaagtctttg agaatttcct tcacaattcc atctttgtgc ccaggccccga aaggaggcgg	2220
agagacgtca tgcaagtggc caacacgacc atgtccagcc gaagcaggaa caccacgta	2280
gctgacacct acaatatcac agaccggag gaggctgaga cagagtacc tttctttgag	2340
agcagagtgg ataacaagga gaggactgtc atctccaacc tccggccttt cactctgtac	2400
cgcatcgata tccacagctg caaccacgag gctgagaagc tgggctgcag cgctccaac	2460
ttcgtctttg cgagaaccat gccagcagaa ggagcagatg atatccctgg tccggtgacc	2520
tgggagccaa gaccgaaaa ctccatcttt ttaaagtggc cagaaccoga gaacccaac	2580
ggattgatcc taatgtatga aattaaatac gggtcgcaag tcgaggatca gcgggaatgt	2640
gtgtccagac aggagtacag gaagtacgga ggggccaaac tcaaccgtct aaaccaggg	2700
aactatacag cccggattca ggctacctcc ctctctggga atgggtcatg gacagatcct	2760
gtgttcttct atgtccccgc caaaacgacg tatgagaact tcatgcatct gatcattgct	2820

ctgccggttg ccatcctgct gatcgttggg gggctggtta tcatgctgta tgtcttccat	2880
agaaagagaa ataacagcag gttgggcaat ggagtgcgtg atgcttctgt gaaccccgag	2940
tatttcagcg cagctgatgt gtacgtgcct gatgaatggg aggtagctcg agagaagatc	3000
accatgaacc gggagctcgg acaagggtcc tttgggatgg tctatgaagg agtggccaag	3060
ggtgtgggtca aggatgaacc cgaaaccaga gtggccatca agacggtaaa cgaggctgca	3120
agtatgcgtg aaagaatcga gtttctcaac gaggcctcgg tgatgaagga gttcaattgt	3180
caccatgtgg tccggttgct ggggtgtggta tcccaaggcc agcccaccct ggtcatcatg	3240
gaactaatga cacgcggtga tctcaaaagt tatctccggt ctctgaggcc agaagtggag	3300
cagaataatc tagtcctcat tcctccgagc ttaagcaaga tgatccagat ggctggagag	3360
attgcagatg gcatggccta cctcaatgcc aacaagttcg tccacagaga ccttgctgct	3420
aggaactgca tggtagccga agatttcaca gtcaaaattg gagatttcgg tatgacacga	3480
gacatctacg agacggacta ctaccggaaa ggccgggaagg ggttgctgcc tgtgcgctgg	3540
atgtctcccg agtcctcaa ggatgggtgc ttcactactc attctgatgt ctggtccttc	3600
ggggtcgtcc tctgggagat cgccaogctg gctgagcagc cctaccaggg cttgtccaac	3660
gagcaagttc ttcgtttcgt catggagggt ggccttctgg acaagccgga caactgccct	3720
gatatgctgt ttgaacttat gcgcatgtgc tggcagtata accccaagat gcggccctcc	3780
ttcctggaga tcatcggcag catcaaggat gagatggagc ccagcttcca ggaggtctcc	3840
ttctactaca gcgaggagaa caagcctccc gagccagagg agctggagat ggagctggag	3900

atggagcctg agaacatgga gagcgtccca ctggaccctt oggcctcctc agcctccctg 3960
 cctctgcctg aaagacactc aggacacaag gctgagaatg gcccgggccc tggcgtgctc 4020
 gttctccgcg ccagttttga tgagagacag cttacgctc acatgaacgg gggacgogcc 4080
 aacgagaggg ccttgcctct gcccagtcg tcgacctgcg attataagga tgacgatgac 4140
 aagtga 4146

<210> 22
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mock

<400> 22
 atggtgagtg tgattaaacc agagatgaag atcaagctgt gtatgagagg cactgtaaac 60
 gggcataatt tcgtgattga aggagaagga aaaggaaatc cttacgaggg aacgcagatt 120
 ttagacctga acgtcactga aggcgcacct ctgcctttcg cttacgatat cttgacaaca 180
 gtgttccagt acggcaacag ggcattcacc aagtaccag cagatattca ggactatttc 240
 aagcagactt ttctgaggg gtatcactgg gaaagaagca tgacttatga agaccagggc 300
 atttgcaccg ccacaagcaa cataagcatg aggggcgact gttttttcta tgacattcgt 360
 tttgatggca ccaactttcc toccaatggt ccggttatgc agaagaagac tcttaaattg 420
 gagccatcca ctgagaaaat gtacgtagag gatggagtgc tgaagggtga tgtaacatg 480

cgccgtgttc ttgaaggagg tggccattat cgatgtgatt tcaaaactac ttacaaagca 540
 aagaaggagg tccgtttgcc agacgcgcac aaaattgacc accgcattga gattttgaag 600
 catgacaaag attacaacaa ggtcaagctc tatgagaatg ccgttgctcg ctattctatg 660
 ctgccgagtc aggccaagga ttataaggat gacgatgaca agcatcacca ccatcaccac 720
 tag 723

