



(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) 
1-0019591

(51)⁷ **C07K 16/28, A61K 39/395**

(13) **B**

(21) 1-2011-03221

(22) 23.04.2010

(86) PCT/EP2010/055458 23.04.2010

(87) WO2010/125003 04.11.2010

(30) 61/173,004 27.04.2009 US

61/306,137 19.02.2010 US

(45) 27.08.2018 365

(43) 25.06.2012 291

(73) NOVARTIS AG (CH)

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Switzerland

(72) BERGER, Catrin (DE), HERRMANN, Tanja (DE), LU, Chris (US), SHEPPARD, Kelly-Ann (US), TRIFILIEFF, Estelle (FR), URLINGER, Stefanie (DE)

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) **KHÁNG THỂ KHÁNG THỤ THỂ ACTIVIN IIB (ACTRIIB), QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng thụ thể Activin IIB (ActRIIB) để điều trị rối loạn về cơ như hao mòn cơ do bệnh tật hoặc trải qua giai đoạn không hoạt động. Sáng chế còn đề cập đến quy trình điều chế và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực kháng thể kháng thụ thể Activin IIB (ActRIIB). Cụ thể là, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể này để điều trị các rối loạn cơ, chẳng hạn như sự hao mòn cơ do mắc bệnh hoặc không hoạt động.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Activin là yếu tố tăng trưởng đime và biệt hóa thuộc siêu họ yếu tố tăng trưởng chuyển đổi beta (transforming growth factor beta—TGF beta) của protein tín hiệu có liên quan về cấu trúc. Activin truyền tín hiệu thông qua phức hợp heterodime của thụ thể serin kinaza bao gồm ít nhất hai thụ thể loại I (I và IB) và hai thụ thể loại II (II và IIB, aka ACVR2A và ACVR2B). Các thụ thể này đều là protein xuyên màng, bao gồm miền ngoại bào gắn kết phối tử có vùng giàu xystein, miền xuyên màng và miền tế bào chất có tính đặc hiệu serin/threonin được dự đoán. Thụ thể loại I cần thiết để truyền tín hiệu trong khi thụ thể loại II lại cần thiết để gắn kết phối tử và để biểu hiện các thụ thể loại I. Thụ thể loại I và II hình thành phức hợp bền sau khi gắn kết phối tử dẫn đến phosphoryl hóa thụ thể loại I bởi thụ thể loại II.

Thụ thể activin II B (ActRIIB) là thụ thể của myostatin. Sự tương tác giữa myostatin và thụ thể này điều hòa sự ức chế biệt hóa cơ xương theo con đường phụ thuộc Smad. Do đó, bằng cách ức chế hoặc ngăn cản myostatin gắn kết với ActRIIB, chúng có thể cảm ứng hình thành cơ xương.

Nhiều nhóm đã nghiên cứu điều này. Bogdanovich *et al* (Nature, 2002, 420:418-421) mô tả rằng kháng thể kháng myostatin có khả năng ngăn chặn myostatin, dẫn đến tăng khối lượng cơ ở chuột mắc bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne. Bradley *et al* (Cell Mol. Life Sci. 2008, 65:2119-2124) xem xét các phương án khác nhau hiện có để điều biến sự tương tác myostatin/ActRIIB, bao gồm kháng thể kháng myostatin đã đề cập ở trên, ức chế giải phóng myostatin thành thực bằng cách dùng tiền peptit myostatin, dùng follistatin để ngăn chặn thụ thể myostatin, dùng chất ức chế Histon deacetylaza (HDAC) để cảm ứng sản xuất follistatin, dùng peptit myostatin biến đổi

để ngăn cản myostatin gắn kết với thụ thể này và dùng thụ thể mới như đích thể cho myostatin.

Mặc dù có các trị liệu tiềm năng này, hiện chưa có sản phẩm điều trị cho bệnh nhân. Thật vậy, gần đây một công ty đã hủy bỏ dự án kháng thể kháng myostatin của họ.

Do đó, cần có phương pháp làm tăng khối lượng cơ và dẻo dai của bệnh nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Kháng thể đã được phát hiện mà hướng tới thụ thể ActRIIB có thể ngăn cản myostatin gắn kết với thụ thể này, do đó ngăn cản sự ức chế biệt hóa cơ theo con đường phụ thuộc Smad. Điều này dẫn đến tăng khối lượng và độ bền cơ ở bệnh nhân.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ActRIIB, hoặc mảnh chức năng của nó hoặc protein chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng ActRIIB. Theo một phương án, ActRIIB là ActRIIB của người. Trình tự polypeptit của ActRIIB của người được nêu trong SEQ ID NO: 181 (AAC64515.1, GI:3769443). Theo một phương án, kháng thể hoặc protein chức năng từ động vật có vú, mà có nguồn gốc chẳng hạn như người hoặc lạc đà. Do đó, kháng thể có thể là kháng thể dạng khảm, của người hoặc kháng thể được làm giống như của người. Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng ActRIIB được đặc trưng vì có vùng gắn kết kháng nguyên đặc hiệu với protein đích ActRIIB và gắn kết với ActRIIB hoặc mảnh của ActRIIB. Theo một phương án, kháng thể đã nêu thích hợp để sử dụng trong trị liệu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện sự xác định EC50 MOR07079 bằng chuẩn độ FACS ở dòng tế bào HEK293T/17 gốc và dòng tế bào nhiễm ActRIIB.

Fig. 2 thể hiện sự ức chế biểu hiện luxiferaza được cảm ứng bởi myostatin trong thử nghiệm gen thông báo bằng Fab hoàn chỉnh kháng ActRIIB ở nồng độ 2, 10 và 50µg/ml.

Fig. 3 thể hiện sự xác định IC₅₀ của Fab [MOR08067, MOR08144, MOR08156 và MOR08159 trong Fig. 3A; và MOR08067, MOR08213 trong Fig. 3B] trong thử nghiệm gen thông báo luxiferaza được cảm ứng bởi myostatin.

