



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

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

(11)



1-0053853

(51)^{2021.01} C07K 16/22; A61K 39/395

(13) B

(21) 1-2022-05191

(22) 22/01/2021

(86) PCT/CN2021/073239 22/01/2021

(87) WO2021/147984 29/07/2021

(30) 202010073192.4 22/01/2020 CN

(45) 25/11/2025 452

(43) 27/01/2023 418A

(73) 1. JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone,
Lianyungang, Jiangsu 222047, China

2. SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

No. 279 Wenjing Road, Minhang District, Shanghai, 200245, China

(72) FU, Yayuan (CN); XU, Yingxia (CN); LIN, Bing (CN); TAO, Weikang (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG ANGPTL3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-05191

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng ANGPTL3 và dược phẩm chứa kháng thể này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng ANGPTL3 và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, hoặc muối được dụng hoặc dung môi của chúng, và dược phẩm chứa kháng thể này, cụ thể là được sử dụng để bào chế thuốc điều trị bệnh tăng lipit máu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực thuốc kháng thể, cụ thể là thuốc kháng thể kháng ANGPTL3 và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự trình bày trong bản mô tả này chỉ cung cấp thông tin cơ bản liên quan đến sáng chế và có thể không nhất thiết phải cấu thành giải pháp kỹ thuật.

Gen mã hóa cho protein 3 tương tự angiopoietin (ANGPTL3, ANGPTL-3) là gen mới, được xác định bởi Conklin và đồng tác giả. Từ cơ sở dữ liệu EST dựa trên trình tự tín hiệu và xoắn lưỡng cực, họ đã phân lập cADN có chiều dài đầy đủ của ANGPTL3 ở người từ thư viện cADN ở gan/lá lách của bào thai người (Conklin và đồng tác giả, 1999, *Genomics* 62: 477–482). Protein ANGPTL3 của người gồm 460 axit amin (hANGPTL3) có mức độ tương đồng về amino axit với protein ANGPTL3 của chuột là 76% và có cấu trúc đặc trưng của angiopoietin: peptit tín hiệu, vùng xoắn mở rộng được dự đoán là sẽ tạo thành cuộn dây dạng ốc kép đime hoặc trime, đoạn peptit liên kết ngắn, và vùng tương đồng fibrinogen hình cầu (FD) (Conklin và đồng tác giả, 1999, *Genomics* 62: 477–482). ANGPTL3 khác với angiopoietin (ANG), và ANGPTL3 không liên kết với Tie2. Tuy nhiên, nó cũng có thể gây ra sự hình thành mạch máu mới bằng cách liên kết với integrin $\alpha\beta 3$ thông qua FD ở đầu tận cùng C của nó (Camenisch và đồng tác giả, 2002, *J Biol Chem* 277: 17281–17290).

Ngoài ra, ANGPTL3 là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa chất béo. ANGPTL3 có thể ức chế hoạt tính của LPL, do đó làm giảm độ thanh thải của triglycerit và lipoprotein tỷ trọng thấp, đồng thời sự gia tăng triglycerit trong máu có liên quan đến bệnh sinh của nhiều bệnh chuyển hóa. Lượng triglycerit trong huyết thanh tăng cao có thể liên quan đến quá trình bệnh lý của xơ vữa động mạch bằng cách gây kết tập tiểu cầu và tạo ra chất ức chế hoạt hóa plasminogen-1 (PAI-1), làm tăng số lượng tế bào bọt và thúc đẩy sự tăng sinh và di cư của tế bào cơ trơn của mạch máu. Kháng thể kháng ANGPTL3 có thể liên kết đặc hiệu với ANGPTL3, do đó hoạt động của ANGPTL3 có thể bị ức chế hoặc có thể bị can thiệp và do đó, có thể điều trị các

bệnh như xơ vữa động mạch và tăng lipit máu. Hiện nay, các kháng thể kháng ANGPTL3 khác nhau đã được bộc lộ trong các tài liệu sáng chế như WO2012174178A1, WO2008073300A2 và CN107085112A.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó:

i) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương đồng về trình tự với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng, được thể hiện trong SEQ ID NO:9, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương đồng về trình tự với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, được thể hiện trong SEQ ID NO:10;

ii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương đồng về trình tự với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng, được thể hiện trong SEQ ID NO:11, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương đồng về trình tự với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, được thể hiện trong SEQ ID NO:12; hoặc

iii) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương đồng về trình tự với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng, được thể hiện trong SEQ ID NO:13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương đồng về trình tự với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ, được thể hiện trong SEQ ID NO:14.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

iv) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:20, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 và SEQ ID NO:17;

v) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 và SEQ ID NO:26, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:23; hoặc

vi) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:26, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:23. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(A) vùng biến đổi chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:9, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:10;

(B) vùng biến đổi chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:11, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:12; hoặc

(C) vùng biến đổi chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:13, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:14.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện dưới đây:

(D) vùng biến đổi chuỗi nặng này có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:9, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:10;

(E) vùng biến đổi chuỗi nặng này có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:11, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:12; hoặc

(F) vùng biến đổi chuỗi nặng này có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:14.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 còn bao gồm vùng bảo thủ của chuỗi nặng và vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ; Theo một số phương án, vùng bảo thủ của chuỗi nặng này được chọn từ nhóm bao gồm vùng bảo thủ IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người, và vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm chuỗi κ của người và vùng bảo thủ của chuỗi λ ; Theo một số phương án, vùng bảo thủ của chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:29 hoặc trình tự có mức độ tương đồng về trình tự so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 29 ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, và/hoặc vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:30 hoặc trình tự có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO. 30. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó,

(C) chuỗi nặng có mức độ tương đồng so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:31 ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, và/hoặc chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:32 ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%;

(H) chuỗi nặng có mức độ tương đồng ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:33, và/hoặc chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:34 ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%; hoặc

(I) chuỗi nặng có mức độ tương đồng so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:35 ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%, và/hoặc chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng so với trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:36 ít nhất là 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó,

(J) chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:31, và chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:32;

(K) chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:33, và chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:34; hoặc

(L) chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:35, và chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:36.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 đã phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó cạnh tranh với kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây để liên kết với kháng nguyên ANGPTL3. Theo một số phương án, kháng nguyên ANGPTL3 này là ANGPTL3 của người, ANGPTL3 của chuột nhắt, ANGPTL3 của khỉ hoặc ANGPTL3 của chuột.

Theo một số phương án, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể của người hoặc kháng thể có nguồn gốc từ người. Theo một số phương án, đoạn liên kết kháng nguyên được mô tả trong bản mô tả này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, F(ab')₂, Fab', Fd, Fv, dsFv, scFv, Fab và đime của đoạn globulin miễn dịch. Theo một số phương án, kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có ít nhất một trong các dấu hiệu từ a – d sau đây:

a. Liên kết đặc hiệu với protein ANGPTL3. Theo một số phương án, kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết với ANGPTL3 của người, ANGPTL3 của chuột nhắt, ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus

và/hoặc ANGPT3L của chuột với EC_{50} nhỏ hơn 10nM (ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 5nM, nhỏ hơn hoặc bằng 3nM, nhỏ hơn hoặc bằng 1nM, nhỏ hơn hoặc bằng 0,8nM, nhỏ hơn hoặc bằng 0,6nM, nhỏ hơn hoặc bằng 0,4nM, nhỏ hơn hoặc bằng 0,3nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 0,2nM); Theo một số phương án, EC_{50} được xác định bằng phương pháp ELISA, ví dụ, như được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 1 theo sáng chế; Theo một số phương án, EC_{50} được xác định bằng phương pháp HTRF, ví dụ, như được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 2 theo sáng chế;

b. Liên kết với protein ANGPTL3 có ái lực cao. Theo một số phương án, kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết với ANGPTL3 của người, ANGPTL3 của chuột nhắt, ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus và/hoặc kháng nguyên ANGPTL3 của chuột có trị số KD nhỏ hơn $10E-10$ M (ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng $9E-10$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $8E-10$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $7E-10$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $6E-10$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $3E-10$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $2E-10$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $1E-10$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $8E-11$ M, nhỏ hơn hoặc bằng $6E-11$ M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng $5E-11$ M); Theo một số phương án, trị số KD được xác định bằng phương pháp Biacore, ví dụ, như được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 4 theo sáng chế;

c. Chẹn ức chế ANGPTL3 kháng enzym LPL. Theo một số phương án, kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chẹn ức chế ANGPTL3 của người, ANGPTL3 của chuột nhắt, ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus và/hoặc ANGPTL3 của chuột kháng hoạt tính enzym LPL với trị số IC_{50} nhỏ hơn 170nM (ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng 80nM, nhỏ hơn hoặc bằng 135nM, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 55nM). IC_{50} có thể được xác định bằng thử nghiệm hoạt tính enzym, ví dụ, như được mô tả trong ví dụ thử nghiệm 3 theo sáng chế; và/hoặc

d. Có tác dụng hạ lipid máu tốt. Theo một số phương án, tác dụng hạ lipid của kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được thể hiện trong Ví dụ thử nghiệm 5, 6 và/hoặc 7. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trên đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vector bao gồm phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ thu được bằng cách biến nạp (hoặc tải nạp hoặc chuyển nạp) với vectơ như được mô tả trên đây; tế bào chủ này được chọn từ nhóm bao gồm tế bào nhân sơ và tế bào nhân thực, tốt hơn là tế bào nhân thực, tốt hơn nữa là tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào chủ này không bao gồm tế bào người bất kỳ có khả năng phát triển thành cá thể hoàn chỉnh, ví dụ, tế bào gốc phôi người, trứng đã thụ tinh hoặc tế bào mầm; Theo một số phương án, tế bào chủ này là tế bào nhân thực, tốt hơn là tế bào động vật có vú, bao gồm nhưng không giới hạn ở CHO, 293, NSO và tế bào động vật có vú trong đó việc chỉnh sửa gen (ví dụ, loại bỏ các gen như FUT8 hoặc GnT-III) có thể thay đổi biến đổi glycosyl hóa của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó và do đó, thay đổi chức năng ADCC của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó; Theo một số phương án, tế bào động vật có vú này không bao gồm tế bào người.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó với lượng điều trị hữu hiệu như được mô tả trên đây hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây, và một hoặc nhiều chất mang dược dụng, chất pha loãng dược dụng, chất đệm dược dụng hoặc tá dược dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm này chứa kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây với lượng nằm trong khoảng từ 0,01% khối lượng đến 99% khối lượng. Theo một số phương án, dược phẩm này chứa kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây hoặc phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây với lượng nằm trong khoảng 0,1–2000mg/đơn vị liều, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 1–1000mg.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện hoặc xác định miễn dịch ANGPTL3, bao gồm kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện mức độ biểu hiện của ANGPTL3 trong mẫu từ đối tượng *in vitro*, và phương pháp này bao gồm bước cho kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó đã được mô tả trong sáng chế tiếp xúc với mẫu; Theo một số phương án, mẫu này là huyết thanh, huyết thanh hoặc mẫu máu toàn phần

từ đối tượng. Theo một số phương án, mức độ biểu hiện của ANGPTL3 có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm nhưng không giới hạn ở Western blot, thẩm tách miễn dịch, ELISA và khối phổ.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kit bao gồm kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất sử dụng kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây để điều chế hóa chất phát hiện miễn dịch của ANGPTL3.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây để sử dụng trong phát hiện miễn dịch hoặc xác định ANGPTL3.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kit bao gồm kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kit phát hiện mức độ biểu hiện của ANGPTL3, bao gồm kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây. Theo một số phương án, kit này được sử dụng trong phương pháp phát hiện mức độ biểu hiện của ANGPTL3 được mô tả trong bản mô tả này; Theo một số phương án, phương pháp phát hiện này là phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm nhưng không giới hạn ở Western blot, thẩm tách miễn dịch, ELISA và khối phổ.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, phân tử axit nucleic hoặc dược phẩm này như được mô tả trên đây với lượng điều trị hữu hiệu; Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này là bệnh hoặc rối loạn liên quan đến ANGPTL3; Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này là tăng cholesterol máu, tăng lipit máu hoặc bệnh mạch vành.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất sử dụng kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, phân tử axit nucleic hoặc dược phẩm này như được mô tả trên đây để điều chế thuốc điều trị bệnh hoặc rối loạn. Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này là bệnh hoặc rối loạn liên quan đến ANGPTL3; Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này là tăng cholesterol máu, tăng lipit máu hoặc bệnh mạch vành.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, phân tử axit nucleic hoặc dược phẩm này như được mô tả trên đây để sử dụng làm thuốc. Theo một số phương án, thuốc này được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến ANGPTL3; Theo một số phương án, bệnh hoặc rối loạn này là tăng cholesterol máu, tăng lipit máu hoặc bệnh mạch vành.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ (định nghĩa)

Để thuận tiện cho việc hiểu sáng chế, một số thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được định nghĩa cụ thể dưới đây. Trừ khi được định nghĩa cụ thể trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật khác được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thường được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan đến sáng chế hiểu theo nghĩa thông thường.

Mã ba chữ cái và mã một chữ cái đối với axit amin được sử dụng trong sáng chế như được mô tả trong *J. biol. chem*, 243, trang 3558 (1968).

"Kháng thể" được mô tả trong bản mô tả này được dùng để chỉ globulin miễn dịch, và kháng thể nguyên vẹn tự nhiên có cấu trúc chuỗi tetrapeptit được hình thành bằng cách nối giữa hai chuỗi nặng tương đồng và hai chuỗi nhẹ tương đồng bằng liên kết disulfua liên chuỗi. Theo sự khác biệt trong thành phần axit amin và thứ tự sắp xếp của vùng bảo thủ của chuỗi nặng, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm lớp, hay còn gọi là các dạng quyết định kháng nguyên của các globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, với các chuỗi nặng tương ứng của chúng lần lượt là chuỗi μ , chuỗi δ , chuỗi γ , chuỗi α và chuỗi ϵ . Ig của cùng một lớp có thể được chia thành các phân lớp khác nhau, tùy theo sự khác biệt về thành phần axit amin của vùng bản lề và số lượng và vị trí của liên kết disulfua của chuỗi nặng; ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Chuỗi nhẹ có thể được chia thành chuỗi κ hoặc

λ theo sự khác biệt trong vùng bảo thủ. Mỗi lớp trong số năm lớp Ig có thể có chuỗi κ hoặc chuỗi λ .

Trong chuỗi kháng thể nặng và nhẹ, trình tự của khoảng 110 axit amin gần đầu tận cùng N thay đổi đáng kể và do đó, được gọi là vùng biến đổi vùng biến đổi (vùng Fv); các trình tự axit amin còn lại gần đầu tận cùng C tương đối ổn định và do đó, được gọi là vùng bảo thủ. Vùng biến đổi bao gồm 3 vùng siêu biến (HVR) và 4 vùng khung (FR) có trình tự tương đối bảo thủ. Vùng siêu biến 3 xác định tính đặc hiệu của kháng thể và xác định tính đặc hiệu của kháng thể và do đó, còn được gọi là vùng xác định tính bổ thể (CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm 3 CDR và 4 FR được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. 3 CDR của chuỗi nhẹ được dùng để chỉ LCDR1, LCDR2 và LCDR3, và 3 CDR của chuỗi nặng được dùng để chỉ HCDR1, HCDR2 và HCDR3.

Bên cạnh các kháng thể có chiều dài đầy đủ, "kháng thể" được mô tả trong bản mô tả này còn bao gồm các đoạn liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với kháng nguyên.

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể của người.

"Kháng thể của chuột" được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể đơn dòng kháng ANGPTL3 theo kiến thức và kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tại thời điểm bào chế, kháng nguyên ANGPTL3 được tiêm vào các đối tượng thử nghiệm, sau đó các khối u lai biểu hiện kháng thể có trình tự hoặc đặc tính chức năng mong muốn được phân lập. Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, kháng thể kháng ANGPTL3 của chuột hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng có thể bao gồm thêm vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ của chuỗi κ hoặc chuỗi λ của chuột hoặc biến thể của chúng, hoặc còn bao gồm vùng bảo thủ của chuỗi nặng của IgG1, IgG2, hoặc IgG3 của chuột hoặc biến thể của chúng.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" được mô tả trong bản mô tả này được dùng để chỉ kháng thể thu được bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể khác loại (ví dụ, chuột) với vùng bảo thủ của kháng thể mẹ (ví dụ, kháng thể của người), có thể làm giảm đáp ứng miễn dịch gây ra do kháng thể khác loại. Ví dụ, kháng thể khảm người-chuột là được tạo ra bằng cách trước hết tạo ra dung hợp tế bào tiết ra kháng thể

đơn dòng đặc hiệu của chuột, sau đó, tách dòng gen mã hóa cho vùng biến đổi từ tế bào dung hợp tế bào của chuột, tách dòng gen mã hóa cho vùng bảo thủ của kháng thể của người theo yêu cầu, nối gen mã hóa cho vùng biến đổi của chuột và gen mã hóa cho vùng biến đổi của người với gen khảm, chèn gen khảm này vào vector biểu hiện, và cuối cùng, biểu hiện kháng thể phân tử khảm ở hệ thống tế bào nhân chuẩn hoặc hệ thống tế bào nhân sơ. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể chuỗi nhẹ của kháng thể khảm kháng ANGPTL3 còn bao gồm vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ của chuỗi κ hoặc chuỗi λ của người hoặc biến thể của chúng. Kháng thể chuỗi nặng của kháng thể khảm ANGPTL3 còn bao gồm vùng bảo thủ của chuỗi nặng của người IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 hoặc biến thể của chúng, tốt hơn là vùng bảo thủ của chuỗi nặng của người IgG1, IgG2 hoặc IgG4, hoặc biến thể IgG1, IgG2 hoặc IgG4 sử dụng đột biến axit amin (ví dụ, đột biến L234A và/hoặc L235A và/hoặc đột biến S228P).