<210> 23
 <211> 4152
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Thụ thể chimeric

<400> 23
 atgaagtctg gctccggagg agggctcccc acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc 60
 gccgcgctct cgctctggcc gacgagtga gaaatctgcg ggccaggcat cgacatccgc 120
 aacgactatc agcagctgaa ggcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac 180
 atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gcttcccaa gtcacggtc 240
 attaccgagt acttgctgct gttccgagtg gctggcctcg agagcctcgg agacctcttc 300
 cccaacctca cggatcatccg cggctggaaa ctcttctaca actacgccct ggtcatcttc 360
 gagatgacca atctcaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcggggggcc 420
 atcaggattg agaaaaatgc tgacctctgt tacctctcca ctgtggactg gtccctgac 480

ctggatgcgg tgtccaataa ctacattgtg gggaataagc ccccaaagga atgtggggac	540
ctgtgtccag ggaccatgga ggagaagccg atgtgtgaga agaccaccat caacaatgag	600
tacaactacc gctgctggac cacaacccgc tgccagaaaa tgtgcccaag cacgtgtggg	660
aagcgggagt gcaccgagaa caatgagtgc tgccaccccg agtgcctggg cagctgcagc	720
ggcctgaca acgacacggc ctgtgtagct tgccgccact actactatgc cgggtgtctgt	780
gtgcctgcct gcccgcccaa cacctacagg tttgagggtt ggcgtgtgt ggaccgtgac	840
ttctgcgcca acatcctcag cgccgagagc agcgactccg aggggtttgt gatccacgac	900
ggcgagtgca tgcaggagtgc cccctcgggc ttcatccgca acggcagcca gagcatgtac	960
tgcattccct gtgaaggctc ttgccgaag gtctgtgagg aagaaaagaa aacaaagacc	1020
attgattctg ttacttctgc tcagatgctc caaggatgca ccatcttcaa gggcaatttg	1080
ctcattaaca tccgacgggg gaataacatt gcttcagagc tggagaactt catggggctc	1140
atcgagggtg tgacgggcta cgtgaagatc cgccattctc atgccttggg ctccttgtcc	1200
ttcctaaaaa accttcgcct catcctagga gaggagcagc tagaaggga ttactccttc	1260
tacgtcctcg acaaccagaa cttgcagcaa ctgtgggact gggaccaccg caacctgacc	1320
atcaaagcag ggaaaatgta ctttgctttc aatoccaa atgtgtttc cgaaatttac	1380
cgcatggagg aagtgcggg gactaaagg cgccaaagca aaggggacat aaacaccagg	1440
aacaacgggg agagagcctc ctgtgaaagt gacttactta aattttctta cattcgga	1500
tcctttgaca agatcttgct gagatgggag ccgtactggc ccccgactt ccgagacctc	1560

ttggggttca tgctgttcta caaagaggcc cttatcaga atgtgacgga gttcgacggg	1620
caggatgcgt gtggttccaa cagttggacg gtggtagaca ttgaccacc cctgaggtec	1680
aacgacccca aatcacagaa ccaccagggg tggctgatgc ggggtctcaa gccctggacc	1740
cagtatgcca tttttgtgaa gacctggtc accttttcgg atgaacgccg gacctatggg	1800
gccaagagtg acatcattta tgtccagaca gatgccacca acccctctgt gccctggat	1860
ccaatctcag tgtctaactc atcatcccag attattctga agtggaacc accctccgac	1920
cccaatggca acatcaccca ctacctggtt ttctgggaga ggcaggcgga agacagtgag	1980
ctgttcgagc tggattattg cctcaaaggg ctgaagctgc cctcgaggac ctggtctcca	2040
ccattcgagt ctgaagattc tcagaagcac aaccagagtg agtatgagga ttcgccggc	2100
gaatgctgct cctgtccaaa gacagactct cagatcctga aggagctgga ggagtcctcg	2160
tttaggaaga cgtttgagga ttacctgcac aacgtggttt tcgtcccag aaaaacctct	2220
tcaggcactg gtgccgagga ccctaggcca tctcggaac gcaggtccct tggcgatgtt	2280
gggaatgtga cggtgccgt gccacggtg gcagctttcc ccaacacttc ctcgaccagc	2340
gtgccacga gtccggagga gcacaggcct ttgagaagg tggtaacaa ggagtcgctg	2400
gtcatctccg gcttgcgaca cttcacgggc tatcgcatcg agctgcaggc ttgcaaccag	2460
gacaccctg aggaacggtg cagtgtggca gcctacgtca gtgcgaggac catgcctgaa	2520
gccaaaggctg atgacattgt tggccctgtg acgcatgaaa tctttgagaa caacgtcgtc	2580
catttgatgt ggcaggagcc gaaggagccc aatggtctga tcgtgctgta tgaagtgagt	2640