Fig. 4 thể hiện kháng thể gắn kết với tế bào cơ xương người sơ cấp.

Fig. 5 thể hiện sự xác định IC₅₀ của IgG [MOR08159 trong Fig. 5A; và MOR08213 trong Fig. 5B] trong thử nghiệm ức chế tạo biệt hóa cơ xương cảm ứng bởi myostatin.

Fig. 6 thể hiện thử nghiệm trên chuột: nghiên cứu hiệu quả *in vivo* ở động vật nguyên bản điều trị 6 tuần bằng MOR08159 hoặc MOR08213 với 10mg/kg làm tăng trọng lượng cơ thể và cơ. Sự thay đổi được thể hiện ở (A) trọng lượng cơ thể, (B) Cơ chày, (C) cơ sinh đôi căng chân với bàn chân, (D) Cơ tứ đầu và (E) cơ ngực.

Fig. 7 thể hiện thử nghiệm trên chuột: nghiên cứu hiệu quả đáp ứng liều *in vivo* ở động vật nguyên bản— điều trị 6 tuần bằng MOR08213 ở 25, 5, 1mg/kg, tăng trọng lượng cơ và trọng lượng cơ thể phụ thuộc liều lượng. Các thay đổi được thể hiện trong (A) trọng lượng cơ thể, (B) Cơ chày, (C) Cơ sinh đôi căng chân với bàn chân, (D) Cơ tứ đầu và (E) cơ ngực.

Fig. 8 thể hiện kết quả FACS chứng minh sự phong bế chéo giữa MOR08159 với sự có mặt của MOR08213 (nét đứt thưa) và chỉ MOR08159 (nét liền đen đậm), so với chỉ có isotyp đối chứng (nét liền đen) hoặc isotyp đối chứng với sự có mặt của MOR08213 (nét đứt thưa).

Fig. 9 thể hiện tổng quan về gốc ActRIIB (SEQ ID NO:181) để nhờ đó MOR08159 gắn kết, sử dụng kỹ thuật xác định epitop khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là chất đối kháng ActRIIB không có hoạt tính chủ vận hoặc có hoạt tính chủ vận thấp. Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó chứa phần gắn kết kháng nguyên gắn kết với protein đích ActRIIB và làm giảm sự gắn kết của myostatin với ActRIIB xuống mức độ cơ bản. Theo một khía cạnh của phương án này, kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó làm giảm lượng myostratin gắn kết với ActRIIB. Theo khía cạnh khác của phương án này,

kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó ngăn cản hoàn toàn myostatin gắn kết với ActRIIB. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó ức chế sự hoạt hóa Smad. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh chức năng của nó ức chế myostatin gián tiếp qua thụ thể activin loại IIB gây sự ức chế biệt hóa khung xương theo con đường phụ thuộc Smad.

Sự gắn kết có thể được xác định bằng một hoặc nhiều thử nghiệm có thể được sử dụng để đo hoạt tính mà là chất đối kháng hoặc chất chủ vận bởi kháng thể. Theo một phương án, thử nghiệm xác định ít nhất một ảnh hưởng của kháng thể lên ActRIIB bao gồm: ức chế myostatin gắn kết với ActRIIB bằng ELISA, ức chế truyền tín hiệu cảm ứng bởi myostatin (ví dụ, bằng thử nghiệm gen thông báo phụ thuộc Smad), ức chế phosphoryl hóa Smad cảm ứng bởi myostatin (ELISA P-Smad) và ức chế sự ức chế biệt hóa tế bào cơ xương cảm ứng bởi myostatin (ví dụ, bằng thử nghiệm creatin kinaza).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết đặc hiệu với vùng gắn kết myostatin (ví dụ, miền gắn kết phối tử) của ActRIIB. Miền gắn kết phối tử này bao gồm axit amin 19-134 của SEQ ID NO: 181 và được chuyển thành trình tự SEQ ID NO: 182 ở đây.

Theo một phương án, kháng thể gắn kết ActRIIB có K_D bằng 100nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với ActRIIB với ái lực 100pM hoặc nhỏ hơn (ví dụ, 100pM, 50pM, 10pM, 1pM hoặc nhỏ hơn). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với ActRIIB với ái lực nằm trong khoảng từ 10 và 20pM.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế không có khả năng phản ứng chéo với protein có liên quan đến ActRIIB, và cụ thể hơn là không có khả năng phản ứng chéo với ActRIIA của người (NP_001607.1, GI: 4501897).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế theo một phương án ưu tiên gắn kết với ActRIIB thay vì ActRIIA. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với ActRIIB với ái lực lớn hơn gấp 5 lần so với khi chúng gắn kết với ActRIIA, cụ thể hơn là 10 lần, cụ thể hơn nữa là 50 lần, cụ thể hơn nữa là 100 lần.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với ActRIIA với ái lực bằng 100pM hoặc lớn hơn (ví dụ, 250pM, 500pM, 1nM, 5nM hoặc lớn hơn).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là isotyp IgG2.

Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế là isotyp IgG1. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế là isotyp IgG1 và có chức năng phản ứng kích thích thay đổi thông qua đột biến vùng Fc. Theo một phương án, chức năng phản ứng kích thích thay đổi này giảm hoạt tính ADCC và CDC. Theo một phương án, chức năng phản ứng kích thích thay đổi này làm bất hoạt hoạt tính ADCC và CDC.

Theo phương án liên quan khác, kháng thể theo sáng chế là kháng thể IgG1 hoàn chỉnh của người hoặc được làm giống như của người mà không có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) hoặc không có hoạt tính CDC và gắn kết với vùng ActRIIB bao gồm axit amin 19-134 của SEQ ID NO:181.