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người", còn được dùng để chỉ kháng thể ghép CDR, là kháng thể được tạo ra bằng cách ghép trình tự CDR của chuột vào khung vùng biến đổi kháng thể của người, tức là, kháng thể được tạo ra trong loại trình tự khác của khung kháng thể dòng mầm của người. Do đó, phản ứng khác loại gây ra bởi sự có mặt của một số lượng lớn các thành phần protein của chuột trong kháng thể khảm có thể được khắc phục. Trình tự khung này có thể được lấy từ cơ sở dữ liệu ADN công khai hoặc tài liệu tham khảo được bộc lộ, bao gồm trình tự gen kháng thể dòng mầm. Ví dụ, trình tự ADN dòng mầm của các gen của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase", cũng có thể được tìm thấy trong Kabat, E. A. và đồng tác giả, 1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, bản lần thứ 5. Để tránh giảm hoạt tính do giảm tính sinh miễn dịch, trình tự khung vùng biến đổi của kháng thể người có thể bị đột biến ngược hoặc đột biến ngược tối thiểu để duy trì hoạt tính. Kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế còn bao gồm kháng thể được làm tương thích với người tiếp tục chịu đột biến trưởng thành ái lực CDR bằng cách biểu hiện nấm men.

Thuật ngữ "kháng thể của người" và "kháng thể có nguồn gốc từ người" được sử dụng thay thế cho nhau và có nghĩa là một hoặc nhiều vùng biến đổi và vùng bảo thủ có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch của người. Phương pháp được ưu tiên là

tất cả các vùng biến đổi và vùng bảo thủ đều có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch của người, tức là "kháng thể hoàn toàn có nguồn gốc từ người" hoặc "kháng thể hoàn toàn từ người". Các kháng thể này có thể thu được bằng nhiều cách khác nhau, bao gồm các kháng thể thu được bằng cách phân lập tế bào B từ PBMC của người, lá lách và mô hạch bạch huyết và thiết kế thư viện kháng thể của người phage sợi đơn tự nhiên bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện phage hoặc bằng cách tạo miễn dịch cho chuột chuyển gen có khả năng thể hiện chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kháng thể của người và sàng lọc. Các kháng thể của người theo sáng chế còn bao gồm các kháng thể vẫn liên kết với kháng nguyên quan tâm và thu được bằng cách gây đột biến một hoặc nhiều axit amin dựa trên kháng thể của người.

"Biến thể thông thường" của vùng bảo thủ của chuỗi nặng kháng thể của người và vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ kháng thể của người được mô tả trong bản mô tả này được dùng để chỉ biến thể của vùng bảo thủ của chuỗi nặng hoặc vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ người đã được bộc lộ trong giải pháp kỹ thuật và không làm thay đổi cấu trúc và chức năng của vùng biến đổi kháng thể. Ví dụ về các biến thể này bao gồm các biến thể vùng bảo thủ của chuỗi nặng IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 với các sửa đổi hướng vào vị trí và thay thế axit amin trong vùng bảo thủ của chuỗi nặng. Các thay thế cụ thể là, ví dụ, đột biến YTE, đột biến L234A và/hoặc L235A, hoặc đột biến S228P, hoặc đột biến để có được cấu trúc núp vào lỗ (sao cho chuỗi nặng của kháng thể có sự kết hợp giữa núp-Fc và lỗ-Fc) đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các đột biến này đã được xác nhận là làm cho kháng thể có các đặc tính mới, nhưng không làm thay đổi chức năng của vùng biến đổi kháng thể.

Các thuật ngữ "kháng thể có chiều dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn", "kháng thể hoàn chỉnh" và "kháng thể toàn bộ" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này để chỉ kháng thể ở dạng gần như nguyên vẹn, như được phân biệt với đoạn liên kết kháng nguyên được định nghĩa dưới đây. Cụ thể là, thuật ngữ này được dùng để chỉ các kháng thể trong đó chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm vùng bảo thủ. "Kháng thể" theo sáng chế bao gồm "kháng thể có chiều dài đầy đủ" và các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng.

Theo một số phương án, kháng thể có chiều dài đầy đủ theo sáng chế bao gồm kháng thể có chiều dài đầy đủ được tạo ra bằng cách nối vùng biến đổi chuỗi nhẹ với vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ và nối vùng biến đổi chuỗi nặng với vùng bảo thủ của

chuỗi nặng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể chọn các vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ có nguồn gốc kháng thể khác nhau và vùng bảo thủ của chuỗi nặng tùy theo nhu cầu thực tế, ví dụ, vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ kháng thể của người và vùng bảo thủ của chuỗi nặng.

Thuật ngữ "đoạn liên kết kháng nguyên" hoặc "đoạn chức năng" được dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn kháng thể giữ được khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, ANGPTL3). Đã chứng minh được rằng đoạn kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể được sử dụng để thực hiện chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ về đoạn liên kết được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn liên kết kháng nguyên" bao gồm (i) đoạn Fab, đoạn có hóa trị một bao gồm các vùng VL, VH, CL và CH1; (ii) đoạn $F(ab')_2$, một đoạn có hóa trị hai bao gồm hai đoạn Fab được liên kết bằng cầu nối disulfua trong vùng bản lề; (iii) đoạn Fd, bao gồm các vùng VH và CH1; (iv) Đoạn Fv, bao gồm các vùng VH và VL của một nhánh của kháng thể; (v) dsFv, đoạn liên kết kháng nguyên ổn định được hình thành bởi VH và VL thông qua các liên kết disulfua liên chuỗi giữa chúng; (vi) dimer của đoạn globin miễn dịch, kháng thể đặc hiệu kép và kháng thể đa đặc hiệu, bao gồm các đoạn như scFv, dsFv và Fab. Ngoài ra, mặc dù hai vùng của đoạn Fv, VL và VH, được mã hóa bởi các gen riêng biệt nhưng chúng có thể được liên kết với nhau bằng trình tự liên kết tổng hợp bằng cách tái tổ hợp, do đó nó có khả năng tạo ra một chuỗi protein duy nhất trong đó các vùng VL và VH ghép đôi để tạo thành phân tử có hóa trị một (được gọi là Fv chuỗi đơn (scFv); xem, ví dụ, Bird và đồng tác giả (1988) *Science* 242:423–426; và Huston và đồng tác giả (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879–5883)). Các kháng thể chuỗi đơn như vậy cũng được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn liên kết kháng nguyên" của kháng thể. Các đoạn kháng thể này thu được bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, và được sàng lọc về tính hữu ích theo cách tương tự như đối với các kháng thể nguyên vẹn. Các phân liên kết kháng nguyên có thể được sản xuất bằng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt nhờ enzyme hoặc phương pháp hóa học đối với các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Các kháng thể có thể thuộc các loại các lớp kháng thể khác nhau, ví dụ, IgG (ví dụ, loại phụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), kháng thể IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Fab là đoạn kháng thể có khối lượng phân tử khoảng 50.000, có hoạt tính liên kết

kháng nguyên và có thể thu được bằng cách xử lý các phân tử kháng thể IgG bằng proteaza papain (phân cắt gốc axit amin tại vị trí 224 của chuỗi H), trong đó, khoảng một nửa chuỗi H của phía đầu tận cùng N và toàn bộ chuỗi L được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua.

$F(ab')_2$ là đoạn kháng thể có khối lượng phân tử khoảng 100.000, có hoạt tính liên kết kháng nguyên, bao gồm hai vùng Fab được nối với nhau ở vị trí bản lề và có thể thu được bằng cách cắt phần dưới của hai liên kết disulfua trong vùng bản lề của IgG bằng enzym pepsin.

Fab' là đoạn kháng thể có khối lượng phân tử khoảng 50.000, có hoạt tính liên kết kháng nguyên và có thể thu được bằng cách phân cắt liên kết disulfua trong vùng bản lề của $F(ab')_2$ được mô tả trên đây. Fab' theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất khử, ví dụ dithiothreitol để xử lý $F(ab')_2$ theo sáng chế, nhận biết đặc hiệu ANGPTL3 và liên kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng.

Ngoài ra, Fab' có thể được tạo ra bằng cách chèn ADN mã hóa cho đoạn Fab' của kháng thể vào vector biểu hiện của tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn và đưa vector này vào trong tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn để biểu hiện Fab'.

Thuật ngữ "kháng thể chuỗi đơn", "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" được dùng để chỉ phân tử bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (hoặc vùng; VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc vùng; VL) được liên kết bởi trình tự liên kết. Các phân tử scFv này có thể có cấu trúc chung: NH_2 -VL-trình tự liên kết-VH-COOH hoặc NH_2 -VH-trình tự liên kết-VL-COOH. Các trình tự liên kết thích hợp trong giải pháp kỹ thuật này bao gồm trình tự axit amin GGGGS lặp lại hoặc các biến thể của chúng, ví dụ, 1–4 biến thể lặp lại (Holliger và đồng tác giả (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444–6448). Các trình tự liên kết khác có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong Alfthan và đồng tác giả (1995), *Protein Eng.* 8:725–731; Choi và đồng tác giả (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94–106; Hu và đồng tác giả (1996), *Cancer Res.* 56:3055–3061, Kipriyanov và đồng tác giả (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41–56; và Roovers và đồng tác giả (2001), *Cancer Immunol.*

Đime của đoạn globin miễn dịch là đoạn kháng thể trong đó scFv hoặc Fab được đime hóa và là đoạn kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên có hóa trị hai. Trong

hoạt tính liên kết kháng nguyên có hóa trị hai, hai kháng nguyên này có thể giống nhau hoặc khác nhau.

Kháng thể đặc hiệu kép và kháng thể đa đặc hiệu được dùng để chỉ kháng thể có thể liên kết đồng thời với hai hoặc nhiều kháng nguyên hoặc chất quyết định kháng nguyên và bao gồm các đoạn scFv hoặc Fab có thể liên kết với ANGPTL3.

Đime của đoạn globin miễn dịch theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các bước sau: thu được cADN mã hóa cho VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhận biết đặc hiệu ANGPTL3 của người và liên kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó, thiết kế ADN mã hóa cho scFv sao cho độ dài trình tự axit amin của trình tự liên kết peptit là 8 gốc hoặc ít hơn, chèn ADN vào vector biểu hiện tế bào nhân sơ hoặc vector biểu hiện tế bào nhân chuẩn, sau đó đưa vector biểu hiện này vào tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn để biểu hiện đime của đoạn globin miễn dịch.

dsFv thu được bằng cách liên kết các polypeptit trong đó một gốc axit amin trong mỗi VH và VL được thay thế bằng một gốc xystein thông qua liên kết disulfua giữa các gốc xystein. Các gốc axit amin được thay thế bằng gốc xystein có thể được lựa chọn theo các phương pháp đã biết (*Protein Engineering*, 7, 697 (1994)) dựa trên dự đoán về cấu trúc ba chiều của kháng thể này.

Kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các bước sau: thu cADN mã hóa kháng thể theo sáng chế nhận biết đặc hiệu ANGPTL3 của người và liên kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó, thiết kế ADN mã hóa dsFv, chèn ADN này vào vector biểu hiện tế bào nhân sơ hoặc vector biểu hiện tế bào nhân chuẩn, và sau đó đưa vector biểu hiện này vào tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn để biểu hiện dsFv.

Thuật ngữ "độ khác biệt về axit amin" hoặc "đột biến axit amin" được dùng để chỉ sự có mặt của các thay đổi hoặc đột biến axit amin trong protein hoặc polypeptit biến thể so với protein hoặc polypeptit ban đầu, bao gồm cả sự xuất hiện của 1, 2, 3 hoặc nhiều hơn đoạn chèn axit amin, loại bỏ hoặc thay thế trên cơ sở protein hoặc polypeptit ban đầu.

Thuật ngữ "khung kháng thể" hoặc "FR" được dùng để chỉ một phần của vùng biến đổi VL hoặc VH, được dùng làm khuôn cho các vòng liên kết kháng nguyên

(CDR) của vùng biến đổi. Về cơ bản, nó là một vùng biến đổi không có CDR.

Thuật ngữ "vùng xác định tính bổ sung", "CDR" hoặc "vùng siêu biến" được dùng để chỉ một trong 6 vùng siêu biến trong vùng biến đổi của kháng thể mà chủ yếu góp phần vào việc liên kết kháng nguyên. Nói chung, có ba CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) trong mỗi vùng biến chuỗi nặng và ba CDR (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) trong mỗi vùng biến chuỗi nhẹ. Một trong nhiều sơ đồ bất kỳ đã biết đều có thể được sử dụng để xác định ranh giới trình tự axit amin của CDR, bao gồm các quy tắc đánh số "Kabat" (xem Kabat và đồng tác giả, (1991), "Sequences of Protein of Immunological Interest", Ấn bản thứ 5, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), quy tắc đánh số "Chothia" (xem Al-Lazikani và đồng tác giả, (1997) *JMB* 273: 927–948) và quy tắc đánh số ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc M. P., *Immunologist*, 7, 132–136 (1999); Lefranc, M. P., và đồng tác giả, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55–77 (2003)), v.v.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "yếu tố quyết định kháng nguyên" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên (ví dụ, vị trí đặc hiệu trên phân tử ANGPTL3) mà globulin miễn dịch hoặc một kháng thể liên kết đặc hiệu. Quyết định kháng nguyên thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin kề nhau hoặc không kề nhau trong cấu trúc không gian duy nhất. Xem, ví dụ, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, tập 66, G.E. Morris, Ed. (1996).

Các thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", "liên kết chọn lọc", "liên kết chọn lọc với", "liên kết đặc hiệu với" và "có khả năng liên kết đặc hiệu với" được dùng để chỉ sự liên kết của một kháng thể với một quyết định kháng nguyên trên một kháng nguyên xác định trước. Nói chung, kháng thể liên kết với ái lực (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, ví dụ, nhỏ hơn khoảng 10^{-9} M, 10^{-10} M, hoặc 10^{-11} M, 10^{-12} M hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ "KD" được dùng để chỉ hằng số cân bằng phân ly đối với tương tác kháng thể-kháng nguyên đặc hiệu. Nói chung, kháng thể theo sáng chế liên kết với ANGPTL3 có hằng số cân bằng phân ly (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M, ví dụ, nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M hoặc 10^{-9} M. Ví dụ, theo sáng chế, trị số KD ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên bề mặt tế bào được xác định bằng phương pháp FACS; theo các phương án khác, trị số ái lực KD của kháng thể đối với kháng nguyên được xác định

bằng cách sử dụng phương pháp Biacore; theo các phương án khác, liên kết của kháng thể với kháng nguyên được xác định bằng phương pháp ELISA.

Thuật ngữ "cạnh tranh" khi được sử dụng trong trường hợp các protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên trung hòa hoặc kháng thể trung hòa) cạnh tranh cho cùng một epitop, được dùng để chỉ sự cạnh tranh giữa các protein liên kết kháng nguyên, được xác định bằng các thử nghiệm sau đây, trong đó protein liên kết với kháng nguyên thử nghiệm (ví dụ, kháng thể hoặc đoạn chức năng miễn dịch của chúng) ngăn cản hoặc ức chế (ví dụ, làm giảm) sự liên kết đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên viện dẫn (ví dụ, phối tử hoặc kháng thể viện dẫn) với một kháng nguyên chung (ví dụ, kháng nguyên ANGPTL3 hoặc một đoạn của nó). Có nhiều loại xét nghiệm liên kết cạnh tranh để xác định xem một protein liên kết kháng nguyên có cạnh tranh với protein khác hay không, ví dụ: xét nghiệm miễn dịch phóng xạ trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn (RIA), xét nghiệm miễn dịch enzym trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn (EIA) và xét nghiệm cạnh tranh sandwich (xem, ví dụ, Stahli và đồng tác giả, 1983, *Methods in Enzymology* 9:242–253); pha rắn biotin-avidin trực tiếp EIA (xem, ví dụ, Kirkland và đồng tác giả, 1986, *J. Immunol.* 137:3614–3619), thử nghiệm được gắn chất đánh dấu trực tiếp pha rắn và thử nghiệm sandwich được gắn chất đánh dấu trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Harlow và Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); pha rắn có đánh dấu trực tiếp RIA với chất đánh dấu I-125 (xem, ví dụ, Morel và đồng tác giả, 1988, *Molec. Immunol.* 25:7–15); pha rắn biotin-avidin trực tiếp EIA (xem, ví dụ, Cheung, và đồng tác giả, 1990, *Virology* 176:546–552) và RIA được đánh dấu trực tiếp (Moldenhauer và đồng tác giả, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77–82). Nói chung, thử nghiệm liên quan đến việc sử dụng kháng nguyên tinh khiết liên kết với bề mặt rắn hoặc tế bào mang protein bất kỳ trong số protein liên kết kháng nguyên được thử nghiệm không được đánh dấu và một protein liên kết kháng nguyên viện dẫn được đánh dấu. Sự ức chế cạnh tranh được đo bằng cách đo lượng chất đánh dấu liên kết với bề mặt rắn hoặc tế bào khi có mặt của protein liên kết kháng nguyên được thử nghiệm. Nói chung, protein liên kết kháng nguyên được thử nghiệm có mặt với số lượng quá nhiều. Các protein liên kết kháng nguyên được xác định bởi thử nghiệm cạnh tranh (protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh) bao gồm: protein liên kết kháng nguyên liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như một protein liên kết kháng nguyên viện dẫn và một protein liên kết kháng

nguyên liên kết với một quyết định kháng nguyên kề nhau đủ gần một quyết định kháng nguyên liên kết của protein liên kết kháng nguyên viện dẫn, và hai quyết định kháng nguyên liên kết với nhau về mặt không gian để chen liên kết. Thông tin chi tiết khác về phương pháp đánh giá ràng buộc cạnh tranh được cung cấp trong các ví dụ của bản mô tả này. Nói chung, khi protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh tồn tại với lượng quá mức, sự liên kết cụ thể của protein liên kết kháng nguyên viện dẫn với kháng nguyên chung sẽ bị ức chế (ví dụ, giảm) ít nhất là khoảng 40–45%, 45–50%, 50–55%, 55–60%, 60–65%, 65–70%, 70–75% hoặc 75% hoặc cao hơn. Trong một số trường hợp, sự liên kết bị ức chế ít nhất 80–85%, 85–90%, 90–95%, 95–97% hoặc 97% hoặc cao hơn.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ phân tử ADN và phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là chuỗi đơn hoặc chuỗi kép, và tốt hơn là ADN sợi đôi, mARN sợi đơn hoặc mARN đã sửa đổi. Axit nucleic được "liên kết chức năng" khi nó được đặt vào mối quan hệ chức năng với một trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, trình tự khởi động hoặc trình tự tăng cường được liên kết chức năng với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự mã hóa.