tatcggcgat atggtgatga ggagctgcat ctctcgtct cccgcaagca cttcgtcttg	2700
gaacggggct gcaggctgcg tgggctgtca cgggggaact acagcgtgcg aatccgggoc	2760
acctcccttg cgggcaacgg ctcttgacg gaaccacct atttctacgt gacagactat	2820
ttagacgtcc cgtcaaatat tgcaaaaatt atcatcggcc ccctcatctt tgtctttctc	2880
ttcagtgttg tgattggaag tatttatcta ttcctgagaa agaggcagcc agatgggccc	2940
ctgggaccgc ttacgcttc ttcaaaccct gagtatctca gtgccagtga tgtgtttcca	3000
tgctctgtgt acgtgccgga cgagtgggag gtgtctcgag agaagatcac cctccttcga	3060
gagctggggc agggctcctt cggcatggtg tatgagggca atgccaggga catcatcaag	3120
ggtgaggcag agaccgcgt ggcggtgaag acggtcaacg agtcagccag tctccgagag	3180
cggattgagt tcctcaatga ggccctcgtc atgaagggtc tcacctgcca tcacgtggtg	3240
cgcctcctgg gagtgggtgc caagggccag cccacgctgg tggatgatga gctgatggct	3300
cacggagacc tgaagagcta cctccgttct ctgcggccag aggctgagaa taatcctggc	3360
cgcctcccc ctacccttca agagatgatt cagatggcgg cagagattgc tgacgggatg	3420
gcctacctga acgccaagaa gtttgtgcat cgggacctgg cagcgagaaa ctgcatggtc	3480
gcccattgatt ttactgtcaa aattggagac tttggaatga ccagagacat ctatgaaacg	3540
gattactacc ggaaaggggg caagggtctg ctccctgtac ggtggatggc accggagtcc	3600
ctgaaggatg gggctttcac cacttcttct gacatgtggt cctttggcgt ggtcctttgg	3660
gaaatcacca gcttggcaga acagccttac caaggcctgt ctaatgaaca ggtgttgaaa	3720

tttgtcatgg atggagggtg tctggatcaa cccgacaact gtccagagag agtcaactgac	3780
ctcatgcgca tgtgctggca attcaacccc aagatgaggc caaccttcct ggagattgtc	3840
aacctgctca aggacgacct gcaccccagc ttccagagg tgtcgttctt ccacagcgag	3900
gagaacaagg ctcccagag tgaggagctg gagatggagt ttgaggacat ggagaatgtg	3960
cccctggacc gttcctcgca ctgtcagagg gaggaggcgg ggggcccggg tggagggtcc	4020
tcgtggggtt tcaagcggag ctacgaggaa cacatccctt acacacacat gaacggaggc	4080
aagaaaaacg ggccgattct gacctgcct cggccaatc ctccgatta taaggatgac	4140
gatgacaagt ga	4152

<210> 24

<211> 4149

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Thụ thể chimeric

<400> 24

atggccaccg ggggcccggc gggggcggct gccgcgccgc tgctggtggc ggtggccgcg	60
ctgctactgg gcgccgggg ccacctgtac cccggagagg tgtgtcccgg catggatatc	120
cggaacaacc tcactagggt gcatgagctg gagaattgct ctgtcatcga aggacacttg	180
cagatactct tgatgttcaa aacgaggccc gaagatttcc gagacctcag tttcccaaaa	240
ctcatcatga tcactgatta cttgctgctc ttccgggtct atgggctcga gagcctgaag	300

gacctgttcc ccaacctcac ggtcatccgg ggatcacgac tgttctttaa ctacgogctg	360
gtcatcttcg agatggttca cctcaaggaa ctcggcctct acaacctgat gaacatcacc	420
cggggttctg tccgcatcga gaagaacaat gagctctgtt acttggccac tatcgactgg	480
tcccgatatcc tggattccgt ggaggataat tacatcgtgt tgaacaaaga tgacaacgag	540
gagtgtggag acatctgtcc ggttaccgag aagggaaga ccaactgccc cgccaccgtc	600
atcaacgggc agtttgtcga acgatgttgg actcatagtc actgccagaa agtttggccg	660
accatctgta agtcacacgg ctgcaccgcc gaaggcctct gttgccacag cgagtgcctg	720
ggcaactgtt ctacgcccga cgaccccacc aagtgcgtgg cctgccgcaa cttctacctg	780
gacggcaggt gtgtggagac ctgcccgcc cgtactacc acttccagga ctggcgctgt	840
gtgaacttca gcttctgccg ggacctgcac caaaaatgca agaactcgcg gaggcagggc	900
tgccaccagt acgtcattca caacaacaag tgcattccctg agtgtccctc cgggtacacg	960
atgaattcca gcaacttgct gtgcacccca tgcctgggtc cctgtcccaa ggtgtgccac	1020
ctcctagaag gcgagaagac catcgactcg gtgacgtctg ccaggagct ccgaggatgc	1080
accgtcatca acgggagtct gatcatcaac attcgaggag gcaacaatct ggcagctgag	1140
ctagaagcca acctcgccct cattgaagaa atttcagggt atctaaaaat ccgccgatcc	1200
tacgtcttgg tgtcacttcc cttcttccgg aagttacgtc tgattcgagg agagaccttg	1260
gaaattggga actactcctt ctatgccttg gacaaccaga acctaaggca gctctgggac	1320
tggagcaaac acaacctcac catcactcag gggaaactct tcttcacta taaccccaaa	1380