Theo phương án liên quan khác, kháng thể theo sáng chế là kháng thể IgG1 hoàn chỉnh của người hoặc kháng thể được làm giống như của người có hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc hoạt tính CDC giảm và gắn kết với vùng ActRIIB chứa axit amin 19-134 của SEQ ID NO:181.

Sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập được, cụ thể là kháng thể của người hoặc kháng thể được làm giống như của người ức chế myostatin gắn kết với ActRIIB và hoạt hóa sự biệt hóa cơ xương *in vitro* và *in vivo*. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có nguồn gốc từ trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cụ thể và/hoặc có các đặc trưng cấu trúc cụ thể chẳng hạn như vùng CDR chứa trình tự axit amin cụ thể. Sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được, phương pháp tạo ra kháng thể này, thể liên hợp miễn dịch và phân tử đa hóa trị hoặc đa đặc hiệu chứa kháng thể này và được phẩm chứa kháng thể, thể liên hợp miễn dịch hoặc phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sử dụng kháng thể để ức chế, có nghĩa là, đối kháng, chức năng của ActRIIB để ức chế sự hoạt hóa Smad và do đó cảm ứng sự biệt hóa cơ xương, ví dụ, dẫn đến hiệu quả điều trị rối loạn bệnh lý.

Rối loạn bệnh lý có thể là bệnh hoặc rối loạn về cơ xương, chẳng hạn như teo cơ. Có nhiều nguyên nhân dẫn đến teo cơ, bao gồm kết quả khi điều trị bằng glucocorticoid như cortisol, dexametason, betametason, prednison, metylprednisolon, hoặc prednisolon. Teo cơ cũng có thể do cắt bỏ dây thần kinh vì chấn thương thần kinh hoặc là kết quả của bệnh lý thần kinh bị thoái hóa, bệnh lý thần kinh do chuyển hóa hoặc bệnh lý thần kinh do viêm (ví dụ, hội chứng Guillian-Barré, bệnh lý thần kinh ngoại biên, hoặc do phơi nhiễm với chất độc hoặc thuốc ngoài môi trường).

Ngoài ra, teo cơ có thể là kết quả của bệnh lý cơ, như loạn lực cơ; bệnh lý cơ bẩm sinh, bao gồm bệnh cơ nemalin thể que, bệnh cơ do đa hạch/hạch nhỏ và bệnh ống cơ (nhân trung thể); bệnh cơ do ty thể; bệnh bại liệt tuần hoàn di truyền; bệnh cơ do viêm; bệnh cơ do chuyển hóa, chẳng hạn như nguyên nhân do bệnh tích trữ glucogen hoặc lipid; viêm da cơ địa; viêm đa cơ; bao gồm viêm cơ thể vùi; viêm cơ xương hóa; tiêu cơ vân và myoglobin trong nước tiểu.

Bệnh lý cơ có thể do hội chứng loạn dưỡng cơ, chẳng hạn như Duchenn, Becker, trương lực cơ, loạn dưỡng cơ mặt-vai-cánh tay, Emery-Dreifuss, loạn dưỡng cơ hầu-mắt, loạn dưỡng cơ vai-cánh tay, loạn dưỡng cơ vùng gốc chi, Fukuyama, loạn dưỡng cơ bẩm sinh, hoặc bệnh cơ ngoại biên do di truyền. Bệnh cơ xương còn có thể là loãng xương, gãy xương, tầm vóc nhỏ, hoặc còi cọc.

Ngoài ra, teo cơ có thể do bệnh thần kinh vận động ở người trưởng thành, teo cơ xương tùy sống ở trẻ nhỏ, xơ cứng teo cơ một bên, teo cơ xương tùy sống thiếu niên, bệnh thần kinh vận động tự miễn với sự phong bế điều khiển đa nang, bệnh bại liệt do tổn hại sợi nối do bị đánh hoặc ở xương sống, cố định xương do chấn thương, nằm trên giường bệnh trong thời gian dài, không hoạt động chủ động, không hoạt động do nguyên nhân khách quan, áp lực chuyển hóa hoặc thiếu dinh dưỡng, ung thư, AIDS, bị đói, rối loạn tuyến giáp, bệnh đái tháo đường, nhược trương bẩm sinh lành tính, bệnh hạch trung tâm, tổn thương do bỏng, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh về gan (ví dụ, chẳng hạn như xơ hóa, xơ gan), nhiễm trùng, suy thận, suy tim do sung huyết, sự già hóa, du hành không gian hoặc trải qua một thời gian trong môi trường không có trọng lực.

Ví dụ, về tình trạng liên quan đến tuổi tác có thể được điều trị bao gồm, giảm lượng cơ bắp và rối loạn cơ, teo da, hao mòn cơ, teo não, xơ vữa động mạch, xơ cứng động mạch, khí thũng phổi, chứng loãng xương, viêm khớp mạn tính, thiếu toàn năng của hệ miễn dịch, huyết áp cao, chứng mất trí, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh đục thủy tinh thể, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già, ung thư tuyến tiền liệt, đột quỵ, giảm tuổi thọ trung bình, yếu, mất trí, nếp nhăn, suy giảm chức năng thận, và bệnh mất thính lực do tuổi già; rối loạn chuyển hóa, bao gồm bệnh đái tháo đường typ II, hội chứng chuyển hóa, đường huyết cao, và béo phì.

Tình trạng khác có thể được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế bao gồm bệnh thận cấp tính và/hoặc mạn tính hoặc suy thận, xơ gan hoặc chai gan, ung thư chẳng hạn như ung thư vú, bệnh Parkinson; tình trạng liên quan đến chết noron, như ALS, teo não, hoặc mất trí và thiếu máu.

Các tình trạng khác bao gồm chứng suy nhược cơ thể, chứng suy nhược liên quan đến viêm khớp mạn tính và chứng suy nhược liên quan đến ung thư.

Cho đến nay, còn rất ít liệu pháp điều trị đáng tin cậy hoặc có hiệu quả được phát triển để điều trị rối loạn này.