"Độ tương đồng" trình tự axit amin được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm gốc axit amin có chung trình tự thứ nhất và trình tự thứ hai, trong đó để sắp xếp các trình tự axit amin, các khoảng trống được đưa vào khi cần thiết, để đạt được phần trăm độ tương đồng trình tự tối đa và sự thay thế bất kỳ không được coi là một phần của độ tương đồng trình tự. Nhằm mục đích xác định phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin, sự liên kết có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính có sẵn công khai như BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 hoặc phần mềm Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để đo sự liên kết, bao gồm thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được sự căn chỉnh tối đa của toàn bộ chiều dài của các chuỗi được căn chỉnh.

Thuật ngữ "vector biểu hiện" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển một axit nucleic khác mà nó đã được liên kết. Theo một phương án, vector là "plasmid" được dùng để chỉ vòng ADN sợi kép hình tròn mà trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được nối với nhau. Theo một phương án khác, vector này là vector

của virus, trong đó các đoạn ADN bổ sung có thể được liên kết với hệ gen của virus. Các vector được bộc lộ trong bản mô tả này có khả năng tự động sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có nguồn gốc sao chép của vi khuẩn và vector động vật có vú của episom) hoặc có khả năng tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ sau khi được đưa vào tế bào chủ và do đó sao chép với hệ gen của vật chủ (ví dụ, vector động vật có vú không thuộc episom).

Các phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong chương 5–8 và 15 của *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Ví dụ, chuột có thể được miễn dịch với ANGPTL3 của người hoặc một đoạn của nó, và các kháng thể thu được có thể được biến tính và tinh chế, và việc xác định trình tự axit amin có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường. Tương tự, các mảnh liên kết kháng nguyên cũng có thể được chuẩn bị bằng các phương pháp thông thường. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên được mô tả trong sáng chế được biến đổi di truyền để chứa một hoặc nhiều FR của người bổ sung trong CDR không phải của người. Trình tự dòng mầm FR của người có thể được lấy tại trang web của ImMunoGeneTics (IMGT) bằng cách so sánh cơ sở dữ liệu gen mầm vùng biến đổi kháng thể của người IMGT với phần mềm MOE hoặc lấy từ tạp chí immunoglobulin 2001 ISBN 012441351.

Thuật ngữ "tế bào chủ" được dùng để chỉ một tế bào mà một vector biểu hiện đã được đưa vào. Tế bào chủ có thể bao gồm tế bào vi khuẩn, tế bào vi sinh vật, tế bào thực vật hoặc tế bào động vật. Các vi khuẩn nhạy cảm với sự biến nạp bao gồm các loài thuộc họ *Enterobacteriaceae*, ví dụ, các chủng *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; các loài thuộc họ *Bacillaceae*, ví dụ, *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và *Haemophilus influenzae*. Các vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Các dòng tế bào vật chủ thích hợp bao gồm CHO (dòng tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc), tế bào 293 và tế bào NS0.

Kháng thể được thao tác di truyền hoặc đoạn liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra và tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tách dòng và tái tổ hợp thành một vector biểu hiện GS. Các vector biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được truyền ổn định vào các tế bào CHO. Hệ thống biểu hiện của động vật có vú, là

một kỹ thuật trước đây được khuyến nghị nhiều hơn, sẽ dẫn đến quá trình glycosyl hóa kháng thể, đặc biệt là ở vị trí tận cùng N có tính bảo thủ cao của vùng Fc. Các dòng vô tính ổn định thu được bằng cách biểu hiện của kháng thể liên kết đặc hiệu với ANGPTL3 của người. Các dòng vô tính dương được mở rộng trong môi trường không có huyết thanh trong lò phản ứng sinh học để tạo ra kháng thể. Dung dịch nuôi cấy có kháng thể tiết ra có thể được tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, quá trình tinh chế được thực hiện trên cột A hoặc G Sepharose FF chứa chất đệm đã được điều chỉnh. Các đoạn không liên kết đặc hiệu bị rửa trôi. Kháng thể liên kết được rửa giải bằng phương pháp gradien pH, và thu lấy các đoạn kháng thể được phát hiện bằng cách sử dụng SDS-PAGE. Kháng thể này có thể được lọc và cô đặc bằng các phương pháp thông thường. Hỗn hợp hòa tan và polyme cũng có thể được loại bỏ bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, rây phân tử và trao đổi ion. Sản phẩm thu được cần được làm đông lạnh ngay lập tức, ví dụ, ở -70°C , hoặc đông khô.

"Sử dụng", "cho sử dụng" và "điều trị", khi áp dụng cho động vật, con người, đối tượng thử nghiệm, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học, được dùng để chỉ sự tiếp xúc với thuốc ngoại sinh, chất điều trị, chất chẩn đoán hoặc chế phẩm cho động vật, con người, chủ thể, tế bào, mô, cơ quan hoặc dịch sinh học. "Sử dụng" "cho" và "điều trị" có thể đề cập đến, ví dụ, các phương pháp điều trị, dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu và thực nghiệm. Việc xử lý tế bào bao gồm tiếp xúc hóa chất với tế bào và tiếp xúc hóa chất với chất lỏng, trong đó chất lỏng tiếp xúc với tế bào. "Sử dụng", "cho sử dụng" và "điều trị" cũng được dùng để chỉ việc xử lý, ví dụ, tế bào bằng thuốc thử, chẩn đoán, chế phẩm liên kết hoặc bằng tế bào khác *in vitro* và *ex vivo*. "Điều trị", khi được áp dụng cho con người, thú y hoặc các đối tượng nghiên cứu, được dùng để chỉ việc điều trị triệu chứng, các biện pháp phòng ngừa hoặc dự phòng và các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

"Được điều trị" hoặc "điều trị" được dùng để chỉ việc sử dụng hợp chất điều trị, ví dụ, chế phẩm chứa hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất liên hợp theo sáng chế, bên trong hoặc bên ngoài cho bệnh nhân có một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh mà thuốc điều trị có tác dụng chữa bệnh đã biết. Thông thường, thuốc điều trị được sử dụng với một lượng có hiệu quả để làm giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ở bệnh nhân hoặc quần thể đang được điều trị để làm giảm các triệu chứng đó hoặc ức chế sự phát triển của các triệu chứng đó ở mức độ bất kỳ có thể đo lường được về mặt

lâm sàng. Lượng thuốc điều trị có hiệu quả để giảm bớt các triệu chứng của bệnh cụ thể bất kỳ (còn được gọi là "lượng có hiệu quả điều trị") có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố, ví dụ, tình trạng bệnh, tuổi và cân nặng của bệnh nhân, và khả năng của thuốc để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn ở bệnh nhân. Liệu một triệu chứng của bệnh đã thuyên giảm hay chưa có thể được đánh giá bằng phương pháp thử nghiệm lâm sàng bất kỳ thường được bác sĩ hoặc các chuyên gia chăm sóc sức khỏe khác sử dụng để đánh giá mức độ nghiêm trọng hoặc tiến triển của triệu chứng. Mặc dù các phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp hoặc sản phẩm điều trị) có thể không hiệu quả trong việc làm giảm bớt tất cả các triệu chứng bệnh mục tiêu ở mọi bệnh nhân, như được xác định theo phương pháp thử nghiệm thống kê bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, thử nghiệm t Student, thử nghiệm chi-square, thử nghiệm Mann và Whitney's U, thử nghiệm Kruskal-Wallis (thử nghiệm H), thử nghiệm Jonckheere-Terpstra và thử nghiệm Wilcoxon, chúng sẽ làm giảm các triệu chứng bệnh đích ở một số lượng bệnh nhân có ý nghĩa thống kê.

"Sửa đổi bảo toàn" hoặc "thay thế hoặc thế bảo toàn" được dùng để chỉ việc thay thế các axit amin trong một protein bằng các axit amin khác có các đặc điểm tương tự (ví dụ, điện tích, kích thước chuỗi bên, tính kỵ nước/tính ưa nước hoặc cấu trúc xương sống và độ cứng), sao cho các thay đổi có thể được thực hiện thường xuyên mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng, nói chung, sự thay thế axit amin đơn lẻ trong vùng không thiết yếu của polypeptit không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, Watson và đồng tác giả (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., trang 224, (ấn bản lần thứ 4)). Ngoài ra, việc thay thế các axit amin có cấu trúc hoặc chức năng tương tự không có khả năng làm gián đoạn hoạt động sinh học. Ví dụ về chất thay thế bảo toàn được nêu trong Bảng "Các chất thay thế bảo toàn axit amin được lấy làm ví dụ" dưới đây.

Bảng 1. Ví dụ về các chất thay thế bảo toàn axit amin

Gốc ban đầu	Thế bảo toàn
Ala(A)	Gly; Ser
Arg(R)	Lys; His
Asn(N)	Gln; His; Asp
Asp(D)	Glu; Asn
Cys(C)	Ser; Ala; Val
Gln(Q)	Asn; Glu
Glu(E)	Asp; Gln
Gly(G)	Ala
His(H)	Asn; Gln
Ile(I)	Leu; Val
Leu(L)	Ile; Val
Lys(K)	Arg; His
Met(M)	Leu; Ile; Tyr
Phe(F)	Tyr; Met; Leu
Pro(P)	Ala
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe
Tyr(Y)	Trp; Phe
Val(V)	Ile; Leu

"Lượng có hiệu quả" hoặc "liều lượng có hiệu quả" là lượng thuốc, hợp chất hoặc được phẩm cần thiết để đạt được một hoặc nhiều kết quả điều trị có lợi hoặc mong muốn bất kỳ. Đối với việc sử dụng phòng ngừa, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm loại bỏ hoặc giảm nguy cơ, giảm mức độ nghiêm trọng hoặc trì hoãn sự khởi phát của rối loạn, bao gồm các triệu chứng sinh hóa, mô học và/hoặc hành vi của rối loạn, các biến chứng của chúng và các kiểu hình bệnh lý trung gian xuất hiện trong quá trình tiến triển của bệnh. Đối với các ứng dụng điều trị, các kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm các kết quả lâm sàng, ví dụ, giảm tỷ lệ mắc các rối loạn khác nhau liên quan đến kháng nguyên đích theo sáng chế hoặc làm giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn, giảm liều lượng của các chất khác cần thiết để điều trị rối loạn, tăng cường hiệu quả điều trị của một chất khác và/hoặc làm chậm sự tiến triển của các rối loạn ở bệnh nhân liên quan đến kháng nguyên đích theo sáng chế.

"Ngoại sinh" là các chất được tạo ra bên ngoài sinh vật, tế bào hoặc cơ thể người tùy theo hoàn cảnh. "Nội sinh" được dùng để chỉ các chất được sản xuất bên trong tế bào, sinh vật hoặc cơ thể người tùy theo hoàn cảnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các cụm từ "tế bào", "dòng tế bào" và "nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các từ này bao gồm các thể hệ của chúng. Do đó, các từ "biến nạp" và "tế bào được biến nạp" bao gồm các tế bào

thử nghiệm sơ cấp và các tế bào nuôi cấy có nguồn gốc từ tế bào đó, bất kể số lần chuyển. Cũng cần hiểu rằng tất cả các thể hệ tế bào con có thể không hoàn toàn giống nhau về hàm lượng ADN do đột biến có chủ ý hoặc không có chủ ý. Thể hệ tế bào con đột biến có chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc trong các tế bào đã biến nạp ban đầu được bao gồm. Khi đề cập đến các chỉ định khác nhau, chúng sẽ trở nên rõ ràng qua ngữ cảnh.

"Phản ứng chuỗi polymeraza" hoặc "PCR" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến quy trình hoặc phương pháp, trong đó lượng vết của gốc axit nucleic, ARN và/hoặc ADN cụ thể được khuếch đại như được mô tả trong, ví dụ, Patent Hoa Kỳ số 4,683,195. Nói chung, cần phải có được thông tin trình tự từ phần cuối hoặc bên ngoài vùng đích để có thể thiết kế các đoạn mồi oligonucleotit; các mồi này giống nhau hoặc tương tự về trình tự với sợi tương ứng của khuôn mẫu cần khuếch đại. Nucleotit đầu 5' của 2 đoạn mồi có thể trùng với điểm cuối của vật liệu cần khuếch đại. PCR có thể được sử dụng để khuếch đại trình tự ARN cụ thể, trình tự ADN cụ thể từ ADN hệ gen tổng số và trình tự cADN được phiên mã từ tổng số trình tự ARN tế bào tổng số, phago, plasmit hoặc vật liệu tương tự. Nhìn chung, xem Mullis, và đồng tác giả, (1987) *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51: 263; Ed. Erlich (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). PCR được sử dụng trong bản mô tả này được coi là ví dụ, nhưng không phải là ví dụ duy nhất, về phương pháp phản ứng polymeraza axit nucleic để khuếch đại mẫu thử axit nucleic và phương pháp này bao gồm bước sử dụng axit nucleic đã biết để làm mồi và polymeraza axit nucleic để khuếch đại hoặc tạo ra gốc axit nucleic cụ thể.

"Được phân lập" được dùng để chỉ trạng thái đã tinh chế và trong trường hợp này có nghĩa là phân tử được chỉ định về cơ bản không chứa các phân tử sinh học khác, ví dụ, axit nucleic, protein, lipid, carbohydrat hoặc các chất khác (như mảnh vụn tế bào và môi trường tăng trưởng). Nói chung, thuật ngữ "được phân lập" không có nghĩa là sự vắng mặt hoàn toàn của các chất đó hoặc không có nước, chất đệm hoặc muối, trừ khi chúng có mặt với lượng sẽ gây trở ngại đáng kể cho việc sử dụng thử nghiệm hoặc điều trị của các hợp chất được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "tùy chọn" hoặc "không bắt buộc" có nghĩa là sự kiện hoặc hoàn cảnh được mô tả sau đó có thể xảy ra nhưng không nhất thiết và mô tả bao gồm các trường hợp mà sự kiện hoặc hoàn cảnh đó xảy ra hoặc không xảy ra.

Thuật ngữ "dược phẩm" được dùng để chỉ hỗn hợp chứa một hoặc nhiều hợp chất được mô tả trong bản mô tả này hoặc muối hoặc tiền dược lý/dược dụng của chúng, và các thành phần hóa học khác, và các thành phần khác, ví dụ, chất mang và tá dược sinh lý/dược dụng. Mục đích của dược phẩm là thúc đẩy hoạt động đối với sinh vật, tạo điều kiện thuận lợi cho việc hấp thụ thành phần hoạt tính, do đó tạo ra sinh khả dụng.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" được dùng để chỉ chất không hoạt động thích hợp bất kỳ để sử dụng trong các chế phẩm để phân phối kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên. Chất mang có thể là chất kháng kết dính, chất kết dính, chất phủ, chất phân hủy, chất độn hoặc chất pha loãng, chất bảo quản (như chất kháng oxy hóa, chất kháng khuẩn hoặc chất kháng nấm), chất làm ngọt, chất làm chậm hấp thụ, chất làm ướt, chất nhũ hóa, chất đệm, v.v. Ví dụ về chất mang dược dụng bao gồm nước, etanol, polyol (như glyxerol, propandiol và polyetylen glycol), dextroza, dầu thực vật (như dầu ô liu), nước muối, dung dịch đệm, dung dịch muối đệm và chất đẳng trương như đường, polyol, sorbitol và natri clorua.

Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm các dược chất để điều trị các bệnh liên quan đến tế bào dương tính của kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3) và các chất này bao gồm hoạt chất là kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Không có giới hạn đối với các bệnh liên quan đến ANGPTL3 trong sáng chế, miễn đó là bệnh liên quan đến ANGPTL3. Ví dụ, đáp ứng điều trị gây ra bởi phân tử theo sáng chế có thể đạt được bằng cách liên kết với ANGPTL3 của người và sau đó chặn sự liên kết của ANGPTL3 với các thụ thể của nó. Do đó, các phân tử theo sáng chế, khi ở trong các chế phẩm và chế phẩm thích hợp cho các ứng dụng điều trị, rất hữu ích cho các người bị tăng cholesterol máu, tăng lipit máu, bệnh mạch vành hoặc bệnh tương tự.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3), hóa chất phát hiện miễn dịch hoặc xác định kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3), phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định tế bào biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3) và các chất chẩn đoán để chẩn đoán các bệnh liên quan đến các tế bào dương tính với kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3), bao gồm kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế là

thành phần hoạt tính, nhận biết đặc hiệu kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3 của người) và liên kết với trình tự axit amin của vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của chúng.

Theo sáng chế, phương pháp được sử dụng để phát hiện hoặc xác định lượng kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3) có thể là phương pháp bất kỳ đã biết. Ví dụ, phương pháp này bao gồm các phương pháp phát hiện hoặc xác định miễn dịch.

Phương pháp phát hiện hoặc xác định miễn dịch là phương pháp phát hiện hoặc xác định lượng kháng thể hoặc kháng nguyên bằng cách sử dụng các kháng nguyên hoặc kháng thể được đánh dấu. Ví dụ về phương pháp phát hiện hoặc xác định miễn dịch bao gồm thử nghiệm phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch enzyme (EIA hoặc ELISA), thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (FIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang, phương pháp lai western, phương pháp hóa lý, v.v.