ctctgcttgt cagaaatcca caagatggaa gaagtttcag gaaccaaggg gcgccaggag	1440
agaaacgaca ttgccctgaa gaccaatggg gaccaggcat cctgtgaaaa tgaggtcctg	1500
catttcacct ccaccaccac gtcgaagaat cgcacatca taacctggca ccggtaccgg	1560
ccccctgact acagggatct catcagcttc accgtttact acaaggaagc accctttaag	1620
aatgtcacag agtatgatgg gcaggatgcc tgcggctcca acagctggaa catggtggac	1680
gtggacctcc cgccaacaa ggacgtggag cccggcatct tactacatgg gctgaagccc	1740
tggactcagt acgccgttta cgtcaaggct gtgacctca ccatggtgga gaacgaccat	1800
atccgtgggg ccaagagtga gatcttgtac attcgcacca atgcttcagt tccttccatt	1860
cccttggaag ttctttcagc atcgaactcc tcttctcagt taatcgtgaa gtggaaccct	1920
ccctctctgc ccaacggcaa cctgagttac tacattgtgc gctggcagcg gcagcctcag	1980
gacggtacc tttaccggca caattactgc tccaaagaca aaatcccat caggaagtat	2040
gccgacggca ccacgacat tgaggaggtc acagagaacc ccaagactga ggtgtgtggt	2100
ggggagaaag ggccttgctg cgctgcccc aaaactgaag ccgagaagca ggccgagaag	2160
gaggaggctg aataccgcaa agtctttgag aatttcctgc acaactccat ctctgtgcc	2220
agacctgaaa ggaagcggag agatgtcatg caagtggcca acaccaccat gtccagccga	2280
agcaggaaca ccacggccgc agacacctac aacatcaccg acccggaaga gctggagaca	2340
gagtaccctt tctttgagag cagagtggat aacaaggaga gaactgtcat ttctaacctt	2400
cggcctttca cattgtaccg catcgatata cacagctgca accacgaggo tgagaagctg	2460

ggctgcagcg cctccaactt cgtctttgca aggactatgc ccgcagaagg agcagatgac	2520
attcctgggc cagtgacctg ggagccaagg cctgaaaact ccatcttttt aaagtggccg	2580
gaacctgaga atcccaatgg attgattcta atgtatgaaa taaaatacgg atcacaagtt	2640
gaggatcagc gagaatgtgt gtccagacag gaatacagga agtatggagg ggccaagcta	2700
aaccggctaa acccggggaa ctacacagcc cggattcagg ccacatctct ctctgggaat	2760
gggtcgtgga cagatcctgt gttcttctat gtccaggcca aaacaggata tgaaaacttc	2820
atccatctga tcatcgctct gcccgtcgct gtctgttga tcgtgggagg gttggtgatt	2880
atgctgtaog tcttccatag aaagagaaat aacagcaggc tggggaatgg agtgctgtat	2940
gcctctgtga acccggagta cttcagcgct gctgatgtgt acgttcctga tgagtgggag	3000
gtggctcggg agaagatcac catgagccgg gaacttgggc aggggtcgtt tgggatggtc	3060
tatgaaggag ttgccaaggg tgtggtgaaa gatgaacctg aaaccagagt ggccattaaa	3120
acagtgaacg aggccgaag catgcgtgaa aggattgagt ttctcaacga agcttctgtg	3180
atgaaggagt tcaattgtca ccatgtggtg cgattgctgg gtgtggtgtc ccaaggccag	3240
ccaacactgg tcatcatgga actgatgaca cggggcgatc tcaaaagtta tctccgtct	3300
ctgaggccag aaatggagaa taatccagtc ctagcacctc caagcctgag caagatgatt	3360
cagatggccg gagagattgc agacggcatg gcataacctc acgccaataa gttcgtccac	3420
agagaccttg ctgccgggaa ttgcatggta gccgaagatt tcacagtcaa aatcggagat	3480
tttggtatga cgcgagatat ctatgagaca gactattacc ggaaaggagg gaaagggtg	3540