Dựa vào bằng chứng được công bố về vai trò của activin trong việc gắn kết với các thụ thể ActRIIB trong số các thụ thể khác (Werner và Alzheimer, Cytokine Growth Factors Rev 2006, 17(3):157-171), góp phần vào bệnh xơ gan, thận và phổi và vai trò của myostatin, activin, hoặc ActRIIB trong ung thư (Tsuchida *et al*, Endo J, 2008, 55(1):11-21) kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh sơ và ung thư gan, thận, phổi và ung thư được lấy làm ví dụ, bởi nhưng không bị giới hạn ở bệnh ung thư u liên kết cơ vân, ung thư gây tiêu xương, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư dạ dày ruột.

Sự phòng ngừa có thể là tuyệt đối, ví dụ, vắng mặt toàn bộ tình trạng liên quan đến tuổi hoặc rối loạn chuyển hóa. Sự phòng ngừa cũng có thể là một phần, chẳng hạn như có khả năng xảy ra tình trạng liên quan đến tuổi hoặc rối loạn chuyển hóa ở đối tượng dường như ít có khả năng xảy ra hơn so với đối tượng không nhận được kháng thể theo sáng chế.

Để sáng chế có thể được hiểu rõ ràng hơn nữa, các thuật ngữ nhất định được định nghĩa trước tiên. Các định nghĩa bổ sung được đề cập ở phần mô tả chi tiết sáng chế.

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" đề cập đến hoạt tính của, ví dụ, tế bào lympho, tế bào trình diện kháng nguyên, tế bào thực bào, tế bào bạch cầu hạt, và đại phân tử dịch thể được sản xuất từ các tế bào nêu trên hoặc gan (bao gồm kháng thể, xytokin, và bổ thể), mà dẫn đến gây thiệt hại, phá hủy, hoặc đào thải có chọn lọc sự xâm nhiễm tác nhân gây bệnh, tế bào hoặc mô nhiễm tác nhân gây bệnh, tế bào ung thư, hoặc, trong trường hợp tự miễn hoặc viêm nhiễm bệnh lý, tế bào hoặc mô người bình thường khỏi cơ thể người.

Thuật ngữ "con đường truyền tín hiệu" hoặc "hoạt động truyền tín hiệu" đề cập đến mối quan hệ nhân quả về mặt hóa sinh thường khởi đầu bằng tương tác protein-protein chẳng hạn như gắn kết yếu tố tăng trưởng với thụ thể, dẫn đến sự truyền tín hiệu từ một phần của tế bào đến phần khác của tế bào. Nhìn chung, sự truyền này liên quan đến sự phosphoryl hóa đặc hiệu của một hoặc nhiều gốc tyrosin, serin, hoặc threonin trên một hoặc nhiều protein trong chuỗi phản ứng gây ra sự truyền tín hiệu. Quy trình áp chót đặc trưng là bao gồm các sự kiện trong nhân, dẫn đến sự biến đổi trong biểu hiện gen.

Thuật ngữ ActRIIB hoặc thụ thể Act IIB đề cập đến ActRIIB của người như được xác định trong SEQ ID NO: 181 (AAC64515.1, GI:3769443). Việc nghiên cứu kháng thể kháng ActRIIB đa dòng và đơn dòng tiêu chuẩn đã được biết trong lĩnh vực này, như các kháng thể được sản xuất bởi R&D Systems®, MN, Mỹ. Kháng thể kháng ActRIIB dùng để trị liệu chưa từng được mô tả trước đây. Tất nhiên, các kháng thể có thể được phát triển chống lại ActRIIB của các loài khác và được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý ở các loài này.

Thuật ngữ "kháng thể" được đề cập ở đây bao gồm toàn bộ kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên bất kỳ (nghĩa là, "phần gắn kết kháng nguyên") hoặc các chuỗi đơn của chúng. "Kháng thể" có trong tự nhiên là glycoprotein bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (heavy - H) và hai chuỗi nhẹ (light - L) nội gắn kết bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi trên chuỗi nặng (ở đây viết tắt là V_H) và vùng

cố định chuỗi nặng. Vùng cố định chuỗi nặng bao gồm ba vùng CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ (ở đây viết tắt là V_L) và vùng cố định chuỗi nhẹ. Vùng cố định trên chuỗi nhẹ bao gồm một vùng C_L . Vùng V_H và V_L có thể cũng được phân chia tiếp thành các vùng siêu biến, được đặt tên là vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining regions - CDR), nằm xen kẽ với các vùng mà bảo thủ hơn, gọi là các vùng khung hoạt động (framework regions - FR). Mỗi V_H và V_L được cấu tạo ba CDR và bốn FR sắp xếp từ đầu amino đến đầu cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Vùng biến đổi trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết tương tác với kháng nguyên. Vùng cố định của kháng thể có thể làm trung gian gắn kết globulin miễn dịch với mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm nhiều tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, tế bào hiệu ứng) và thành phần đầu tiên (first component - Clq) của hệ thống bổ thể cổ điển.

Thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể (hoặc chỉ đơn giản là "phần kháng nguyên"), được sử dụng ở đây, đề cập đến kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc một hoặc nhiều mảnh của kháng thể giữ lại khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (ví dụ, phần của ActRIIB). Như đã trình bày, chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể được thực hiện bởi các mảnh của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Ví dụ về mảnh gắn kết được bao hàm trong thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể bao gồm mảnh Fab, mảnh hóa trị một chứa vùng V_L , V_H , C_L và CH1; mảnh $F(ab)_2$, mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab được gắn kết bởi cầu disulfua ở vùng bản lề; mảnh Fd chứa các miền V_H và CH1; mảnh Fv bao gồm miền V_L và V_H của cánh tay đơn của kháng thể; mảnh dAb (Ward *et al.*, 1989 Nature 341:544-546), mà bao gồm miền V_H ; và vùng quyết định bổ thể (CDR) phân lập được.