Các bệnh nêu trên liên quan đến các tế bào dương tính với ANGPTL3 có thể được chẩn đoán bằng cách phát hiện hoặc xác định các tế bào biểu hiện ANGPTL3 bằng cách sử dụng kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế.

Nhằm phát hiện các tế bào biểu hiện polypeptit, có thể sử dụng các phương pháp phát hiện miễn dịch đã biết, tốt hơn là phương pháp kết tủa miễn dịch, nhuộm tế bào huỳnh quang, nhuộm hóa mô miễn dịch, v.v. Ngoài ra, có thể sử dụng phương pháp nhuộm kháng thể huỳnh quang bằng cách sử dụng hệ thống FMAT8100HTS (Applied Biosystem).

Theo sáng chế, không có giới hạn cụ thể đối với mẫu được sử dụng để phát hiện hoặc xác định kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3), miễn là mẫu này có khả năng bao gồm các tế bào biểu hiện kháng nguyên đích (ví dụ, ANGPTL3), ví dụ, mô tế bào, máu, huyết thanh, huyết thanh, dịch tụy, nước tiểu, phân, dịch mô hoặc dung dịch nuôi cấy.

Theo phương pháp chẩn đoán bắt buộc, chất chẩn đoán chứa kháng thể đơn dòng hoặc đoạn kháng thể của nó theo sáng chế cũng có thể chứa hóa chất để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể hoặc hóa chất để phát hiện phản ứng. Hóa chất để thực hiện phản ứng kháng nguyên-kháng thể bao gồm chất đệm, muối, v.v. Hóa chất để phát hiện bao gồm hóa chất thường được sử dụng trong phương pháp phát hiện hoặc xác định miễn dịch, ví dụ kháng thể thứ hai được đánh dấu nhận biết kháng thể đơn

dòng, đoạn kháng thể của nó hoặc liên hợp của chúng, và chất nền tương ứng với chất đánh dấu, v.v.

Một hoặc nhiều phương án theo sáng chế được mô tả chi tiết trong bản mô tả trên đây. Mặc dù phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc giống với các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và vật liệu được ưu tiên được mô tả dưới đây. Các dấu hiệu, mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ rõ ràng từ phần mô tả và yêu cầu bảo hộ. Trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, các dạng số ít bao gồm các viện dẫn số nhiều trừ khi được chỉ định rõ ràng trong ngữ cảnh. Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến sáng chế. Tất cả các patent và công bố được trích dẫn trong bản mô tả đều được kết hợp bằng cách viện dẫn. Các ví dụ sau đây được đưa ra để minh họa đầy đủ hơn các phương án được ưu tiên của sáng chế. Các ví dụ này không nên được hiểu theo cách bất kỳ là giới hạn phạm vi của sáng chế, được xác định bởi yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

FIG.1 thể hiện tác dụng của kháng thể P8BG lên triglycerit trong huyết thanh của chuột Sprague Dawley (SD);

FIG.2 thể hiện tác dụng của kháng thể P3G lên triglycerit trong huyết thanh của chuột SD;

FIG.3 thể hiện tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với triglycerit trong huyết thanh ở chuột ăn kiêng chất béo cao (HFD);

FIG.4 thể hiện tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với cholesterol lipoprotein mật độ thấp trong huyết thanh (LDL-C) (LDL-C) ở chuột HFD;

FIG.5 thể hiện tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với cholesterol tổng số trong huyết thanh ở chuột HFD;

FIG.6 thể hiện tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với triglycerit trong huyết thanh ở chuột APOE (chuột đã bị loại bỏ gen apolipoprotein E (ApoE));

FIG.7 thể hiện tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với cholesterol lipoprotein mật độ cao trong huyết thanh (HDL-C) ở chuột APOE;

FIG.8 thể hiện kết quả thử nghiệm được động học *in vivo* của kháng thể kháng ANGPTL3 trên chuột; và

FIG.9 thể hiện kết quả thử nghiệm được động học *in vivo* của kháng thể kháng ANGPTL3 trên khỉ đuôi dài cynomolgus.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các ví dụ sau đây minh họa thêm cho sáng chế, nhưng sáng chế không giới hạn ở các ví dụ này.

Các quy trình thử nghiệm không có các điều kiện được chỉ ra trong các Ví dụ hoặc Ví dụ thử nghiệm theo sáng chế thường được thực hiện theo các điều kiện thông thường hoặc theo các điều kiện do nhà sản xuất nguyên liệu ban đầu hoặc sản phẩm thương mại khuyến nghị. Xem Sambrook và đồng tác giả, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel và đồng tác giả, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates và Wiley Interscience, NY. Hóa chất không có nguồn gốc cụ thể được chỉ ra là hóa chất thông thường được bán trên thị trường.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thiết kế và biểu hiện kháng nguyên ANGPTL3

Protein ANGPTL3 của người (Số Uniprot: Q9Y5C1), protein ANGPTL3 của chuột (Số Uniprot: Q9R182), Protein ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus (Số Uniprot: A0A2K5UDC5) và Protein ANGPTL3 của chuột (Số Uniprot: F7FHP0) đã được sử dụng làm mẫu ANGPTL3 theo sáng chế, và để thiết kế kháng nguyên và protein để phát hiện liên quan đến sáng chế. Các đuôi khác nhau được dung hợp với protein ANGPTL3 và tách dòng mỗi protein thu được thành vector pTT5 (Biovector, Cat #: 102762), biểu hiện chuyển nạp nhanh trong tế bào 293 và tinh chế, do đó thu được các kháng nguyên và protein để phát hiện theo sáng chế.

1. ANGPTL3 ở người có chiều dài đầy đủ: ANGPTL3 (17-460)-His của người được sử dụng để tạo miễn dịch và phát hiện và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLK
DFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSL
ELNSKLESLLKILLQQKVYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSKTFVEKQDNSIKDL
LQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKH

DGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETW
 ENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKHYIEYSFYLGNETNY
 TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHAKAGHFNCPEGYSGGWWWHDECENNLNG
 KYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:1

Lưu ý: phần gạch chân đơn là trình tự peptit tín hiệu, phần in nghiêng là trình tự His, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 460 của protein ANGPTL3 có chiều dài đầy đủ của người.

2. Vùng ngoại bào của ANGPTL3 của người: ANGPTL3 của người(17-170)-Flag-His, được sử dụng để tạo miễn dịch và phát hiện và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLK
 DFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSL
 ELNSKLESLLSEKILLQQKVYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSKTFVEKGSSDYKDD
 DDKHHHHHHH

SEQ ID NO:2

Lưu ý: phần gạch chân đơn là peptit tín hiệu, phần gạch chân đôi là peptit liên kết, phần in nghiêng là dấu hiệu và His, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 170 của protein ANGPTL3 có chiều dài đầy đủ của người.

3. Protein dung hợp của vùng ngoại bào của ANGPTL3 của người (ANGPTL3 của người(17-170)) và đoạn IgG2aFc của chuột (được viết tắt là mFc): ANGPTL3 của người(17-170)-mFc, được sử dụng để phát hiện và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLK
 DFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSL
 ELNSKLESLLSEKILLQQKVYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSKTFVEKEPRGPTIKP
 CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQ
 THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEE
 MTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS
 YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:3

Lưu ý: phần gạch chân là peptit tín hiệu, phần in nghiêng là IgG2aFc của chuột, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 170 của protein ANGPTL3 có chiều dài đầy đủ của người.

4. Protein dung hợp của vùng ngoại bào của ANGPTL3 của người (ANGPTL3 của người(17-220)) và đoạn IgG2aFc của chuột: ANGPTL3 của người(17-220)-mFc, có thể được sử dụng để tạo miễn dịch và phát hiện, và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLK
 DFVHKTGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSL
 ELNSKLESLLSEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSIKDL
 LQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLL
 GGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVV
 SALPIQHQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMV
 TDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLKRVKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN
 HHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:4

Lưu ý: phần gạch chân là peptit tín hiệu, phần in nghiêng là IgG2aFc của chuột, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 220 của protein ANGPTL3 có chiều dài đầy đủ của người.

5. ANGPTL3 của chuột nhất có chiều dài đầy đủ: ANGPTL3 của chuột nhất (17-455)-His, được sử dụng để tạo miễn dịch và phát hiện và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPLSSFDSAPSEPKSFRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
 KDFVHKTGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKKEEEKELRRTTSTLQVKNEEVKNMS
 VELNSKLESLLSEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAEHPEVTSLKSFVEQQDNSIRE
 LLQSVVEEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPSSENSLSSKSRAPRTTPPLQLNETENT
 EQDDLPADESAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGQFNVYCDTQSGSPWTLIQHRKDGSQDFN
 ETWENYEKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVQQSNYILRLELQDWKDSKHVEYSFHLGSH
 ETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHRAKGQLYCPESYSGGWWNDICGENN
 LNKYKNKPRTKSRPERRRGYWRPQSRKLYAIKSSKMMLQPTTHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:5

Lưu ý: phần gạch chân là peptit tín hiệu, phần in nghiêng là trình tự His, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 455 của protein ANGPTL3 của chuột có chiều dài đầy đủ.

6. Protein dung hợp của vùng ngoại bào của ANGPTL3 của chuột nhất (ANGPTL3 của chuột (17-220)) và đoạn IgG2aFc của chuột: ANGPTL3 của chuột nhất (17-220)-mFc, được sử dụng để tạo miễn dịch và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPLSSFDSAPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
 KDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEKELRRTTSTLQVKNEEVKNMS
 VELNSKLESLLEEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAQEHPEVTSLKSFVEQQDNSIRE
 LLQSVEEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPESENSLSSKSEPRGPTIKPCPPCKCPAPN
 LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLR
 VVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTC
 MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL
 HNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO:6

Lưu ý: phần gạch chân là peptit tín hiệu, phần in nghiêng là IgG2aFc của chuột, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 220 của protein ANGPTL3 của chuột có chiều dài đầy đủ.

7. ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus có chiều dài đầy đủ: ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus(17-460)-His, được sử dụng để phát hiện và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSVSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLK
 DVFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSL
 ELNSKLESLLEEKILLQQVKYLEEQLTNLIQNQPATPEHPEVTSLKSFVEKQDNSIKDL
 LQTVEEQYKQLNQQHSQIKEIENQLRMTNIQEPTAISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKH
 DGIPADCTTIYNRGEHISGTYAIRPSNSQVFHVYCDVVGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWE
 NYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYT
 LHVVKITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHAKAGHFSCPESSGGWWWHDECGENNLNGK
 YNKPRTKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:7

Lưu ý: phần gạch chân là peptit tín hiệu, phần in nghiêng là trình tự His, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 460 của ANGPTL3 của protein của khỉ đuôi dài cynomolgus có chiều dài đầy đủ.

8. ANGPTL3 của chuột có chiều dài đầy đủ: ANGPTL3 của chuột (17-455)-His, được sử dụng để phát hiện và có trình tự amino axit như sau:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPLSPFDSVPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGL
 KDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQCFYDLSLQTNEIKEEEKELRRTTSLQVKNEEVKNM
 SLELNSKLESLLEEKMALQHRVRALEEQLTSLVQNPPGAREHPEVTSLKSFVEQQDNSIR
 ELLQSVEEQYKQLSQQHIIQIKEIENQLRKTGIQEPTENSLYSKPRAPRTTPPLHLKEAKNI

EQDDLPA DCSAIYNRGEHTSGVYTIRPSSSQVFNVYCDTQSGTPRTLQHRKDG SQNFNQ
 TWENYEKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVKQSNYILRLELQDWKDSKH YAEYSFHLGNHE
 TNYTLHVAEIAANIPEALPEHRDLMFSTWDHRAKGQLYC PESYSGGWWFSDMCGENNL
 NGKYNKPRAKSKPERRRGISWRPRGGKLYSIKSSKMMLQPTTHHHHHHHHHH

SEQ ID NO:8

Lưu ý: phần gạch chân là peptit tín hiệu, phần in nghiêng là trình tự His, và phần in đậm là amino axit ở vị trí từ 17 đến 455 của protein ANGPTL3 của chuột có chiều dài đầy đủ.

Ví dụ 2: Tinh chế protein kháng nguyên ANGPTL3, kháng thể dung hợp tế bào và kháng thể tái tổ hợp

1. Tinh chế protein tái tổ hợp với His-tag hoặc protein tái tổ hợp với Flag-His-tag

Mẫu biểu hiện tế bào được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ tế bào và các tạp chất không hòa tan, thu lấy dịch nổi, và bổ sung imidazol để đạt được nồng độ cuối cùng là 5mM. Cột niken được cân bằng với dung dịch PBS chứa 5mM imidazol và rửa với thể tích cột 2–5. Sau đó, dịch nổi tế bào được bơm lên cột. Rửa cột này bằng dung dịch PBS chứa 5mM imidazol cho đến khi số ghi A_{280} giảm xuống mức ban đầu. Sau đó, cột sắc ký được rửa bằng hỗn hợp chứa PBS và 10mM imidazol để loại bỏ protein chưa tinh chế liên kết không đặc hiệu, và thu lấy dòng chảy. Rửa giải protein đích bằng dung dịch PBS chứa 300mM imidazol và thu được đỉnh rửa giải.

Dịch rửa giải thu thập được tiếp tục được tinh chế bằng cách sử dụng cột lọc gel Superdex và sau đó được thu lấy bằng các ống. Xác định mẫu thu được bằng SDS-PAGE, bản đồ peptit và LC-MS, và sau đó, phần mẫu để sử dụng sau này nếu được xác định là đúng. Do đó, thu được protein tái tổ hợp với đuôi His hoặc protein tái tổ hợp với đuôi Flag-His.

2. Tinh chế kháng thể dung hợp tế bào hoặc protein tái tổ hợp chứa mảnh mFc.

Mẫu được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ tế bào và các tạp chất không hòa tan, và giữ lại dịch nổi. Cột ái lực protein A được cân bằng với PBS 1× và rửa với thể tích cột 2–5. Mẫu nổi trên bề mặt thể hiện tế bào đã được ly tâm được bơm lên cột. Rửa cột này bằng PBS 1× cho đến khi A_{280} số ghi giảm xuống mức ban đầu. Sau đó, cột này được rửa bằng 1× PBS. Rửa giải protein đích bằng axit axetic 0,1M (độ pH nằm trong khoảng 3,5–4,0) và thu lấy protein này, và sau đó, độ pH của protein đã rửa giải ngay

lập tức được điều chỉnh thành trung tính bằng Tris-HCl 1M (độ pH=7,0), và cuối cùng, protein đã rửa giải được đưa vào thẩm tách hoặc trao đổi đệm thành đệm PBS 1×. Thu lấy mẫu, xác định bằng cách điện di, bản đồ peptit và LC-MS, và sau đó, phần mẫu để sử dụng sau này nếu được xác định là đúng. Do đó, thu được protein tái tổ hợp chứa mảnh mFc hoặc kháng thể dung hợp tế bào.

3. Tinh chế kháng thể và protein tái tổ hợp với đuôi Fc

Mẫu được ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ tế bào và các tạp chất không hòa tan, và giữ lại dịch nổi. Cột ái lực protein G được cân bằng với PBS 1× và rửa với thể tích cột 2–5. Mẫu nổi trên bề mặt thể hiện tế bào đã được ly tâm được bơm lên cột. Rửa cột này bằng PBS 1× cho đến khi số ghi A₂₈₀ giảm xuống mức ban đầu. Sau đó, cột này được rửa bằng 1× PBS. Rửa giải protein đích bằng axit axetic (độ pH=3,0) và thu lấy protein này, và sau đó, độ pH của protein đã rửa giải ngay lập tức được điều chỉnh thành trung tính bằng Tris-HCl 1 M (độ pH=7,0), và cuối cùng, protein đã rửa giải được đưa vào thẩm tách hoặc trao đổi đệm thành đệm PBS 1×. Mẫu được thu lấy, xác định bằng cách điện di, bản đồ peptit và LC-MS, và sau đó, phần mẫu để sử dụng sau này nếu được xác định là đúng. Do đó, thu được kháng thể hoặc protein tái tổ hợp có đuôi hFc.

Ví dụ 3: Tạo ra kháng thể kháng ANGPTL3

1. Sàng lọc kháng thể có nguồn gốc từ người kháng ANGPTL3 bằng thư viện phagơ

Thư viện kháng thể chuỗi đơn của phagơ của người được đóng gói và cô đặc, và sau đó, thư viện phagơ (10^{12} - 10^{13} /pfu) được tạo huyền phù trong 1ml MPBS 2% (PBS chứa 2% sữa bột gầy), và sau đó, bổ sung 100µl Dynabeads® M-280 streptavidin (Invitrogen, Số Cat 11206D). Ống này được đặt trên giá đỡ từ tính và lăn qua lăn lại nhiều lần, và sau đó, được chẹn ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, ống này được đặt trên giá đỡ từ tính trong 2 phút, loại bỏ Dynabead, và sau đó thư viện phagơ được chuyển sang một ống mới. Bổ sung 2 µg/mL ANGPTL3 của người được đánh dấu biotin(17-460)-His vào thư viện phagơ bị chẹn, và sau đó, ống này được đặt trên giá đỡ từ tính và lăn qua lăn lại nhiều lần trong 1 giờ. Đồng thời, 100µl Dynabeads được tạo huyền phù trong 1ml 2% MPBS, và sau đó, ống này được đặt trên giá đỡ từ tính và lăn qua lăn lại nhiều lần, và sau đó, được chẹn ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, ống này được đặt trên giá đỡ từ tính trong 2 phút, và dung dịch chẹn được hút ra.

Dynabead đã chẹn được bổ sung vào hỗn hợp chứa thư viện phago và ANGPTL3 của người(17-460)-His, và đặt ống chứa hỗn hợp thu được trên đĩa quay và lăn qua lăn lại nhiều lần trong 15 phút. Sau đó, ống này được đặt trên giá đỡ từ tính trong 2 phút, và dung dịch hỗn hợp được hút ra. Rửa Dynabeads 10 lần bằng 1ml PBST (PBS chứa 0,1% Tween-20), và bổ sung 0,5 mL trypsin 1mg/mL (Sigma, Số Cat T1426-250MG). Sau đó, ống này được đặt trên đĩa quay và ủ trong 15 phút lăn qua lăn lại nhiều lần, và sau đó, thực hiện rửa giải. Sau đó, phago đã rửa giải được dùng để lây nhiễm E. coli TG1, sau đó, được sử dụng để cấy trải. Các dòng đơn lẻ được chọn ngẫu nhiên cho ELISA phago.