ctgcccgtgc gctggatgtc tcctgagtcc ctcaaggatg gagtcttcac cacttactcg	3600
gacgtcttgt ccttcggggt cgtcctctgg gagatcgcca cactggccga gcagccctac	3660
cagggcttgt ccaacgagca agtccttcgc ttcgatcatg agggcggcct tctggacaag	3720
ccagacaact gtctgacat gctgtttgaa ctgatgcgca tgtgctggca gtataacccc	3780
aagatgaggc cttccttcct ggagatcatc agcagcatca aagaggagat ggagcctggc	3840
ttccgggagg tctccttcta ctacagcgag gagaacaagc tgcccagacc ggaggagctg	3900
gacctggagc cagagaacat ggagagcgtc cccctggacc cctcggcctc ctgctcctcc	3960
ctgccactgc ccgacagaca ctcaggacac aaggccgaga acggccccgg ccctgggggtg	4020
ctggtcctcc gcgccagctt cgacgagaga cagccttacg cccacatgaa cggggggccgc	4080
aagaacgagc gggccttgcc gctgccccag tcttcgacct gcgattataa ggatgatgac	4140
gataagtga	4149

<210> 25

<211> 4140

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Thụ thể chimeric

<400> 25

atggccaccg ggggcccggc gggggcggct gccgcgccgc tgctggtggc ggtggccgcg	60
---	----

ctgctactgg gcgcccgagg ccacctgtac cccggagagg tgtgtccgg catggatatc	120
--	-----

cggaacaacc tcactaggtt gcatgagctg gagaattgct ctgtcatcga aggacacttg	180
cagatactct tgatgttcaa aacgaggccc gaagatttcc gagacctcag tttcccaaaa	240
ctcatcatga tcactgatta ctgtctgctc ttccgggtct atgggctcga gaggctgaag	300
gacctgttcc ccaacctcac ggtcatccgg ggatcacgac tgttctttaa ctacgcgtg	360
gtcatcttcc agatggttca cctcaaggaa ctccggcctct acaacctgat gaacatcacc	420
cggggttctg tccgcatcga gaagaacaat gagctctgtt acttggccac tatcgactgg	480
tcccgatatcc tggattccgt ggaggataat tacatcgtgt tgaacaaaga tgacaacgag	540
gagtgtgggg acctgtgtcc agggaccatg gaggagaagc cgatgtgtga gaagaccacc	600
atcaacaatg agtacaacta ccgctgtctg accacaaaacc gctgccagaa aatgtgcccc	660
agcacgtgtg ggaagcgggc gtgcaccgag aacaatgagt gctgccaccc cgagtgcctg	720
ggcagctgca ggcgcctga caacgacacg gcctgtgtag ctgcccga ctactactat	780
gccggtgtct gtgtgcctgc ctgcccggcc aacacctaca ggtttgaggg ctggcgctgt	840
gtggaccgtg acttctgcgc caacatcctc agcgcgaga gcagcgactc cgagggttt	900
gtgatccacg acggcgagtg catgcaggag tgcacctcgg gcttcatccg caacggcagc	960
cagagcatgt actgcatccc ttgtgaaggt ccttgccga aggtctgtga ggaagaaaag	1020
aaaacaaaga ccattgattc tgttacttct gtcagatgc tccaaggatg caccatcttc	1080
aagggaatt tgctcattaa catccgacgg gggaataaca ttgcttcaga gctggagaac	1140
ttcatggggc tcatogaggt ggtgacgggc tacgtgaaga tccgccattc tcatgccttg	1200

gtctccttgt ccttcctaaa aaaccttgcg ctcctcctag gagaggagca gctagaaggg	1260
aattactcct tctacgtcct cgacaaccag aacttgcagc aactgtggga ctgggaccac	1320
cgcaacctga ccatcaaagc agggaaaatg tactttgctt tcaatcccaa attatgtgtt	1380
tccgaaattt accgcatgga ggaagtgcg gggactaaag ggcgccaaag caaaggggac	1440
ataaacacca ggaacaacgg ggagagagcc tcctgtgaaa gtgacgtcct gcatttcacc	1500
tccaccacca cgtcgaagaa tcgcatcatc ataacctggc accggtaccg gcccctgac	1560
tacagggato tcatcagctt caccgtttac tacaaggaag caccctttaa gaatgtcaca	1620
gagtatgatg ggcaggatgc ctgcggctcc aacagctgga acatgggtgga cgtggacctc	1680
cgcaccaaca aggacgtgga gcccggcacg ttactacatg ggctgaagcc ctggactcag	1740
tacgccgttt acgtcaaggc tgtgaccctc accatgggtg agaacgacca tatccgtggg	1800
gccaagagtg agatcttgta cattcgcacc aatgcttcag ttccttccat tcccttggac	1860
gttctttcag catcgaactc ctcttctcag ttaatcgtga agtggaaacc tccctctctg	1920
cccaacggca acctgagtta ctacattgtg cgctggcagc ggcagcctca ggacggctac	1980
ctttaccggc acaattactg ctccaaagac aaaatcccca tcaggaagta tgccgacggc	2040
accatcgaca ttgaggaggt cacagagaac cccaagactg aggtgtgtgg tggggagaaa	2100
gggccttgct ggcctgccc caaaactgaa gccgagaagc aggcggagaa ggaggaggct	2160
gaataccgca aagtctttga gaatttctg cacaactcca tcttcgtgcc cagacctgaa	2220
aggaagcgga gagatgtcat gcaagtggcc aacaccacca tgtccagccg aagcaggaac	2280