Ngoài ra, mặc dù hai miền V_L và V_H của mảnh Fv, được mã hóa bởi các gen riêng biệt, chúng có thể được kết hợp với nhau sử dụng phương pháp tái tổ hợp, bằng phân tử nối tổng hợp cho phép chúng được tạo ra ở dạng chuỗi protein đơn trong đó vùng V_L và V_H ghép cặp để hình thành với phân tử hóa trị một (được biết đến dưới dạng chuỗi đơn Fv (scFv); xem, ví dụ, Bird *et al.*, 1988 Science 242:423-426; và Huston *et al.*, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Kháng thể đơn chuỗi này cũng được dự định để được bao gồm trong thuật ngữ "vùng gắn kết kháng nguyên" của kháng thể. Mảnh kháng thể này thu được nhờ sử dụng kỹ thuật thông thường đã biết

đối với người có hiệu biết trung bình trong lĩnh vực này, và mảnh kháng thể được sàng lọc về tính hữu dụng theo cách tương tự như đối với kháng thể nguyên vẹn.

Thuật ngữ "kháng thể phân lập được", được sử dụng ở đây, đề cập đến kháng thể hầu như là không chứa kháng thể khác có đặc hiệu kháng nguyên khác (ví dụ, kháng thể phân lập được gắn kết đặc hiệu ActRIIB hầu như là không chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu kháng nguyên khác với ActRIIB). Tuy nhiên, kháng thể phân lập được gắn kết đặc hiệu ActRIIB có thể, có khả năng phản ứng chéo với kháng nguyên khác, như phân tử ActRIIB của loài khác. Ngoài ra, kháng thể phân lập được có thể như là không chứa vật liệu tế bào và/hoặc chất hóa học tế bào khác.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" hoặc "chế phẩm kháng thể đơn dòng" được sử dụng ở đây đề cập đến việc bào chế phân tử kháng thể của chế phẩm phân tử đơn lẻ. Chế phẩm kháng thể đơn dòng bộc lộ tính đặc hiệu và ái lực gắn kết đơn đối với từng epitop cụ thể.

Thuật ngữ "kháng thể của người", được sử dụng ở đây, nhằm bao gồm kháng thể có vùng biến đổi trong đó cả vùng khung hoạt động và vùng CDR bắt nguồn từ các trình tự có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, nếu kháng thể bao gồm vùng cố định, vùng cố định này cũng bắt nguồn từ các trình tự của người này, ví dụ, trình tự dòng mầm người, hoặc trình tự dòng mầm người bị đột biến hoặc kháng thể bao gồm trình tự khung hoạt động liên ứng có nguồn gốc từ sự phân tích trình tự khung hoạt động liên ứng của người, ví dụ, như được mô tả trong Knappik, *et al.* (2000. J Mol Biol 296, 57-86).

Kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự của người (ví dụ, đột biến được đưa vào bằng đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người", được sử dụng ở đây, không nhằm bao gồm kháng thể trong đó trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của loài động vật có vú khác, chẳng hạn như chuột, được ghép vào trình tự khung hoạt động của người.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng người" đề cập đến kháng thể biểu hiện tính đặc hiệu gắn kết duy nhất mà có vùng biến đổi trong đó cả vùng khung hoạt động và vùng CDR được biến đổi từ trình tự của người. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng

của người được tạo ra bằng kỹ thuật tế bào lai bao gồm tế bào B thu được từ động vật chuyển gen không phải là người, ví dụ, chuột chuyển gen, có hệ gen bao gồm gen chuyển chuỗi nặng và gen chuyển chuỗi nhẹ ở người dung hợp với tế bào bất tử.

Thuật ngữ "kháng thể của người tái tổ hợp", được sử dụng ở đây, bao gồm toàn bộ kháng thể của người được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập được bằng phương pháp tái tổ hợp, chẳng hạn như kháng thể phân lập được từ động vật (ví dụ, chuột) mà là chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể đối với gen globulin miễn dịch của người hoặc tế bào lai được tạo ra từ đó, từ kháng thể phân lập được từ tế bào chủ biến nạp để biểu hiện kháng thể của người, ví dụ, từ tế bào lai chuyển nhiễm, kháng thể phân lập được từ thư viện kháng thể của người tái tổ hợp, tổ hợp, và kháng thể của người được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập được bằng phương pháp khác bất kỳ liên quan đến việc cắt nối tất cả hoặc một phần của gen globulin miễn dịch người, các trình tự vào trình tự vào các trình tự ADN khác. Kháng thể của người tái tổ hợp này có vùng biến đổi trong đó vùng khung hoạt động và vùng CDR bắt nguồn từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, kháng thể tái tổ hợp này có thể được xử lý bằng gây đột biến gen *in vitro* (hoặc, đột biến soma *in vivo* khi động vật chuyển gen các trình tự Ig của người được sử dụng) và do đó trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự, trong khi được biến đổi và có liên quan đến từ trình tự V_H và V_L dòng mầm của người, có thể không tồn tại cách tự nhiên trong danh mục dòng mầm kháng thể của người *in vivo*.

Được sử dụng ở đây, "isotyp" đề cập đến lớp kháng thể (ví dụ, IgM, IgE, IgG chẳng hạn như IgG1 hoặc IgG2) được tạo ra từ gen vùng cố định chuỗi nặng.

Cụm từ "kháng thể nhận biết kháng nguyên" và "kháng thể đặc hiệu kháng nguyên" được sử dụng thay thế ở đây với thuật ngữ "kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên".