Các dòng vô tính được cấy vào đĩa giếng sâu 96 giếng (Số Nunc Cat 260251) và được ủ ở 37°C trong 16–18 giờ. Một số lượng nhỏ các dòng vô tính đã ủ được cấy vào đĩa giếng sâu 96 giếng cho đến khi OD₆₀₀ đạt đến khoảng 0,5, và sau đó, phago trợ giúp M13K07 (NEB, số Cat N0315S) được bổ sung vào để đóng gói. Hỗn hợp này được ly tâm ở 4000 g trong 10 phút để loại bỏ vi khuẩn, và dung dịch nuôi cấy được hút ra để phát hiện ELISA liên kết ANGPTL3. Các dòng dương tính được bảo quản lạnh và gửi đến công ty giải trình tự để giải trình tự. Trình tự axit amin tương ứng với các dòng P3 và P8 dương tính như sau:

> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của P3:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYLHWLRQAPGQGPEWMGWISPNSGGTSYAQK
FQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDIATLGNFFTYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:9

> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của P3:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS
GTDFLTITISLQPEDFATYYCQQSYSSWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:10

> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của P8:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPRDDSTSYAQKF
QGRVTMTRDTSSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:11

> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của P8:

DVVMTQSP~~LSLPVTPGEPASISCRSSQSL~~LHSNGYTYLDWYLQKPGQSPQ~~LLIYLGS~~NRASGV~~PDR~~
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC~~MQALQTPLTFGQ~~GRLEIK

SEQ ID NO:12

Lưu ý: phần gạch chân trong trình tự này là trình tự CDR được xác định theo hệ thống đánh số Kabat, và phần in nghiêng là trình tự FR.

2. Gây đột biến kháng thể kháng ANGPTL3

Dựa trên cấu trúc ba chiều của kháng thể P8, gốc axit amin ở vị trí 55 (được đánh số theo thứ tự tự nhiên) trong vùng biến đổi chuỗi nặng của P8 đã bị đột biến từ D thành E, và gốc axit amin ở vị trí 34 (được đánh số theo thứ tự tự nhiên) trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của P8 đã bị đột biến từ G thành V, do đó thu được phân tử kháng thể mới P8B, trong đó trình tự axit amin của P8B như sau:

> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của P8B:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV~~SC~~KASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPREDSTSYAQKF
QGRVTMT~~RD~~TSTSTM~~Y~~MELSSLRSED~~TA~~VYFCARDLGSIREVL~~YY~~GMDVWGQGT~~TV~~VSS

SEQ ID NO:13

> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của P8B:

DVVMTQSP~~LSLPVTPGEPASISCRSSQSL~~LHSNVYTYLDWYLQKPGQSPQ~~LLIYLGS~~NRASGV~~PDR~~
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC~~MQALQTPLTFGQ~~GRLEIK

SEQ ID NO:14

Lưu ý: phần gạch chân trong trình tự này là trình tự CDR được xác định theo hệ thống đánh số Kabat, và phần in nghiêng là trình tự FR.

Bảng 2. Trình tự CDR của phân tử kháng thể kháng ANGPTL3

Phân tử kháng thể	Chuỗi nhẹ CDR		Chuỗi nặng CDR	
P3	LCDR1	RASQGIRNDLG (SEQ ID NO:15)	HCDR1	DYYLH (SEQ ID NO:18)
	LCDR2	AASSLQS (SEQ ID NO:16)	HCDR2	WISPNSGGTSYAQKFQG (SEQ ID NO:19)
	LCDR3	QQSYSSWT (SEQ ID NO:17)	HCDR3	DIATLGNFFTYGMDV (SEQ ID NO:20)
P8	LCDR1	RSSQSLHLSNGYTYLD (SEQ ID NO:21)	HCDR1	SYDIN (SEQ ID NO:24)
	LCDR2	LGSNRAS (SEQ ID NO:22)	HCDR2	LINPRDDSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:25)
	LCDR3	MQALQTPLT (SEQ ID NO:23)	HCDR3	DLGSIREVLYYGMDV (SEQ ID NO:26)
P8B	LCDR1	RSSQSLHLSNVYTYLD (SEQ ID NO:27)	HCDR1	SYDIN (SEQ ID NO:24)
	LCDR2	LGSNRAS (SEQ ID NO:22)	HCDR2	LINPREDSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:28)
	LCDR3	MQALQTPLT (SEQ ID NO:23)	HCDR3	DLGSIREVLYYGMDV (SEQ ID NO:26)

3. Thiết kế và biểu hiện của kháng thể kháng ANGPTL3

Đoạn môi đã được thiết kế, và sau đó, một đoạn gen VH/VK của kháng thể được thiết kế bằng PCR và được tái tổ hợp tương đồng với một vector biểu hiện pHr (với peptit tín hiệu và gen mã hóa cho vùng bảo thủ (đoạn CH1-FC/CL)), do đó tạo ra vector biểu hiện VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr cho kháng thể có chiều dài đầy đủ. Vùng bảo thủ của chuỗi nặng của kháng thể này có thể được chọn từ nhóm bao gồm vùng bảo thủ của người IgG1, IgG2, IgG4 và biến thể của chúng, và vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ có thể được chọn từ nhóm bao gồm vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ của chuỗi κ và λ của người hoặc biến thể của chúng. Ví dụ, vùng bảo thủ của chuỗi nặng của kháng thể được chọn từ biến thể IgG4-YTE của người có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:29, và vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ được chọn từ vùng bảo thủ của chuỗi κ của người có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:30.

Trình tự vùng bảo thủ của chuỗi nặng biến thể IgG4-YTE của người:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVERESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL

HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG
FYPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:29

Trình tự vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ của chuỗi κ ở người:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:30

Vùng bảo thủ của chuỗi nặng/chuỗi nhẹ như được mô tả trên đây, cùng với các vùng biến đổi của P3, P8 và P8B như được mô tả trên đây, tạo thành các kháng thể kháng ANGPTL3: P3G, P8G và P8BG hoàn chỉnh, và trình tự chuỗi nhẹ/nặng của kháng thể này được minh họa như sau:

>Trình tự chuỗi nặng của P3G:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDY¹YLHWLRQAPGQGPEWMGWISPNSGGTSYAQK
FQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDIATLGNFFTYGMDVWGQGTTVTVSSASTKG
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGKTKYTCNV²DHKPSNTKVDKRVESKYGPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYI
TREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK

SEQ ID NO:31

>Trình tự chuỗi nhẹ của P3G:

DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:32

>Trình tự chuỗi nặng của P8G:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPRDDSTSYAQKF
QGRVTMTRDTSSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKG
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDLYI
 TREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSLGK

SEQ ID NO:33

>Trình tự chuỗi nhẹ của P8G:

DVVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSQSLLSNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:34

>Trình tự chuỗi nặng của P8BG:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPREDSTSYAQKF
QGRVTMTTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYYGMADVWGQGTTVTVSSASTKG
 PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDLYI
 TREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSLGK

SEQ ID NO:35

>Trình tự chuỗi nhẹ của P8BG:

DVVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSQSLLSNVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:36

Kiểm tra hoạt tính của các kháng thể theo sáng chế bằng các phương pháp thử nghiệm sinh hóa

Ví dụ thử nghiệm 1: Thử nghiệm ELISA để liên kết các kháng thể kháng ANGPTL3 với protein ANGPTL3

Kháng thể kháng ANGPTL3 đã ức chế hoặc đã được can thiệp vào ít nhất một hoạt động của protein ANGPTL3 bằng cách liên kết với protein ANGPTL3. Hoạt tính liên kết của kháng thể kháng ANGPTL3 với kháng nguyên ANGPTL3 đã được kiểm tra bằng thử nghiệm ELISA. Protein ANGPTL3 (ANGPTL3 của người (17-170)-mFc) được cố định trên vi đĩa 96 giếng bằng cách liên kết với IgG kháng chuột của dê được cấy trên vi đĩa, và hoạt tính liên kết của kháng thể với ANGPTL3 được xác định theo cường độ của tín hiệu sau khi kháng thể được bổ sung. Trong khi đó, các protein ANGPTL3 có đuôi HIS (chuột ANGPTL3 (17-455)-His, khi đuôi dài cynomolgus ANGPTL3 (17-460)-His và chuột ANGPTL3 (17-455)-His) được đánh dấu với chất đánh dấu biotin (Dojindo Trung Quốc, LK03) được cố định trên vi đĩa 96 giếng bằng cách liên kết với streptavidin phủ trên vi đĩa, và hoạt tính liên kết của kháng thể với ANGPTL3 được xác định theo cường độ của tín hiệu sau khi bổ sung kháng thể.

IgG kháng chuột của dê (Sigma, M3534-1ML) được pha loãng đến nồng độ 2 $\mu\text{g/mL}$ với đệm PBS (Shanghai BasalMedia, B320, độ pH=7,4), được bổ sung vào vi đĩa 96 giếng (Corning, CLS3590-100EA) với lượng 50 μL /giếng, và sau đó ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 3 giờ hoặc ủ ở 4°C qua đêm (16–18 giờ). Sau khi chất lỏng được loại bỏ, dung dịch chẹn sữa tách béo (BD, 232100) đã pha loãng trong 5% PBS được bổ sung với lượng 250 μL /giếng, và hỗn hợp này được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 3 giờ hoặc ủ ở 4°C qua đêm (16–18 giờ) để chẹn. Sau khi quá trình chẹn kết thúc, dung dịch chẹn được loại bỏ và đĩa được rửa 3 lần bằng dung dịch đệm PBST (độ pH=7,4 PBS chứa 0,05% Tween-20), và sau đó ANGPTL3 (17-170)-mFc của người (với trình tự được quy định trong SEQ ID NO:3) được pha loãng thành 0,5 $\mu\text{g/mL}$ bằng chất pha loãng mẫu (độ pH=7,4 PBS chứa 1% BSA) được bổ sung với lượng 50 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi kết thúc quá trình ủ, dung dịch phản ứng trong vi đĩa được loại bỏ. Đĩa được rửa 3 lần bằng PBST, và sau đó, một kháng thể thử nghiệm được pha loãng với dung dịch pha loãng mẫu đến các nồng độ khác nhau được bổ sung ở 50 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi ủ xong, đĩa được rửa 3 lần bằng PBST, và kháng thể thứ cấp kháng người của dê (Jackson Immuno Research, 109-035-003) đã được pha loãng với dung dịch pha loãng mẫu với lượng 50 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 1 giờ. Đĩa được rửa 3 lần bằng PBST, và sau đó chất nền tạo màu TMB (KPL, 52-00-03) được bổ sung với lượng 50 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2–5

phút, và phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung H_2SO_4 1M với lượng 50 μL /giếng. Độ hấp thụ ở bước sóng 450nm được đọc bằng đầu đọc vi đĩa VersaMax và trị số EC_{50} liên kết của kháng thể kháng ANGPTL3 với protein kháng nguyên ANGPTL3 đã được tính toán. Kết quả thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 3.

Streptavidin (Sigma, S4762-5MG) được pha loãng đến nồng độ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bằng dung dịch đệm PBS (Shanghai BasalMedia, B320, độ $\text{pH}=7,4$), được bổ sung vào vi đĩa 96 giếng (Corning, CLS3590-100EA) với lượng 50 μL /giếng, và sau đó được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 3 giờ hoặc ủ ở 4°C qua đêm (16–18 giờ). Sau khi chất lỏng được loại bỏ, dung dịch chẹn sữa tách béo 5% PBS (BD, 232100) đã pha loãng được bổ sung với lượng 250 μL /giếng, và hỗn hợp này được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 3 giờ hoặc ủ ở 4°C qua đêm (16–18 giờ) để chẹn. Sau khi quá trình chẹn kết thúc, dung dịch chẹn được loại bỏ và đĩa được rửa 3 lần với đệm PBST (độ $\text{pH}=7,4$ PBS chứa 0,05% Tween-20), và chuột được đánh dấu biotin ANGPTL3 (17-455)-His (với bộ trình tự xuất hiện trong SEQ ID NO:5), khỉ đuôi dài cynomolgus ANGPTL3 (17-460)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:7) và chuột ANGPTL3 (17-455)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO : 8) mỗi lần được pha loãng đến 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bằng chất pha loãng mẫu (độ $\text{pH}=7,4$ PBS chứa 1% BSA) được bổ sung với lượng 50 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi kết thúc quá trình ủ, dung dịch phản ứng trong vi đĩa được loại bỏ. Đĩa được rửa 3 lần bằng PBST, và sau đó, kháng thể thử nghiệm được pha loãng với dung dịch pha loãng mẫu đến các nồng độ khác nhau được bổ sung ở 50 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 2 giờ. Sau khi ủ xong, đĩa này được rửa 3 lần bằng PBST và kháng thể thứ cấp kháng chuột kháng chuột được đánh dấu HRP (Jackson Immuno Research, 115-035-003), kháng thể thứ cấp kháng chuột ở dê (Jackson Immuno Research, 109-035-003) hoặc kháng thể thứ cấp liên hợp HRP/kháng M13 của chuột (Sino Biological, Số Cat 11973-MM05-100, được sử dụng để sàng lọc phago) được pha loãng với dung dịch pha loãng mẫu được thêm ở 50 μL /giếng. Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 1 giờ. Đĩa được rửa 3 lần bằng PBST, và sau đó chất nền tạo màu TMB (KPL, 52-00-03) được bổ sung với lượng 50 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ phòng trong 2–5 phút, và phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung H_2SO_4 1M vào 50 μL /giếng. Độ hấp thụ ở bước sóng 450nm được đọc bằng đầu đọc vi đĩa VersaMax và trị số EC_{50} liên kết của kháng thể kháng ANGPTL3 với protein kháng nguyên

ANGPTL3 đã được tính toán. Kết quả thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 3. Kết quả cho thấy rằng các kháng thể kháng ANGPTL3 theo sáng chế có khả năng liên kết với các protein ANGPTL3 của các loài khác nhau.

Bảng 3. Thử nghiệm ELISA về sự liên kết của kháng thể kháng ANGPTL3 với protein ANGPTL3 của các loài khác nhau

Kháng thể	Liên kết với ANGPTL3 EC50 của người (nM)	Liên kết với ANGPTL3 EC50 của chuột nhắt (nM)	Liên kết với ANGPTL3 EC50 của khỉ đuôi dài cynomolgus (nM)	Liên kết với ANGPTL3 EC50 của chuột (nM)
P3G	2,480	1,631	4,555	1,441
P8G	0,361	1,732	2,528	2,115
P8BG	0,172	0,105	0,200	0,528

Ví dụ thử nghiệm 2: Thử nghiệm HTRF để liên kết các kháng thể kháng ANGPTL3 với protein kháng nguyên ANGPTL3

Thử nghiệm HTRF cũng được sử dụng để phát hiện hoạt tính liên kết của kháng thể kháng ANGPTL3 với kháng nguyên. ANGPTL3 với đuôi HIS (ANGPTL3 của người (17-460)-His, chuột ANGPTL3 (17-455)-His, khỉ đuôi dài cynomolgus ANGPTL3 (17-460)-His và chuột ANGPTL3 (17-455)-His) được gắn kit đánh dấu biotin (Dojindo China, LK03) liên kết với hóa chất HTRF Streptavidin-Tb cryptata (Cisbio, 610SATLA), và sau khi bổ sung kháng thể, kháng thể liên kết với hóa chất HTRF Pab kháng chuột IgG-XL665 (Cisbio, 61PAMXLA) và protein giống angiopoietin 3. Cường độ của tín hiệu được sử dụng để xác định hoạt tính liên kết của kháng thể với protein giống angiopoietin 3.

4 μ g/mL biotin được đánh dấu ANGPTL3 ở người (17-460)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:1), chuột ANGPTL3 (17-455)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:5), khỉ đuôi dài cynomolgus ANGPTL3 (17-460)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:7) và chuột ANGPTL3 (17-455)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:8) từng được chuẩn bị bằng cách sử dụng chất pha loãng (độ pH=7,4 PBS chứa 1% BSA) và bổ sung vào đĩa 384 giếng (PerkinElmer, optiplat-384) ở 5 μ L/giếng, dung dịch hỗn hợp của hóa chất HTRF Streptavidin-Tb cryptata và Pab kháng chuột IgG-XL665 sau đó được bổ sung ở 5 μ L/giếng, và cuối cùng, kháng thể thử nghiệm đã được pha loãng bằng dung dịch pha loãng mẫu đến các nồng độ khác

nhau được bổ sung với lượng 10 μL /giếng. Hỗn hợp này được ủ ở 25°C trong 1 giờ. Các trị số được đọc bằng PHERAstar FS (BMG LabTECH) tại mô-đun HTRF và trị số EC_{50} để liên kết kháng thể kháng ANGPTL3 với protein 3 tương tự angiopoietin. Kết quả thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 4. Kết quả cho thấy rằng các kháng thể theo sáng chế đều có hoạt tính liên kết tốt đối với kháng nguyên ANGPTL3 của người, chuột, khỉ đuôi dài cynomolgus, chuột cống và các loài khác.

Bảng 4. Thử nghiệm HTRF để gắn kháng thể kháng ANGPTL3 với protein ANGPTL3

Kháng thể	EC_{50} (nM) để liên kết với các protein ANGPTL3			
	ANGPTL3 của người	ANGPTL3 của chuột	ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus	ANGPTL3 của chuột
P3G	0,929	0,638	0,502	0,597
P8G	0,784	0,450	0,303	0,484
P8BG	0,277	0,321	0,360	0,362

Ví dụ thử nghiệm 3: Thử nghiệm hoạt tính chẹn sự ức chế LPL bởi kháng thể kháng ANGPTL3

Thử nghiệm phát hiện hoạt tính enzym của LPL được sử dụng để phát hiện hoạt động của kháng thể kháng ANGPTL3 trong việc chẹn sự ức chế enzym LPL bởi protein ANGPTL3.