accacggccg cagacaccta caacatcacc gaccoggaag agctggagac agagtaccct	2340
ttctttgaga gcagagtgga taacaaggag agaactgtca tttctaacct tcggcctttc	2400
acattgtacc gcatcgatat ccacagctgc aaccacgagg ctgagaagct gggctgcagc	2460
gcctccaact tcgtctttgc aaggactatg cccgcagaag gagcagatga cattcctggg	2520
ccagtgcact gggagccaag gcctgaaaac tccatctttt taaagtggcc ggaacctgag	2580
aatcccaatg gattgattct aatgtatgaa ataaaatacg gatcacaagt tgaggatcag	2640
cgagaatgtg tgtccagaca ggaatacagg aagtatggag gggccaagct aaaccggcta	2700
aaccogggga actacacagc ccggattcag gccacatctc tctctgggaa tgggtcgtgg	2760
acagatcctg tgttcttcta tgtccaggcc aaaacaggat atgaaaactt catccatctg	2820
atcatcgctc tgcccgtcgc tgtcctgttg atcgtgggag ggttggtgat tatgctgtac	2880
gtcttccata gaaagagaaa taacagcagg ctggggaatg gagtgtgtga tgcctctgtg	2940
aaccoggagt acttcagcgc tgctgatgtg tacgttcctg atgagtggga ggtggctcgg	3000
gagaagatca ccatgagccg ggaacttggg caggggtcgt ttgggatggt ctatgaagga	3060
gttgccaagg gtgtggtgaa agatgaacct gaaaccagag tggccattaa aacagtgaac	3120
gaggccgcaa gcatgcgtga aaggattgag tttctcaacg aagcttctgt gatgaaggag	3180
ttcaattgtc accatgtggt gcgattgctg ggtgtggtgt cccaaggcca gccaacctg	3240
gtcatcatgg aactgatgac acggggcgat ctcaaaagtt atctccggtc tctgaggcca	3300
gaaatggaga ataatccagt cctagcacct ccaagcctga gcaagatgat tcagatggcc	3360

ggagagattg cagacggcat ggcatacctc aacgccaata agtctgtcca cagagacctt 3420
 gctgcccggga attgcatggt agccgaagat ttacacagtca aaatcggaga ttttggtatg 3480
 acgcgagata tctatgagac agactattac cggaaaggag ggaaagggt gctgcccgtg 3540
 cgctggatgt ctctgagtc cctcaaggat ggagtcttca ccacttactc ggacgtctgg 3600
 tccttcgggg tcgtcctctg ggagatgcc aactggccg agcagcccta ccagggttg 3660
 tccaacgagc aagtccttcg ctctgtcatg gagggcggcc ttctggacaa gccagacaac 3720
 tgtcctgaca tgctgtttga actgatgcgc atgtgctggc agtataacc caagatgagg 3780
 ccttccttcc tggagatcat cagcagcatc aaagaggaga tggagcctgg ctccggggag 3840
 gtctccttct actacagcga ggagaacaag ctgcccgagc cggaggagct ggacctggag 3900
 ccagagaaca tggagagcgt cccctggac ccctcggcct cctcgtcctc cctgccactg 3960
 cccgacagac actcaggaca caaggccgag aacggccccg gccctggggt gctggtcctc 4020
 cgcgccagct tcgacgagag acagccttac gccacatga acgggggccc caagaacgag 4080
 cgggccttgc cgctgcccc a gtcttgacc tgcgattata aggatgacga tgacaagtga 4140

<210> 26

<211> 4128

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Thụ thể chimeric

<400> 26

atgaagtctg gctccggagg agggccccg acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc	60
gccgcgtctt cgctctggcc gacgagtga gaaatctgcg ggccaggcat cgacatccgc	120
aacgactatc agcagctgaa gcgcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctcac	180
atcctgctca tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gcttcccaa gctcacggtc	240
attaccgagt acttgctgct gttccgagtg gctggcctcg agagcctcgg agacctcttc	300
cccaacctca cggtcacccg cggctggaaa ctcttctaca actacgccct ggtcatcttc	360
gagatgacca atctcaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcggggggcc	420
atcaggattg agaaaaatgc tgacctctgt tacctctcca ctgtggactg gtccctgac	480
ctggatgcgg tgtccaataa ctacattgtg gggaataagc ccccaaagga atgtggggac	540
ctgtgtccag ggaccatgga ggagaagccg atgtgtgaga agaccaccat caacaatgag	600
tacaactacc gctgctggac cacaaccgc tgccagaaaa tgtgccaag cacgtgtggg	660
aagcgggagt gcaccagaaa caatgagtgc tgccaccccg agtgccctggg cagctgcagc	720
gcgcctgaca acgacacggc ctgtgtagct tgccgccact actactatgc cggtgtctgt	780
gtgcctgcct gcccgcccaa cacctacagg tttagaggct ggcgtgtgt ggaccgtgac	840
ttctgcgcca acatcctcag cgcgagagc agcgactccg aggggtttgt gatccacgac	900
ggcgagtga tgcaggagtg cccctcgggc ttcatccga acggcagcca gagcatgtac	960
tgcatccctt gtgaaggctc ttgccccaa gtgtgccacc tcctagaagg cgagaagacc	1020
atcgactcgg tgacgtctgc ccaggagctc cgaggatgca ccgtcatcaa cgggagtctg	1080