Được sử dụng ở đây, kháng thể "gắn kết đặc hiệu với polypeptit ActRIIB" nhằm đề cập đến kháng thể gắn kết với polypeptit ActRIIB của người với K_D bằng 100nM hoặc nhỏ hơn, 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn. Kháng thể "phản ứng chéo với kháng nguyên khác với ActRIIB" dự định đề cập đến kháng thể gắn kết

kháng nguyên với K_D $10 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, $5 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn, hoặc $2 \times 10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn. Kháng thể "không phản ứng chéo với kháng nguyên cụ thể" nhằm đề cập đến kháng thể gắn kết với kháng nguyên, với K_D bằng $1,5 \times 10^{-8}M$ hoặc lớn hơn, hoặc K_D bằng $5-10 \times 10^{-8}M$, hoặc bằng $1 \times 10^{-7}M$ hoặc lớn hơn. Theo các phương án nhất định, kháng thể này không phản ứng chéo với kháng nguyên này biểu hiện về cơ bản là không thể phát hiện gắn kết kháng lại các protein này trong thử nghiệm gắn kết tiêu chuẩn. K_D có thể được xác định sử dụng hệ thống cảm biến sinh học, ví dụ, chẳng hạn như hệ Biacore®, hoặc chuẩn độ cân bằng dung dịch (Solution Equilibrium Titration).

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể đối kháng” nhằm đề cập đến kháng thể ức chế hoạt động truyền tín hiệu cảm ứng bởi ActRIIB với sự có mặt của myostatin. Ví dụ về thử nghiệm phát hiện này bao gồm ức chế truyền tín hiệu cảm ứng bởi myostatin (ví dụ, bằng thử nghiệm gen thông báo phụ thuộc Smad), ức chế phosphoryl hóa Smad cảm ứng bởi myostatin (P-Smad ELISA) và ức chế quá trình ức chế sự biệt hóa tế bào cơ xương cảm ứng bởi myostatin (ví dụ, bằng thử nghiệm creatin kinaza).

Theo một số phương án, kháng thể ức chế truyền tín hiệu cảm ứng bởi ActRIIB như được xác định trong thử nghiệm gen thông báo phụ thuộc Smad có IC50 bằng 10nM hoặc nhỏ hơn, 1nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100pM hoặc nhỏ hơn.

Được sử dụng ở đây, kháng thể “không có hoạt tính đối kháng” nhằm đề cập đến kháng thể không làm tăng đáng kể hoạt tính truyền tín hiệu trung gian bởi ActRIIB khi vắng mặt myostatin trong thử nghiệm dựa trên cơ sở tế bào, chẳng hạn như ức chế truyền tín hiệu cảm ứng bởi ActRIIB (ví dụ, bằng thử nghiệm gen thông báo phụ thuộc Smad), ức chế phosphoryl hóa Smad cảm ứng bởi myostatin (P-Smad ELISA) và ức chế quá trình ức chế sự biệt hóa tế bào cơ xương cảm ứng bởi myostatin (ví dụ, bằng thử nghiệm creatin kinaza). Các thử nghiệm này được mô tả chi tiết trong Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Thuật ngữ " K_{assoc} " hoặc " K_a ", được sử dụng ở đây, nhằm đề cập đến tỷ lệ tương quan của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể, trong khi thuật ngữ " K_{dis} " hoặc " K_d ", được sử dụng ở đây, nhằm đề cập đến tỷ lệ phân tách tương tác kháng thể-kháng

nguyên. Thuật ngữ " K_D ", được sử dụng ở đây, nhằm đề cập đến hằng số phân ly, hằng số này thu được từ tỷ lệ K_d với K_a (ví dụ, K_d/K_a) và được thể hiện dưới dạng nồng độ mol (M). Giá trị K_D của kháng thể có thể được xác định sử dụng phương pháp đã được thiết lập rõ ràng trong lĩnh vực này. Phương pháp để xác định K_D của kháng thể sử dụng sự cộng hưởng từ Plasmon bề mặt, như hệ thống cảm biến sinh học Biacore®, hoặc chuẩn độ cân bằng dung dịch (SET) (xem Friguier B *et al.* (1985) J. Immunol Methods; 77(2): 305-319, và Hanel C *et al.* (2005) Anal Biochem; 339(1): 182-184).

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực" đề cập đến độ mạnh tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên ở từng vị trí có tính kháng nguyên. Trong mỗi vị trí kháng nguyên, vùng biến đổi của "cánh tay" kháng thể tương tác thông qua lực liên kết phi cộng hóa trị yếu với kháng nguyên ở rất nhiều vị trí; càng nhiều tương tác, ái lực càng mạnh.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái tính" đề cập đến một thước đo thông tin về sự ổn định toàn bộ hoặc độ mạnh của phức hợp kháng thể-kháng nguyên. Chúng được kiểm soát bởi ba yếu tố chính: ái lực epitop kháng thể; hóa trị của cả kháng nguyên và kháng thể; và sự sắp xếp cấu trúc của các phần tương tác. Tóm lại, các yếu tố này xác định tính đặc hiệu của kháng thể, đó là, khả năng kháng thể cụ thể gắn kết với epitop kháng nguyên chính xác.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ADCC" hoặc hoạt tính "gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể" đề cập đến hoạt tính làm suy kiệt tế bào B của người. Hoạt tính ADCC có thể được đo bằng thử nghiệm suy kiệt tế bào B ở người đã biết trong lĩnh vực này.