LPL của bò (Sigma, L2254-5KU) được pha loãng với dung dịch đệm pha loãng (độ pH=7,4 PBS + 2mg/mL BSA) đến 12,5 đơn vị và bổ sung vào đĩa 96 giếng (Corning, 3603) với lượng 25 μL /giếng, sau đó kháng thể thử nghiệm đã được pha loãng bằng dung dịch pha loãng mẫu đến các nồng độ khác nhau được bổ sung với lượng 25 μL /giếng, và sau đó 27,6 $\mu\text{g/mL}$ protein ANGPTL3 (ANGPTL3 của người (17-170) -Flag-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 2), chuột ANGPTL3 (17-455)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:5), khỉ đuôi dài cynomolgus ANGPTL3 (17-460)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:7) và chuột ANGPTL3 (17-455) -Hi (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:8)) đã được bổ sung với lượng 25 μL /giếng. Đĩa 96 giếng được lắc trên máy lắc để trộn đều hỗn hợp, sau đó được ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 30 phút. Cuối cùng, chất nền 20 μM (Sigma, 30058-10MG-F) được pha loãng với dung dịch đệm pha loãng được bổ sung với lượng 25 μL /giếng, và đĩa 96 giếng được lắc trên máy lắc để trộn đều hỗn hợp, sau đó được ủ

trong tủ ẩm ở 37°C trong 30 phút. Ex535/Em612 được đọc bằng đầu đọc vi đĩa Flexstation3. Nồng độ và dữ liệu huỳnh quang tương ứng được xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 5 và đã tính toán IC₅₀. Kết quả thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 5. Kết quả này cho thấy rằng các kháng thể theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế chọn tốt đối với enzym LPL.

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm về hoạt tính của kháng thể kháng ANGPTL3 trong việc chọn sự ức chế LPL bởi ANGPTL3 của các loài khác nhau

Kháng thể	IC ₅₀ (nM)			
	ANGPTL3 của người	ANGPTL3 của chuột	ANGPTL3 của khỉ Cyno	ANGPTL3 của chuột
P3G	68,9	167,5	42,4	66,5
P8BG	75,3	41,5	53,6	132,2

Ví dụ thử nghiệm 4: Thử nghiệm Biacore về các kháng thể kháng ANGPTL3 và protein ANGPTL3

Biacore được sử dụng để xác định ái lực của thử nghiệm kháng thể kháng ANGPTL3 đối với ANGPTL3 của người, khỉ, chuột nhắt và chuột, và phương pháp này bao gồm các bước như sau:

Một lượng kháng thể thử nghiệm nhất định được bắt giữ ái lực bởi chip cảm biến sinh học Protein A (Cat. # 29127556, GE), và sau đó là kháng nguyên ANGPTL3 của người, khỉ, chuột nhắt và chuột (ANGPTL3 của người (R&D, 3829-AN), chuột ANGPTL3 (17-455)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:5), khỉ đuôi dài cynomolgus ANGPTL3 (17-460)-His (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:7) và chuột ANGPTL3 (17-455) - Chất này (có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:8)) ở một nồng độ nhất định, mỗi dòng chảy qua bề mặt của chip. Các tín hiệu phản ứng được phát hiện trong thời gian thực bằng thiết bị Biacore T200 để thu được các đường cong liên kết và phân ly. Sau khi hoàn thành mỗi chu kỳ phân ly, chip sinh học được rửa sạch và tái sinh bằng dung dịch tái sinh axit glyxin-hydrocloric (Cat. # BR-1003-54, GE, độ pH=1,5). Bộ đệm đang chạy cho thử nghiệm là bộ đệm 1 × HBS-EP (Cat. # BR-1001-88, GE). Dữ liệu thu được từ thử nghiệm được gắn với mô hình Langmuir (1:1) sử dụng phần mềm đánh giá GE Biacore T200 (phiên bản 3,0) để thu được các trị số ái lực. Kết quả thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 6. Kết quả

cho thấy rằng các kháng thể kháng ANGPTL3 theo sáng chế có khả năng liên kết với các kháng nguyên ANGPTL3 của người, khỉ đuôi dài cynomolgus, chuột nhắt và chuột với ái lực cao.

Bảng 6. Kết quả thử nghiệm Biacore về kháng thể kháng ANGPTL3 và protein ANGPTL3

Kháng thể	Kháng nguyên	Hằng số liên kết (1/mili giây)	Hằng số không liên kết (1/giây)	Ái lực (M)
P3G	ANGPTL3 của người	2,56E+06	7,31E-04	2,85E-10
	ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus	4,15E+06	8,47E-04	2,04E-10
	ANGPTL3 của chuột	9,81E+05	8,27E-04	8,43E-10
	ANGPTL3 của chuột	1,28E+06	8,20E-04	6,39E-10
P8G	ANGPTL3 của người	2,20E+06	3,33E-04	1,51E-10
	ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus	8,37E+06	4,97E-04	5,93E-11
	ANGPTL3 của chuột	9,70E+05	3,45E-04	3,55E-10
	ANGPTL3 của chuột	1,34E+06	3,35E-04	2,50E-10
P8BG	ANGPTL3 của người	6,14E+06	2,76E-04	4,50E-11
	ANGPTL3 của khỉ đuôi dài cynomolgus	5,18E+06	3,98E-04	7,69E-11
	ANGPTL3 của chuột	1,46E+06	4,20E-04	2,88E-10
	ANGPTL3 của chuột	1,21E+06	3,11E-04	2,57E-10

Ví dụ thử nghiệm 5: Đánh giá tính hiệu quả của kháng thể kháng ANGPTL3 ở chuột

1. Thử nghiệm giảm lipit *in vivo* của kháng thể P8BG trên chuột cống

Chuột SD dùng cho thử nghiệm (4 tuần tuổi, SPF, khoảng 100 g, giống đực, được mua từ Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd.; chứng nhận số: 20170005013017, SCXK (Thượng Hải) 2017-0005) đã trải qua 1 tuần thích nghi cho ăn trong môi trường phòng thử nghiệm (trong chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ $23 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ ẩm 40–50%), và chuột được cho ăn thức ăn vô trùng tiêu chuẩn của chuột và được tiếp cận tự do 7 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm, các con chuột được nhin ăn trong 4 giờ, sau đó máu được thu thập từ ổ mắt và ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 15 phút, và thu lấy huyết thanh. Nồng độ lipit trong huyết thanh (triglycerit) được xác định bằng hệ thống hóa chất ADVIA 2400 (Siemens). Các con chuột được chia thành 6 nhóm theo mức chất béo trung tính (protein IgG các lớp kháng thể của người không liên quan (hIgG, tương tự dưới đây) với nhóm đối chứng âm, nhóm evinacumab 3,5

mpk (để biết cấu trúc trình tự, xem trình tự của evinacumab trong WHO Drug Information, Tập 29, Số 3, 2015), nhóm evinacumab 7 mpk, nhóm P8BG 3,5 mpk, nhóm P8BG 1,75 mpk và nhóm P8BG 7 mpk), 6 con chuột/nhóm. Các con chuột trong tất cả các nhóm được tiêm dưới da một lần, sau đó được lấy máu sau 4 giờ nhịn ăn vào các ngày 1, 5, 9, 13 và 16 sau khi tiêm. Huyết thanh được tách ra, và nồng độ lipit trong huyết thanh (triglycerit) được xác định bằng hệ thống hóa học ADVIA 2400 (Siemens). Dữ liệu thực nghiệm được thể hiện dưới dạng Trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Trung bình $\pm$ SEM) và được vẽ bằng phần mềm Graphpad Prism5, và TTEST được sử dụng để phân tích thống kê.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên FIG.1 và Bảng 7. So với nhóm đối chứng âm, 1 ngày sau khi dùng thuốc, triglycerit ở mỗi nhóm điều trị đều giảm, và quan sát thấy sự khác biệt thống kê ở các nhóm ngoại trừ nhóm evinacumab 3,5 mpk. Trong quá trình thử nghiệm, chất béo trung tính ở nhóm P8BG 7 mpk giảm tối đa 83,7%, chất béo trung tính ở nhóm P8BG 3,5 mpk giảm tối đa 81,8% và chất béo trung tính ở nhóm P8BG 1,75 mpk giảm tối đa 68,7%; 5 ngày sau khi dùng thuốc, sự giảm triglycerit ở nhóm P8BG 3,5 mpk, nhóm P8BG 1,75 mpk và nhóm P8BG 7 mpk vẫn có sự khác biệt thống kê, trong khi đó ở nhóm evinacumab 3,5 mpk và nhóm evinacumab 7 mpk không có khác biệt về mặt thống kê; 9 ngày sau khi dùng thuốc, sự giảm triglycerit ở nhóm P8BG 7 mpk và nhóm P8BG 3,5 mpk vẫn có sự khác biệt thống kê. Điều này cho thấy P8BG có tác dụng hạ triglycerit kéo dài và hiệu quả hơn evinacumab ở cùng liều. Ngoài ra, các con chuột trong mỗi nhóm đều có cân nặng bình thường trong quá trình thử nghiệm.

Bảng 7. Ảnh hưởng của kháng thể P8BG lên triglycerit trong huyết thanh của chuột

Kháng thể	Evinacumab		P8BG		
Liều dùng để tiêm dưới da	7mpk	3,5mpk	7mpk	3,5mpk	1,75mpk
TG ban đầu (mg/dL)	121,5 $\pm$ 17,0	122,2 $\pm$ 17,1	120,1 $\pm$ 14,3	122,6 $\pm$ 15,6	120,9 $\pm$ 16,1
Lượng TG tối thiểu	131,1 $\pm$ 12,5	109,7 $\pm$ 16,7	27,6 $\pm$ 3,1	34,2 $\pm$ 4,7	72,6 $\pm$ 10,9
% Giảm tối đa	40,7%	13,1%	83,7%	81,8%	68,7%

Lưu ý: % Inh tối đa là phần trăm hạ lipit máu tối đa so với TG của nhóm đối chứng âm, và mpk là mg/kg.

2. Thử nghiệm hạ lipit *in vivo* của kháng thể P3G trên chuột cống

Chuột SD cho thử nghiệm (4 tuần tuổi, SPF, giống đực, được mua từ Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd., số đăng ký: 20170005013017, SCXK (Shanghai) 2017-0005 được trải qua 1 tuần thích nghi với môi trường thử nghiệm (trong chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ $23 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ ẩm 40–50%), và chuột được cung cấp thức ăn chuột vô trùng tiêu chuẩn và được tiếp cận thoải mái với thức ăn và nước uống. 7 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm, các con chuột được nhện ăn trong 4 giờ, sau đó máu được thu thập từ ổ mắt và ly tâm ở tốc độ 3500 vòng/phút trong 15 phút, và thu lấy huyết thanh. Nồng độ lipit trong huyết thanh (triglycerit) được xác định bằng hệ thống hóa chất ADVIA 2400 (Siemens). Các con chuột được chia thành 4 nhóm theo hàm lượng triglycerit (nhóm đối chứng âm hIgG, nhóm evinacumab 3,5 mpk, nhóm P3G 3,5 mpk và nhóm P3G 7 mpk), 6 con chuột/nhóm. Các con chuột trong tất cả các nhóm được tiêm dưới da một lần, sau đó được lấy máu sau 4 giờ nhện ăn vào các ngày 1, 5 và 9, 13 sau khi tiêm. Huyết thanh được tách ra, và nồng độ lipit trong huyết thanh (triglycerit) được xác định bằng hệ thống hóa học ADVIA 2400 (Siemens). Dữ liệu thực nghiệm được thể hiện dưới dạng Trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Trung bình $\pm$ SEM) và được vẽ bằng phần mềm Graphpad Prism5, và TTEST được sử dụng để phân tích thống kê.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trên FIG.2. So với nhóm đối chứng âm với hIgG, 1 ngày sau khi dùng thuốc, triglycerit của mỗi nhóm điều trị đều giảm, và mức độ giảm của nhóm P3G 3,5mpk và nhóm P3G 7 mpk lớn hơn so với nhóm evinacumab 3,5 mpk nhóm; 9 ngày sau khi sử dụng, nồng độ lipit trong huyết thanh của nhóm P3G 3,5 mpk và nhóm P3G 7 mpk vẫn thấp hơn so với nhóm đối chứng dương.

Ví dụ thử nghiệm 6: Xác định tác dụng của các kháng thể kháng ANGPTL3 đối với nồng độ lipit trong huyết thanh *in vivo* ở chuột Fed c57bl/6 có hàm lượng cholesterol cao, chất béo cao

Chuột c57bl/6 (4 tuần tuổi, SPF, khoảng 16–18 g, giống đực, được mua từ Shanghai Cavens Laboratory Animal Co., Ltd.; chứng nhận số: 201913812, SCXK

(Jiangsu) 2016-0010) đã trải qua 4 tuần cho ăn thích nghi (5 con chuột/lồng) trong môi trường phòng thử nghiệm (trong chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ $23 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ ẩm 40–50%), và các con chuột được cho ăn với thức ăn bình thường và được thoải mái tiếp cận với thức ăn và nước uống. 5 ngày sau khi lấy máu trước, thức ăn thông thường được thay đổi thành thức ăn giàu chất béo có hàm lượng cholesterol cao (D12079B, được mua từ Jiangsu Xietong Pharmaceutical Bio-engineering Co., Ltd.) để cho chuột ăn cho đến khi kết thúc thử nghiệm. 8 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm, các con chuột được nhịn ăn trong 4 giờ, sau đó máu được thu thập từ ổ mắt và ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 2 phút, và thu lấy huyết thanh. Nồng độ lipit trong huyết thanh được xác định bằng hệ thống hóa chất ADVIA 2400 (Siemens). Các con chuột được chia thành 4 nhóm theo mức độ chất béo trung tính (nhóm đối chứng âm hIgG, nhóm evinacumab 25 mpk, nhóm P8BG 25 mpk và nhóm P8BG 5 mpk), 11 con chuột cho mỗi nhóm và các con chuột được tiêm dưới da mỗi tuần một lần, tổng cộng 8 lần. Vào các tuần thứ 2, 3, 5, 7, 9, 10 và 11 sau khi bắt đầu thử nghiệm, các con chuột trong mỗi nhóm được nhịn ăn trong 4 giờ, sau đó máu được lấy từ ổ mắt và thu lấy huyết thanh. Nồng độ lipit trong huyết thanh (triglycerit (TG), cholesterol toàn phần (TC) và cholesterol LDL (LDL-C)) được xác định bằng hệ thống hóa chất ADVIA 2400 (Siemens). Dữ liệu thực nghiệm được thể hiện dưới dạng Trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Trung bình $\pm$ SEM) và được vẽ bằng phần mềm Graphpad Prism5, và TTEST được sử dụng để phân tích thống kê. Kết quả được thể hiện trong Bảng 8–10 và các Hình. 3–5. So với nhóm đối chứng âm hIgG, TG, TC và LDL-C đã giảm đáng kể ở nhóm P8BG 25 mpk 2, 3, 5 và 7 tuần sau khi bắt đầu thử nghiệm; nhóm evinacumab 25 mpk và nhóm P8BG 5 mpk cho thấy sự giảm TG, TC và LDL-C 3, 5 và 7 tuần sau khi bắt đầu thử nghiệm. 9 tuần sau khi bắt đầu thử nghiệm, chỉ có hai nhóm, nhóm P8BG 25 mpk và nhóm P8BG 5 mpk, cho thấy chất béo trung tính giảm đáng kể so với nhóm đối chứng âm hIgG. So với nhóm evinacumab 25 mpk, nhóm P8BG 25 mpk cho thấy chất béo trung tính và cholesterol toàn phần giảm đáng kể vào tuần thứ 2, 3 và 9 của thử nghiệm; so với nhóm 25 mpkg evinacumab, nhóm P8BG 25 mpk cho thấy LDL-C giảm đáng kể vào tuần thứ 2 và 9 của thử nghiệm. Trong toàn bộ chu kỳ thử nghiệm từ tuần 1 đến tuần 11, TG của nhóm evinacumab 25 mpk đã giảm xuống thấp nhất là $40,5 \pm 2,3$, giảm 32,60% so với TG ban đầu; và TG của nhóm P8BG 25 mpk đã giảm

xuống thấp nhất là $21,1 \pm 1,3$, giảm 64,90% so với TG ban đầu. Điều này cho thấy tác dụng hạ lipid của kháng thể P8BG hiệu quả hơn và kéo dài hơn so với evinacumab.