atcatcaaca ttcgaggagg caacaatctg gcagctgagc tagaagccaa cctcggcctc	1140
attgaagaaa tttcagggtg tctaaaaatc cgccgatcct acgctctggt gtcactttcc	1200
ttcttcgga agttacgtct gattcgagga gagaccttgg aaattgggaa ctactccttc	1260
tatgccttgg acaaccagaa cctaaggcag ctctgggact ggagcaaaca caacctcacc	1320
atcactcagg ggaaactctt ctccactat aaccccaaac tctgcttgtc agaaatccac	1380
aagatggaag aagtttcagg aaccaagggg cgccaggaga gaaacgacat tgccctgaag	1440
accaatgggg accaggcatc ctgtgaaaat gaggtcctgc atttcacctc caccaccacg	1500
togaagaatc gcatcatcat aacctggcac cggtaccggc occctgacta cagggatctc	1560
atcagcttca ccgtttacta caaggaagca ccctttaaga atgtcacaga gtatgatggg	1620
caggatgcct gcggctccaa cagctggaac atgggtggacg tggacctccc gcccaacaag	1680
gacgtggagc ccggcatctt actacatggg ctgaagccct ggactcagta cgccgtttac	1740
gtcaaggctg tgacctcac catggtggag aacgaccata tccgtggggc caagagtga	1800
atottgtaca ttgcaccaa tgcttcagtt ccttcattc ccttgacgt tctttcagca	1860
tgaactcct ctctcagtt aatcgtgaag tggaaccctc cctctctgcc caacggcaac	1920
ctgagttact acattgtgcg ctggcagcgg cagcctcagg acggctacct ttaccggcac	1980
aattactgct ccaaagacaa aatccccatc aggaagtatg ccgacggcac catcgacatt	2040
gaggaggtca cagagaacct caagactgag gtgtgtggtg gggagaaagg gccttgctgc	2100
gcctgcccc aactgaagc cgagaagcag gccgagaagg aggaggctga ataccgcaaa	2160

gtctttgaga atttcctgca caactccatc ttcgtgccca gacctgaaag gaagcggaga	2220
gatgtcatgc aagtggccaa caccaccatg tccagocgaa gcaggaacac cacggccgca	2280
gacacctaca acatcacgga cccggaagag ctggagacag agtacccttt ctttgagagc	2340
agagtggata acaaggagag aactgtcatt tctaaccttc ggocctttcac attgtaccgc	2400
atcgatatcc acagctgcaa ccacgaggct gagaagctgg gctgcagcgc ctccaacttc	2460
gtctttgcaa ggactatgcc cgcagaagga gcagatgaca ttcttgggcc agtgacctgg	2520
gagccaaggc ctgaaaactc catcttttta aagtggccgg aacctgagaa toccaatgga	2580
ttgattctaa tgtatgaaat aaaatacggga tcacaagttg aggatcagcg agaattgtgtg	2640
tccagacagg aatacaggaa gtatggaggg gccaaagctaa accgggctaaa cccggggaaac	2700
tacacagccc ggattcaggc cacatctctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg	2760
ttcttctatg tccaggccaa aacaggatat gaaaacttca tccatctgat catcgctctg	2820
cccgctgctg tcctgttgat cgtgggaggg ttggtgatta tgctgtacgt cttocataga	2880
aagagaaata acagcaggct ggggaatgga gtgctgtatg cctctgtgaa cccggagtac	2940
ttcagcgtg ctgatgtgta cgttcctgat gagtgggagg tggctcgga gaagatcacc	3000
atgagccggg aacttgggca ggggtcgttt gggatggtct atgaaggagt tgccaagggt	3060
gtggtgaaag atgaacctga aaccagagtg gccattaaaa cagtgaacga ggccgcaagc	3120
atgcgtgaaa ggattgagtt tctcaacgaa gcttctgtga tgaaggagtt caattgtcac	3180
catgtggtgc gattgctggg tgtggtgtcc caaggccagc caacactggt catcatggaa	3240