Để có được mẫu dò ái tính cao hơn, thể liên hợp dime (hai phân tử protein kháng thể ghép cặp với chất đánh dấu cho FACS) có thể được xây dựng, từ đó, tạo tương tác ái lực thấp (chẳng hạn như với kháng thể dòng mầm) được FACS phát hiện dễ dàng hơn. Ngoài ra, các cách khác để tăng ái tính gắn kết kháng nguyên bao gồm tạo ra dime, trime hoặc multime của cấu trúc bất kỳ được mô tả ở đây của kháng thể kháng ActRIIB. Các multime này có thể được tạo ra qua gắn kết cộng hóa trị giữa các modul đơn lẻ, ví dụ, bằng cách mô phỏng sự gắn kết đầu C-với-N- trong tự nhiên hoặc bằng cách mô phỏng các dime kháng thể gắn kết với nhau qua vùng cố định của

chúng. Gắn kết được thiết kế trong bề mặt trung gian Fc/Fc có thể là cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị. Ngoài ra, các thành phần cặp của dime hoặc multime khác với Fc có thể được sử dụng trong phân tử lai ActRIIB để tạo ra các cấu trúc bậc cao hơn này. Ví dụ, có thể sử dụng các miền multime hóa chẳng hạn như các miền trime hóa được mô tả trong WO2004/039841 hoặc miền pentame hóa được mô tả trong WO98/18943.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tính chọn lọc" đối với kháng thể đề cập đến kháng thể gắn kết với polypeptit đích nhất định nhưng không gắn kết với polypeptit có liên quan gần.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ái lực cao" đối với kháng thể đề cập đến kháng thể có K_D đối với kháng nguyên đích bằng 1nM hoặc nhỏ hơn. Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" bao gồm người hoặc động vật không phải là người bất kỳ.

Thuật ngữ "động vật không phải là người" bao gồm tất cả động vật có xương sống, ví dụ, động vật có vú và không phải động vật có vú, chẳng hạn như động vật linh trưởng không phải là người, cừu, chó, mèo, ngựa, bò, gà, lưỡng cư, bò sát, v.v..

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ, "được tối ưu hóa" có nghĩa là trình tự nucleotit được biến đổi để mã hóa trình tự axit amin sử dụng codon được tiên hơn trong tế bào hoặc sinh vật sản xuất, thường là tế bào nhân thực, ví dụ, tế bào *Pichia*, tế bào *Trichoderma*, tế bào buồng trứng chuột Hamster Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO) hoặc tế bào của người. Trình tự nucleotit tối ưu hóa được thiết kế để giữ lại toàn bộ hoặc nhiều nhất có thể trình tự axit amin gốc được mã hóa bằng trình tự nucleotit ban đầu, chúng được biết đến như là trình tự "gốc". Trình tự tối ưu hóa ở đây được thiết kế để có codon được ưu tiên trong tế bào động vật có vú CHO, tuy nhiên sự biểu hiện tối ưu của trình tự này trong các tế bào nhân thực khác cũng được bao gồm ở đây. Trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit tối ưu cũng được đề cập đến như được tối ưu hóa.

Nhiều khía cạnh khác nhau của sáng chế được mô tả chi tiết hơn trong các phần sau.

Thử nghiệm tiêu chuẩn để đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể với ActRIIB của các loài khác nhau được biết đến trong lĩnh vực này, ví dụ, bao gồm,

ELISA, lai western blot và RIA. Thử nghiệm thích hợp được mô tả chi tiết trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Ái lực gắn kết của kháng thể cũng có thể được đánh giá bằng thử nghiệm tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như bằng thử nghiệm Biacore hoặc Chuẩn độ cân bằng dung dịch. Kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt dựa trên các kỹ thuật chẳng hạn như Biacore có thể xác định động học gắn kết cho phép tính toán ái lực gắn kết. Thử nghiệm để đánh giá tác động của kháng thể lên các đặc tính chức năng của ActRIIB (ví dụ, gắn kết thụ thể, ngăn ngừa hoặc cảm ứng tăng sinh tế bào B của người hoặc sự sản xuất IgG) được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo đó, kháng thể "ức chế" một hoặc nhiều đặc tính chức năng này của ActRIIB (ví dụ, hoạt tính hóa sinh, hóa miễn dịch, tế bào, sinh lý hoặc hoạt tính sinh học khác, hoặc tương tự) như được xác định theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả ở đây, sẽ được hiểu là đề cập đến sự giảm đáng kể về thông kê hoạt tính nào đó so với cái được nhìn thấy khi vắng mặt kháng thể (ví dụ, hoặc khi có mặt tính đặc hiệu không liên quan của kháng thể đối chứng). Kháng thể ức chế hoạt tính ActRIIB tác động làm giảm đáng kể về mặt thống kê ít nhất là 10% thông số đo được, ít nhất 50%, 80% hoặc 90%, và theo các phương án nhất định kháng thể theo sáng chế có thể ức chế lớn hơn 95%, 98% hoặc 99% hoạt tính chức năng ActRIIB.

Thuật ngữ "phong bế chéo", "bị phong bế chéo" và "sự phong bế chéo" được sử dụng thay thế ở đây để chỉ khả năng của kháng thể hoặc chất gắn kết khác nhằm ngăn cản gắn kết của kháng thể khác hoặc chất gắn kết khác với ActRIIB, cụ thể là miền gắn kết phối tử, trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh tiêu chuẩn.

Khả năng hoặc trong phạm vi mà kháng thể hoặc chất gắn kết khác có thể ngăn chặn sự gắn kết của kháng thể khác hoặc phân tử gắn kết với ActRIIB, và do đó liệu chúng có thể coi là phong bế chéo theo sáng chế, có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm gắn kết cạnh tranh tiêu chuẩn. Một thử nghiệm thích hợp bao gồm sử dụng kỹ thuật Biacore (ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị BIAcore (Biacore, Uppsala, Thụy Điển)), mà có thể xác định phạm vi tương tác sử dụng kỹ thuật cộng hưởng Plasmon bề mặt. Thử nghiệm khác để xác định sự phong bế chéo sử dụng phương thức dựa vào ELISA. Một thử nghiệm khác nữa sử dụng phân tích FACS, trong đó sự cạnh

tranh giữa các kháng thể khác nhau để gắn kết với tế bào biểu hiện ActRIIB được kiểm nghiệm (như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế).