Bảng 8. Tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với TG trong huyết thanh ở chuột c57bl/6

Kháng thể	Evinacumab	P8BG		hIgG
Liều dùng để tiêm dưới da hàng tuần	25mpk	25mpk	5mpk	25mpk
TG ban đầu (mg/dL)	60,1 $\pm$ 3,2	60,1 $\pm$ 4,1	60,1 $\pm$ 3,8	60,0 $\pm$ 6,2
Lượng TG tối thiểu	40,5 $\pm$ 2,3	21,1 $\pm$ 1,3	35,5 $\pm$ 1,7	45,1 $\pm$ 7,1
% Inh tối đa	32,6%	64,9%	40,9%	24,8%

Lưu ý: % Inh tối đa được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm lipid hạ thấp tối đa so với TG ban đầu

Bảng 9. Tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với huyết thanh LDL ở chuột c57bl/6

Kháng thể	Evinacumab	P8BG	
Liều dùng để tiêm dưới da hàng tuần	25mpk	25mpk	5mpk
% Inh tối đa	28,10%	52,10%	42,80%

Lưu ý: % Inh tối đa được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm tối đa của lipid hạ thấp tương đối so với LDL của nhóm đối chứng âm

Bảng 10. Tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 đối với huyết thanh TC ở chuột c57bl/6

Kháng thể	Evinacumab	P8BG	
Liều dùng để tiêm dưới da hàng tuần	25mpk	25mpk	5mpk
% Inh tối đa	27,50%	47,90%	36,20%

Lưu ý: % Inh tối đa được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm tối đa của lipid hạ thấp tương đối so với TC của nhóm đối chứng âm

Ví dụ thử nghiệm 7: Xác định tác dụng của các kháng thể kháng ANGPTL3 *in vivo* đối với nồng độ lipid trong huyết thanh ở chuột APOE

Chuột APOE (8 tuần tuổi, SPF, khoảng 22 g, giống đực, được mua từ Shanghai Cavens Laboratory Animal Co., Ltd.; số chứng nhận: 201917260, SCXK (Jiangsu) 2016-0010) đã trải qua 4 tuần cho ăn thích nghi (2 con chuột/lồng) trong môi trường

phòng thử nghiệm (trong chu kỳ sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ $23 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ ẩm 40–50%), và các con chuột được cho ăn nhiều chất béo. Thức ăn chăn nuôi (D12108C) và được thoải mái tiếp cận thức ăn và nước uống. 7 ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm, các con chuột được nhện ăn trong 4 giờ, sau đó máu được lấy từ ổ mắt và quay ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 2 phút, và thu lấy huyết thanh. Nồng độ lipit trong huyết thanh được xác định bằng hệ thống hóa chất ADVIA 2400 (Siemens). Chuột được chia thành 5 nhóm theo mức chất béo trung tính (nhóm đối chứng âm tính hIgG, nhóm evinacumab 10 mpk, nhóm evinacumab 5 mpk, nhóm P8BG 10 mpk và nhóm P8BG 5 mpk), 8 con chuột/nhóm. Các con chuột trong tất cả các nhóm được tiêm dưới da một lần (xem Bảng 11 về liều lượng sử dụng cho mỗi nhóm), và sau đó được lấy máu từ ổ mắt sau 4 giờ nhện ăn vào các ngày 1, 7 và 11 sau khi tiêm. Huyết thanh được thu thập và xác định nồng độ lipit (triglycerit và HDL cholesterol) bằng hệ thống hóa chất ADVIA 2400 (Siemens). Dữ liệu thực nghiệm được thể hiện dưới dạng Trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (Trung bình $\pm$ SEM) và được vẽ bằng phần mềm Graphpad Prism5, và TTEST được sử dụng để phân tích thống kê.

Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong các hình. 6–7 và Bảng 11. So với nhóm đối chứng âm với hIgG, 1 ngày sau khi dùng thuốc, triglycerit ở mỗi nhóm điều trị đều giảm. Ở nhóm evinacumab (10 mpk), chất béo trung tính đã giảm xuống còn $65,6 \pm 5,4\text{mg/dL}$, giảm 46,2% so với trị số TG ban đầu; trong nhóm evinacumab (5 mpk), triglycerit giảm xuống thấp tới $71,8 \pm 3,3\text{mg/dL}$, giảm 42,1% so với trị số TG ban đầu; ở nhóm P8BG (10 mpk), chất béo trung tính giảm xuống mức thấp nhất là $33,3 \pm 2,2\text{mg/dL}$, giảm 72,9% so với trị số TG ban đầu; ở nhóm P8BG (5 mpk), chất béo trung tính giảm xuống còn $37,0 \pm 1,7\text{mg/dL}$, giảm 70,2% so với trị số TG ban đầu. Ngoài ra, kết quả thực nghiệm cho thấy 1 ngày sau khi sử dụng, HDL-C huyết thanh của nhóm P8BG 10 mpk được tăng lên và HDL-C huyết thanh của nhóm evinacumab 10 mpk bị giảm. Tuy nhiên, trong thử nghiệm hạ lipit máu, việc giảm HDL-C thường không được mong muốn trong quá trình hạ lipit.

Bảng 11. Tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 lên triglycerit trong huyết thanh ở chuột APOE

Kháng thể	Evinacumab		P8BG		hIgG
Liều dùng để tiêm dưới da	10mpk	5mpk	10mpk	5mpk	10mpk
TG ban đầu (mg/dL)	122,0±8,8	123,9±17,1	122,8±10,7	124,0±20,8	120,5±14,9
Lượng TG tối thiểu	65,6±5,4	71,8±3,3	33,3±2,2	37,0±1,7	146,7±21,6
% Inh tối đa	46,20%	42,10%	72,90%	70,20%	-21,70%

Lưu ý: % Inh tối đa được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm lipid hạ thấp tối đa so với TG ban đầu

Ví dụ thử nghiệm 8: Đánh giá được động học của các kháng thể kháng ANGPTL3

1. Thử nghiệm được động học *in vivo* của kháng thể kháng ANGPTL3 trên chuột

Chuột C57BL/6 (18–24 g, được mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) được cho ăn thích nghi (không dưới 3 ngày) trong môi trường phòng thử nghiệm (trong chu kỳ ánh sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ 16–26°C và độ ẩm 40–70%), và chúng được thoải mái tiếp cận với thức ăn và nước uống trong quá trình cho ăn. Một ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm, các con chuột C57BL/6 được đánh số và nhóm ngẫu nhiên với 3 con chuột cho mỗi con. Vào ngày thử nghiệm, chuột trong các nhóm được tiêm vào tĩnh mạch các loại hóa chất thử nghiệm P8BG và evinacumab, tương ứng với liều lượng là 10mg/kg và thể tích tiêm là 5 mL/kg.

Các con chuột trong các nhóm sử dụng được lấy 0,1 mL máu toàn phần trước khi sử dụng và 5 phút, 8 giờ, 1 ngày, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi sử dụng, và máu được đặt ở 4°C trong 30 phút mà không có chất chống đông và sau đó ly tâm ở 1000 g trong 15 phút. Dịch nổi (huyết thanh) được thu thập, đặt trong ống EP và bảo quản ở -80°C.

Nồng độ kháng thể trong huyết thanh được xác định bằng phương pháp ELISA, và các thông số được động học được tính toán cho hóa chất thử nghiệm bằng phần mềm Winnolin. Các kết quả chính về được động học thu được được thể hiện trong Bảng 12 và FIG.8. Kết quả thử nghiệm cho thấy kháng thể P8BG theo sáng chế có thời gian bán hủy ở chuột cao hơn so với evinacumab đối chứng dương.

Bảng 12. Được động học của kháng thể kháng ANGPTL3 trên chuột

Kháng thể	P8BG	Evinacumab
Đường dùng	i.v.	i.v.
Liều dùng (mg/kg)	10	10
t _{1/2} giờ	131,4±18,8	71,1±6,1
t _{1/2} ngày	5,47±0,78	2,96±0,25
AUC _{0-∞} (giờ *ug/ml)	23272±2887	16904±4481

Lưu ý: AUC_{0-∞}: diện tích dưới đường cong thời gian-nồng độ thuốc trong huyết thanh; t_{1/2} (giờ) thời gian bán hủy (tính bằng giờ); t_{1/2} (ngày): thời gian bán hủy (tính bằng ngày); i.v: tiêm tĩnh mạch

2. Đánh giá dược động học của kháng thể kháng ANGPTL3 ở khỉ đuôi dài cynomolgus

Đã sử dụng khỉ đuôi dài cynomolgus (3–4 kg, được mua từ Guangdong Qianyan Biological Science and Technology Co., Ltd.), và các con khỉ này được kiểm dịch và cho ăn thích nghi sau 14 ngày trước khi được sử dụng trong thử nghiệm. Chúng được nhốt trong lồng thép không gỉ với số lượng không quá 2 con mỗi lồng. Nhiệt độ phòng nuôi được kiểm soát ở mức 18–26°C, độ ẩm tương đối nằm trong khoảng 40–70% và độ chiếu sáng theo chu kỳ sáng/tối 12/12. Các con khỉ này được thoải mái tiếp cận với nước trong quá trình thử nghiệm. 6 con khỉ đuôi dài cynomolgus được phân ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi nhóm 3 con theo tiêu chí sinh hóa. Khỉ đuôi dài cynomolgus trong các nhóm được tiêm các loại hóa chất thử nghiệm P8BG và evinacumab tương ứng qua đường dưới da, liều lượng tiêm là 10mg/kg và thể tích tiêm là 2 mL/kg.

Sau khi phân nhóm, các con khỉ này được nhịn ăn qua đêm, và mỗi con được lấy khoảng 2 mL máu từ tĩnh mạch của chi dưới trước khi sử dụng và 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 1 ngày, 3 d, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày, 28 ngày, 35 ngày, 42 ngày, 49 ngày và 56 ngày sau khi sử dụng. Máu được cho vào ống lấy máu chứa gel tách, để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và sau đó ly tâm ở 1000 g trong 15 phút. Dịch nổi được thu thập, cho vào 2 ống EP sạch và được bảo quản tạm thời ở -70°C (hoàn thành trong vòng 2 giờ sau khi lấy máu). Nồng độ kháng thể trong huyết thanh được xác định bằng phương pháp ELISA, và các thông số dược động học được tính toán cho hóa chất thử nghiệm bằng phần mềm Winnolin. Các kết quả chính về dược động học thu được được thể hiện trong Bảng 14 và FIG.9. Kết quả thử nghiệm cho thấy kháng thể P8BG theo sáng chế có thời gian bán hủy ở khỉ đuôi dài cynomolgus cao hơn so với evinacumab đối chứng dương.

Bảng 13. Dược động học của kháng thể kháng ANGPTL3 trên khỉ đuôi dài cynomolgus

	P8BG	Evinacumab
Liều dùng (mg/kg)	10	10
Đường dùng	sc.	sc.
t _{1/2} giờ	324,7±115,3	157,7±28,6
t _{1/2} ngày	13,5±4,8	6,6±1,2
AUC 0-∞ (ug/ml*giờ)	44243±7404	38027±252

Lưu ý: AUC_{0-∞}: diện tích dưới đường cong thời gian-nồng độ thuốc trong huyết thanh; t_{1/2} (giờ): thời gian bán hủy (tính bằng giờ); t_{1/2} (ngày): thời gian bán hủy (tính bằng ngày); sc: tiêm dưới da.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể, trong đó:

i) vùng biến đổi chuỗi nặng này có HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương đồng với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO:13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương đồng với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO:14;

ii) vùng biến đổi chuỗi nặng này có HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương đồng với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO:11, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương đồng với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO:12; hoặc

iii) vùng biến đổi chuỗi nặng này có HCDR1, HCDR2 và HCDR3 tương đồng với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO:9, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có LCDR1, LCDR2 và LCDR3 tương đồng với trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO:10.

2. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

iv) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:28 và SEQ ID NO:26, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:23;

v) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 và SEQ ID NO:26, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:23; hoặc

vi) vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:20, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có trình tự lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 và SEQ ID NO:17.

3. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó:

(A) vùng biến đổi chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:13 ít nhất là 90%, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:14 ít nhất là 90%;

(B) vùng biến đổi chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:11 ít nhất là 90%, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:12 ít nhất là 90%; hoặc

(C) vùng biến đổi chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:9 ít nhất là 90%, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:10 ít nhất là 90%.

4. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm 3, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện dưới đây:

(D) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:14;

(E) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:11, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:12; hoặc

(F) vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:9, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:10.

5. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 còn bao gồm vùng bảo thủ của chuỗi nặng và vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ.

6. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó vùng bảo thủ của chuỗi nặng này được chọn từ nhóm bao gồm vùng bảo thủ IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 của người, và vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ này được

chọn từ nhóm bao gồm vùng bảo thủ của chuỗi κ và chuỗi λ của người.

7. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó vùng bảo thủ của chuỗi nặng này có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:29 hoặc trình tự có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:29 ít nhất là 85%, và/hoặc vùng bảo thủ của chuỗi nhẹ này có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:30 hoặc trình tự có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:30 ít nhất là 85%.

8. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó,

(G) chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:35 ít nhất là 85%, và/hoặc chuỗi nhẹ này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:36 ít nhất là 85%;

(H) chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:33 ít nhất là 85%, và/hoặc chuỗi nhẹ này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:34 ít nhất là 85%; hoặc

(I) chuỗi nặng này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:31 ít nhất là 85%, và/hoặc chuỗi nhẹ này có mức độ tương đồng về trình tự so với SEQ ID NO:32 ít nhất là 85%.

9. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó,

(J) chuỗi nặng này được thể hiện trong SEQ ID NO:35, và chuỗi nhẹ này được thể hiện trong SEQ ID NO:36;

(K) chuỗi nặng này được thể hiện trong SEQ ID NO:33, và chuỗi nhẹ này được thể hiện trong SEQ ID NO:34; hoặc

(L) chuỗi nặng này được thể hiện trong SEQ ID NO:31, và chuỗi nhẹ này được thể hiện trong SEQ ID NO:32.

10. Phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

11. Tế bào chủ mang phân tử axit nucleic theo điểm 10.

12. Dược phẩm, chứa:

(A) kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, hoặc phân tử axit nucleic theo điểm 10 với lượng điều trị hữu hiệu, và

(B) một hoặc nhiều chất mang dược dụng, chất pha loãng dược dụng, chất đệm dược dụng hoặc tá dược dược dụng.

13. Phương pháp phát hiện miễn dịch hoặc xác định ANGPTL3, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó phương pháp này được sử dụng cho mục đích không phải chẩn đoán bệnh.