ctgatgacac ggggcgatct caaaagtat ctccggtctc tgaggccaga aatggagaat 3300
 aatccagtc tagcacctcc aagcctgagc aagatgattc agatggccgg agagattgca 3360
 gacggcatgg catacctcaa cgccaataag ttcgtccaca gagaccttgc tgcccggaat 3420
 tgcattgtag ccgaagattt cacagtcaaa atcggagatt ttggtatgac gcgagatatc 3480
 tatgagacag actattaccg gaaaggaggg aaagggtgc tgcccggtcg ctggatgtct 3540
 cctgagtcac tcaaggatgg agtcttcacc acttactcgg acgtctggtc ctccggggtc 3600
 gtctcttggg agatcgccac actggccgag cagccctacc agggcttgtc caacgagcaa 3660
 gtcttctgct tcgtcatgga gggcgccctt ctggacaagc cagacaactg tcctgacatg 3720
 ctgtttgaac tgatgcgcat gtgctggcag tataacccca agatgaggcc ttccttctg 3780
 gagatcatca gcagcatcaa agaggagatg gagcctggct tccgggaggt ctccttctac 3840
 tacagcgagg agaacaagct gcccgagccg gaggagctgg acctggagcc agagaacatg 3900
 gagagcgtcc ccctggaccc ctccgctcc tcgtcctccc tgccactgcc cgacagacac 3960
 tcaggacaca aggccgagaa cggccccggc cctggggtgc tggctcctcc cgccagcttc 4020
 gacgagagac agccttacgc ccacatgaac gggggccgca agaacgagcg ggccttgccg 4080
 ctgccccagt ctccgacctg cgattataag gatgacgatg acaagtga 4128

<210> 27

<211> 705

<212> ADN

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 27

atgaaactcc ttgctgagct cctggggctg ctgctgttct gctttttagg tgtgagatgt	60
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat ccctcggaga cacaattacc	120
atcacttgcc gtgccagtca gaacattaat ttttggttaa gctggtgcc gcagaaacca	180
ggaaatatcc ctactatt gatctataag gcttccaact tgcacacagg cgtcccatca	240
aggttttagtg gcagtggatc tggaacagat ttcacattaa ccatcagcag tctgcagcct	300
gaagacattg ccacttacta ctgtctacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg	360
gggaccaagc tggaataaaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca	420
tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac	480
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg	540
aacagttgga ctgacagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag	600
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca	660
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag	705

<210> 28

<211> 234

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 28

Met Lys Leu Leu Ala Glu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Phe Cys Phe Leu

1

5

10

15

Gly Val Arg Cys Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Ile Asn Phe Trp Leu Ser Trp Cys Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro
50 55 60

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly Gln
100 105 110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

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

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 29
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 29
 atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ttacagatgt ccactcccag 60
 atccaactgc agcagcctgg ggctgagctt gtgaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc 120
 tgcaaggctc ccggctacac cttcaccagc tattggatgc actgggtgaa gcagaggcct 180
 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagact aatcctagca atagtgttac taactacaat 240
 gagaagtica agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaat agggagggga	360
cggggatttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca	420
ccccatctg tctatccact ggcccctgga tctgctgcc aaactaactc catggtgacc	480
ctgggatgcc tggtaagggt ctatttcct gagccagtga cagtgcctg gaactctgga	540
tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg	600
agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt	660
gccacccgg ccagcagcac caagggtggac aagaaaattg tgcccaggga ttgtggtgt	720
aagccttgca tatgtacagt ccagaagta tcatctgtct tcatcttccc cccaaagccc	780
aaggatgtgc tcaccattac tctgactcct aaggtcacgt gtgttggtgt agacatcagc	840
aaggatgac ccgaggtcca gttcagctgg tttgtagatg atgtggaggt gcacacagct	900
cagacgcaac cccgggagga gcagttcaac agcactttcc gtcagtcag tgaacttccc	960
atcatgcacc aggactggct caatggcaag gatttcaa atgcagggtcaa cagtgcagct	1020
ttccctgccc ccacgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gcagaccgaa ggctccacag	1080
gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag atggccaagg ataaagtcag tctgacctgc	1140
atgataacag acttcttccc tgaagacatt actgtggagt ggcagtggaa tgcgcagcca	1200
goggagaact acaagaacac tcagccatc atggacacag atggctctta cttcgtctac	1260
agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg gaggcaggaa atactttcac ctgctctgtg	1320
ttacatgagg gcctgcacaa ccaccatact gagaagagcc tctccactc tcttggtaaa	1380
tga	1383

<210> 30

<211> 460

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 30

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Val Thr Asp
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Ile Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Pro Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Thr Asn Pro Ser Asn Ser Val Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Arg Gly Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
130 135 140

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
210 215 220

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
225 230 235 240

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
275 280 285

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
305 310 315 320

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
325 330 335

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
340 345 350

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
355 360 365

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
370 375 380

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Ala Gln Pro
385 390 395 400

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
405 410 415

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
420 425 430

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
435 440 445

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455 460