14. Kit, bao gồm kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

1/5

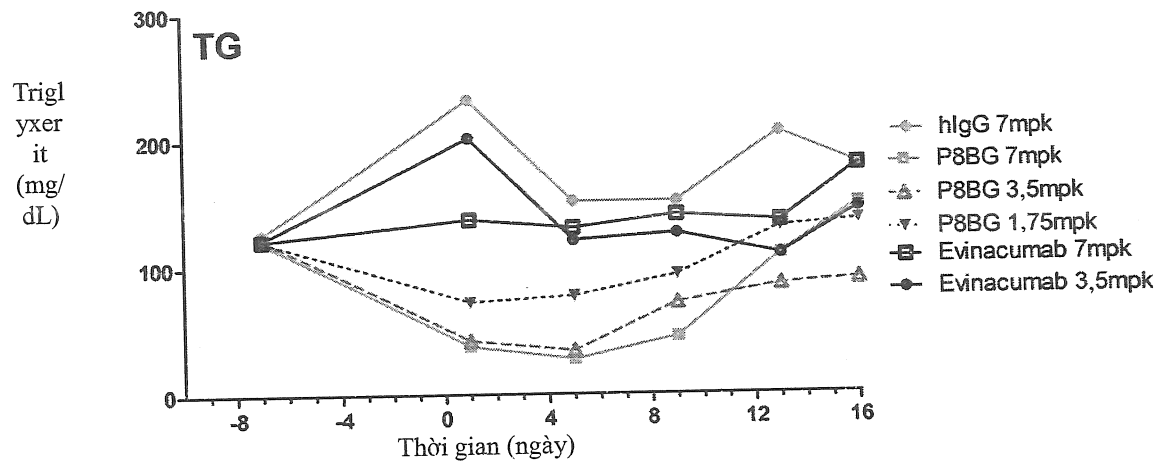


FIG.1

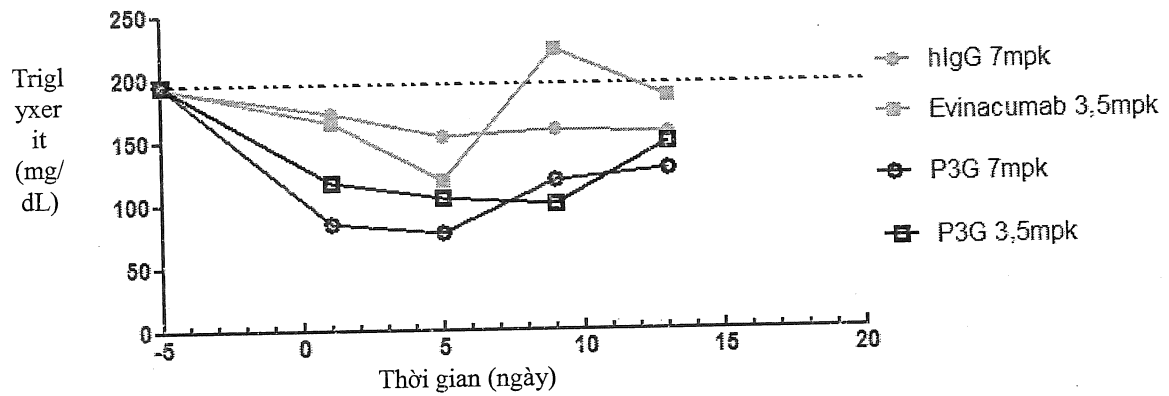


FIG.2

2/5

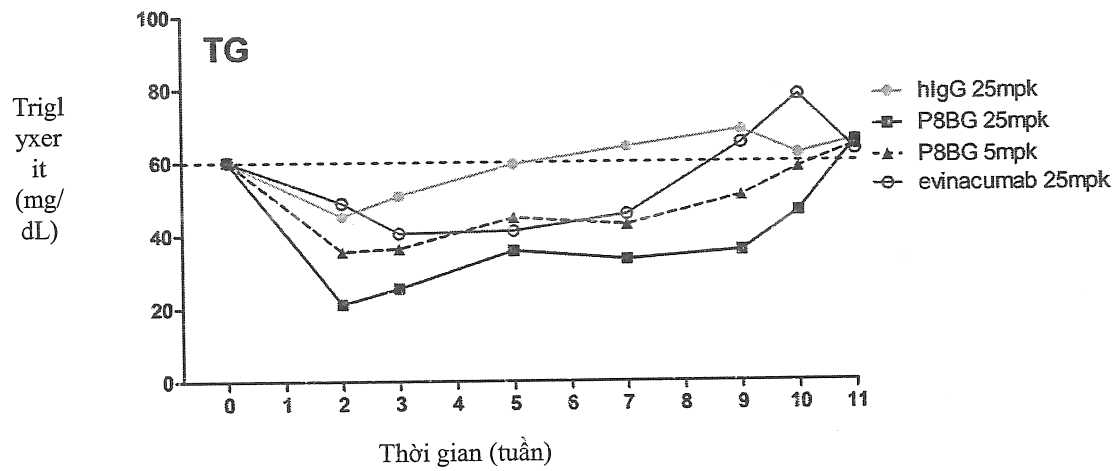


FIG.3

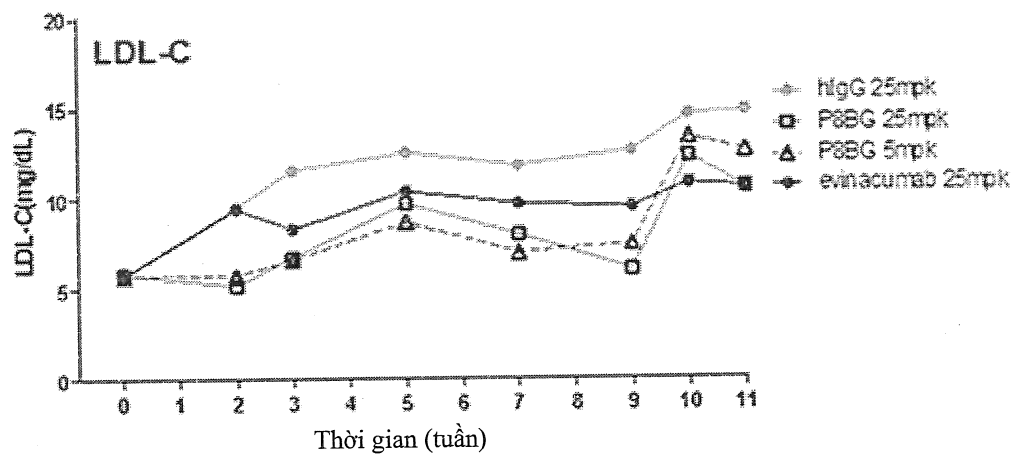


FIG.4

3/5

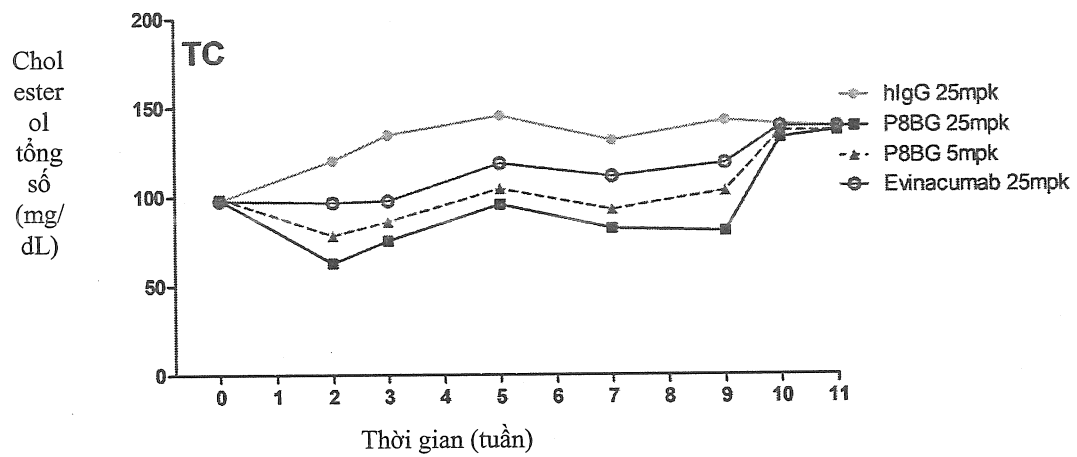


FIG.5

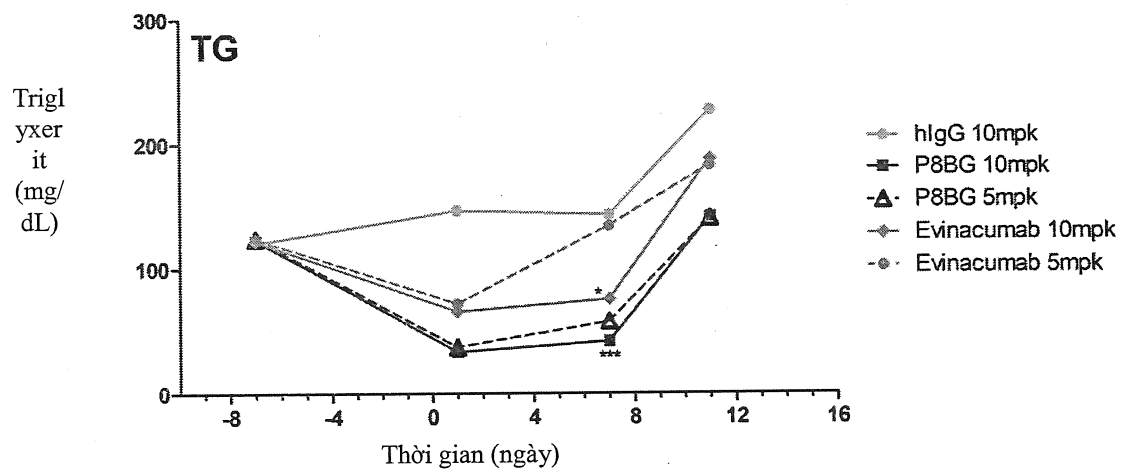


FIG.6

4/5

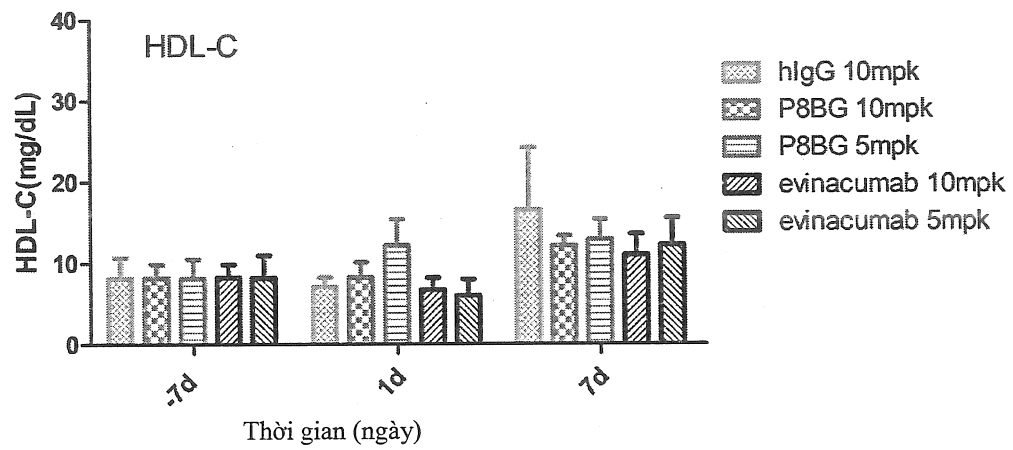


FIG.7

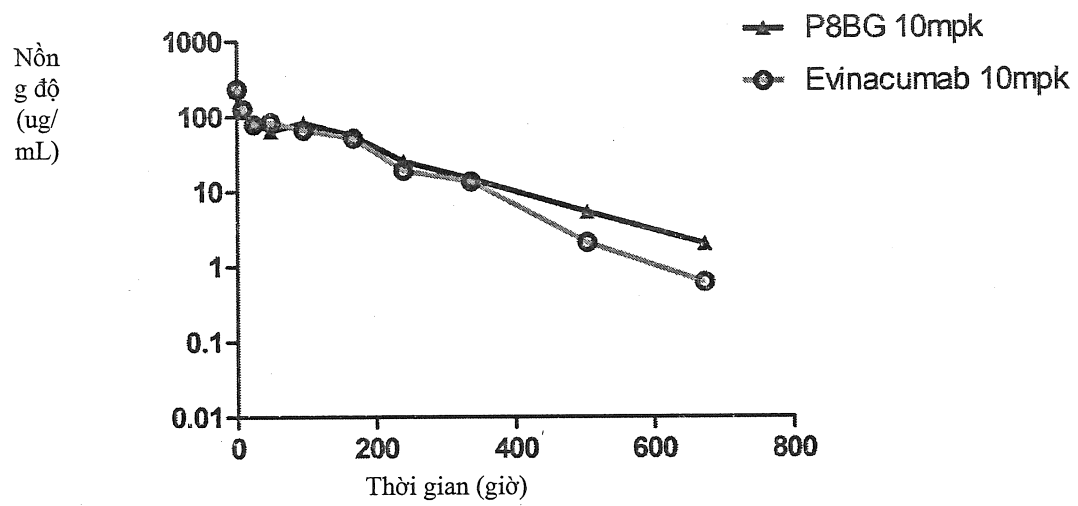


FIG.8

5/5

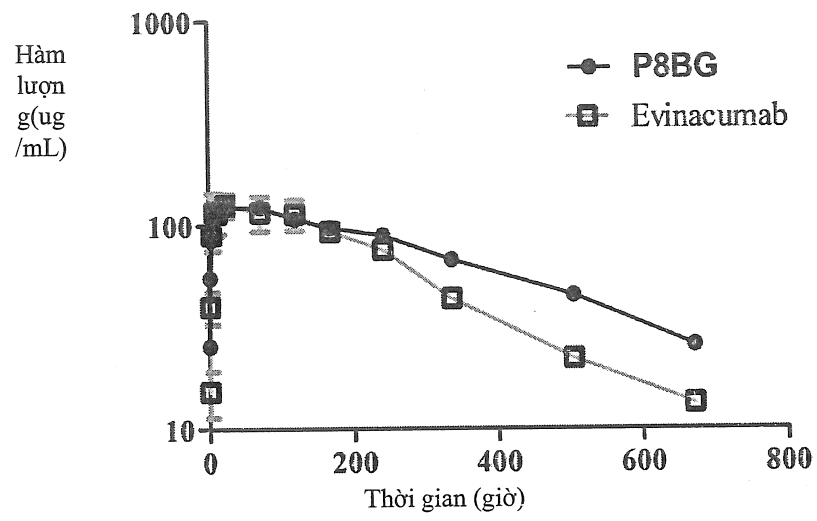


FIG.9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd.
Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG ANGPTL3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 721011CPCT

<150> CN202010073192.4

<151> 2020-01-22

<160> 36

<170> Danh mục trình tự SIPO 1.0

<210> 1

<211> 473

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự ANGPTL3 (17-460)-His của người

<400> 1

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

Ala Pro Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val
 225 230 235 240
 Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly
 245 250 255
 Glu His Thr Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val
 260 265 270
 Phe His Val Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile
 275 280 285
 Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn
 290 295 300
 Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu
 305 310 315 320
 Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile
 325 330 335
 Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe
 340 345 350
 Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile
 355 360 365
 Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe
 370 375 380
 Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly
 385 390 395 400
 Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu
 405 410 415
 Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg
 420 425 430
 Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys
 435 440 445
 Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu His
 450 455 460
 His His His His His His His His His
 465 470

<210> 2

<211> 190

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự ANGPTL3 (17-170)-Flag-His ở người

<400> 2

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

65 70 75 80
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys
 85 90 95
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys
 100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
 130 135 140
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gly Ser Ser
 165 170 175
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His His His His
 180 185 190

<210> 3
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự ANGPTL3(17-170)-mFc ở người

<400> 3
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu
 20 25 30
 Ser Pro Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
 35 40 45
 Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
 50 55 60
 His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys
 85 90 95
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys
 100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
 130 135 140
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Glu Pro Arg
 165 170 175
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 180 185 190
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 195 200 205

Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 210 215 220
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 245 250 255
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 260 265 270
 Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 275 280 285
 Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
 290 295 300
 Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
 305 310 315 320
 Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
 325 330 335
 Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
 340 345 350
 Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 355 360 365
 Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
 370 375 380
 Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
 385 390 395 400
 Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 405

<210> 4
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự ANGPTL3 (17-220)-mFc ở người

<400> 4
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu
 20 25 30
 Ser Pro Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
 35 40 45
 Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
 50 55 60
 His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys
 85 90 95
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys
 100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu

```

      115              120              125
Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
      130              135              140
Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu
      145              150              155              160
His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn
      165              170              175
Ser Ile Lys Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu
      180              185              190
Asn Gln Gln His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg
      195              200              205
Thr Ser Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Glu
      210              215              220
Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
      225              230              235              240
Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
      245              250              255
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
      260              265              270
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
      275              280              285
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
      290              295              300
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
      305              310              315              320
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
      325              330              335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
      340              345              350
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
      355              360              365
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
      370              375              380
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
      385              390              395              400
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
      405              410              415
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
      420              425              430
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
      435              440              445
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
      450              455

```

<210> 5

<211> 468

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự ANGPTL3(17-455)-His ở chuột

<400> 5

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

405 410 415
 Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro Glu Arg Arg
 420 425 430
 Arg Gly Ile Tyr Trp Arg Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr Ala Ile Lys
 435 440 445
 Ser Ser Lys Met Met Leu Gln Pro Thr Thr His His His His His His
 450 455 460
 His His His His
 465

 <210> 6
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự ANGPTL3(17-220)-mFc ở chuột

 <400> 6
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala
 20 25 30
 Pro Ser Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
 35 40 45
 Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
 50 55 60
 His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys
 85 90 95
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys
 100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu
 130 135 140
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn
 165 170 175
 Ser Ile Arg Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu
 180 185 190
 Ser Gln Gln His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys
 195 200 205
 Thr Gly Ile Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Glu
 210 215 220
 Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
 245 250 255

Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 275 280 285
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
 340 345 350
 Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
 370 375 380
 Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 435 440 445
 Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455

<210> 7

<211> 473

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự ANGPTL3(17-460)-His ở khỉ cynomolgus

<400> 7

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

```

      115              120              125
Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
      130              135              140
Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Ala Thr Pro Glu
      145              150              155              160
His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn
      165              170              175
Ser Ile Lys Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu
      180              185              190
Asn Gln Gln His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Met
      195              200              205
Thr Asn Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg
      210              215              220
Ala Pro Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val
      225              230              235              240
Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Asp Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly
      245              250              255
Glu His Ile Ser Gly Thr Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val
      260              265              270
Phe His Val Tyr Cys Asp Val Val Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile
      275              280              285
Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn
      290              295              300
Tyr Lys Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu
      305              310              315              320
Glu Lys Ile Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile
      325              330              335
Glu Leu Glu Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe
      340              345              350
Tyr Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Val Lys Ile
      355              360              365
Thr Gly Asn Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe
      370              375              380
Ser Thr Trp Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Ser Cys Pro Glu Ser
      385              390              395              400
Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu
      405              410              415
Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg
      420              425              430
Arg Gly Leu Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys
      435              440              445
Ser Thr Lys Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu His
      450              455              460
His His His His His His His His His
      465              470

```

<210> 8

<211> 468

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự ANGPTL3(17-455)-His ở chuột

<400> 8

```

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

```

385 390 395 400
 Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Phe Ser Asp Met Cys Gly Glu Asn Asn Leu
 405 410 415
 Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg
 420 425 430
 Arg Gly Ile Ser Trp Arg Pro Arg Gly Gly Lys Leu Tyr Ser Ile Lys
 435 440 445
 Ser Ser Lys Met Met Leu Gln Pro Thr Thr His His His His His His
 450 455 460
 His His His His
 465

<210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của P3

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ile Ala Thr Leu Gly Asn Phe Phe Thr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của P3

<400> 10
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

<210> 11
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của P8

<400> 11
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Arg Asp Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Gly Ser Ile Arg Glu Val Leu Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

 <220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của P8

<400> 12
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

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

<210> 13

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của P8B

<400> 13

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

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của P8B

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự LCDR1 của P3

<400> 15
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
 1 5 10

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự LCDR2 của P3

<400> 16
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự LCDR3 của P3

<400> 17

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Trp Thr

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự HCDR1 của P3

<400> 18

Asp Tyr Tyr Leu His

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự HCDR2 của P3

<400> 19

Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự HCDR3 của P3

<400> 20

Asp Ile Ala Thr Leu Gly Asn Phe Phe Thr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự LCDR1 của P8

<400> 21

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự LCDR2 của P8/P8B

<400> 22

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự LCDR3 của P8/P8B

<400> 23

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự HCDR1 của P8/P8B

<400> 24

Ser Tyr Asp Ile Asn

1 5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự HCDR2 của P8

<400> 25

Leu Ile Asn Pro Arg Asp Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự HCDR3 của P8/P8B

<400> 26

Asp Leu Gly Ser Ile Arg Glu Val Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự LCDR1 của P8B

<400> 27

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Val Tyr Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự HCDR2 của P8B

<400> 28

Leu Ile Asn Pro Arg Glu Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 29

<211> 327

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> VÙNG

<223> Trình tự vùng bảo thủ chuỗi nặng của biến thể IgG4-YTE ở người

<400> 29

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

290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> VÙNG
 <223> Trình tự vùng bảo thủ chuỗi nhẹ của chuỗi kappa ở người

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

<210> 31
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Trình tự chuỗi nặng của P3G

<400> 31
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ile Ala Thr Leu Gly Asn Phe Phe Thr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 130 135 140
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 195 200 205
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 210 215 220
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
 245 250 255
 Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Gly Lys
 450

<210> 32

<211> 213

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<223> Trình tự chuỗi nhẹ của P3G

<400> 32

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

<210> 33

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> CHUỖI

<223> Trình tự chuỗi nặng của P8G

<400> 33

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

Gly Leu Ile Asn Pro Arg Asp Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Gly Ser Ile Arg Glu Val Leu Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 130 135 140
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 195 200 205
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
 210 215 220
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr
 245 250 255
 Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Gly Lys
 450

<210> 34
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Trình tự chuỗi nhẹ của P8G

<400> 34
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 35
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> CHUỖI
 <223> Trình tự chuỗi nặng của P8BG

<400> 35
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

435 440 445
 Leu Gly Lys
 450

 <210> 36
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> CHUỖI
 <223> Trình tự chuỗi nhẹ của P8BG

 <400> 36
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Val Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215