Theo sáng chế, kháng thể hoặc chất gắn kết khác phong bế chéo theo sáng chế gắn kết với ActRIIB trong thử nghiệm phong bế chéo BIAcore được mô tả sao cho sự gắn kết được ghi nhận của sự kết hợp (hỗn hợp) kháng thể hoặc chất gắn kết nằm trong khoảng 80% và 0,1% (ví dụ, 80% đến 4%) gắn kết tối đa theo lý thuyết, đặc biệt là trong khoảng 75% và 0,1% (ví dụ, 75% đến 4%) gắn kết tối đa theo lý thuyết, và đặc biệt hơn là nằm trong khoảng 70% và 0,1% (ví dụ, 70% đến 4%), và đặc biệt hơn nữa là nằm trong khoảng 65% và 0,1% (ví dụ, 65% đến 4%) gắn kết tối đa theo lý thuyết (như được xác định ở trên) của hai kháng thể hoặc chất gắn kết kết hợp.

Kháng thể được xác định là phong bế chéo kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế trong thử nghiệm ELISA, nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng gây ra sự giảm gắn kết kháng thể kháng ActRIIB với ActRIIB trong khoảng 60% đến 100%, đặc biệt là trong khoảng 70% đến 100%, và đặc biệt hơn nữa là trong khoảng 80% đến 100%, khi so với các giếng đối chứng dương (có nghĩa là, kháng thể giống với kháng thể kháng ActRIIB và ActRIIB, nhưng không phải là kháng thể phong bế chéo để “thử nghiệm”). Ví dụ về kháng thể phong bế chéo như được viện dẫn ở đây là MOR08159 và MOR08213. Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể phong bế chéo MOR08159 hoặc MOR08213 gắn kết với ActRIIB.

Kháng thể tái tổ hợp

Kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể tái tổ hợp của người, được phân lập và xác định đặc trưng về cấu trúc, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Trình tự axit amin V_H của kháng thể phân lập được theo sáng chế được nêu ở SEQ ID NO: 99-112. Trình tự axit amin V_L của kháng thể phân lập được theo sáng chế được thể hiện lần lượt là trong SEQ ID NO: 85-98. Ví dụ về trình tự axit amin chuỗi nặng có độ dài đầy đủ cụ thể của kháng thể theo sáng chế được thể hiện trong các SEQ ID NO: 146-150 và 156-160. Ví dụ về trình tự axit amin chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ cụ thể của kháng thể theo sáng chế được thể hiện lần lượt là trong các SEQ ID NO: 141-145 và 151-155. Kháng thể khác theo sáng chế bao gồm axit amin bị đột biến bằng cách bỏ, chèn hoặc thay thế axit amin, vẫn có ít nhất 60, 70, 80, 90, 95, 97 hoặc 99

phần trăm tương đồng trình tự trong vùng CDR với vùng CDR được mô tả trong trình tự được mô tả ở trên. Theo một số phương án, nó chứa trình tự axit amin đột biến trong đó không quá 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin bị đột biến bằng cách loại bỏ, chèn hoặc thế axit amin trong vùng CDR so với vùng CDR được mô tả trong trình tự được mô tả ở trên.

Ngoài ra, trình tự nucleotit gốc của chuỗi nặng biến đổi được thể hiện trong các SEQ ID NO: 127-140. Trình tự nucleotit gốc của chuỗi nhẹ biến đổi được nêu trong các SEQ ID NO: 113-126. Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào động vật có vú được thể hiện trong SEQ ID NO: 161-165 và 171-175. Trình tự nucleotit chuỗi nặng có độ dài đầy đủ được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào động vật có vú được nêu trong các SEQ ID NO: 166-170 và 176-180. Kháng thể khác theo sáng chế chứa trình tự axit amin hoặc axit nucleic đột biến, có ít nhất 60 hoặc hơn (có nghĩa là, 80, 90, 95, 97, 99 hoặc hơn) phần trăm tương đồng trình tự với trình tự được mô tả ở trên. Theo các phương án nhất định, nó chứa trình tự axit amin đột biến trong đó không quá 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin bị đột biến do mất, thêm hoặc thế axit amin trong vùng biến đổi so với vùng biến đổi được thể hiện trong trình tự được mô tả ở trên.

Do mỗi kháng thể trong số này gắn kết với epitop giống nhau và là thể hệ sau từ kháng thể gốc giống nhau, trình tự (trình tự nucleotit và trình tự axit amin) V_H , V_L , chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, và chuỗi nặng có độ dài đầy đủ có thể "được trộn và ghép" để tạo phân tử gắn kết kháng ActRIIB theo sáng chế. Sự gắn kết ActRIIB của kháng thể "được trộn và ghép" có thể được kiểm tra sử dụng thử nghiệm gắn kết đã mô tả ở trên và trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (ví dụ, ELISA). Khi những chuỗi này được trộn và ghép, trình tự V_H từ cặp V_H/V_L cụ thể có thể được thay thế bằng trình tự V_H tương đồng về cấu trúc. Tương tự, trình tự chuỗi nặng có độ dài đầy đủ từ cặp chuỗi nặng có độ dài đầy đủ/chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ cụ thể có thể được thay thế bằng trình tự chuỗi nặng có độ dài đầy đủ tương đồng về cấu trúc. Tương tự như vậy, trình tự V_L từ cặp V_H/V_L cụ thể có thể được thay thế bằng trình tự V_L tương đồng về cấu trúc. Tương tự như vậy trình tự chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ từ cặp chuỗi nặng có độ dài đầy đủ/chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ cụ thể có thể được thay thế bằng trình tự chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ tương đồng về cấu trúc. Theo đó, theo một khía cạnh, sáng

chế đề xuất kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp hoặc vùng gắn kết kháng nguyên của chúng chứa: vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 99-112; và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 85-98.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất:

(i) kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp phân lập được chứa: chuỗi nặng có độ dài đầy đủ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 99-112; và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 85-98, hoặc

(ii) mảnh chức năng và protein chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất:

(i) kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp phân lập được chứa trình tự chuỗi nặng có độ dài đầy đủ được mã hóa bởi trình tự nucleotit được tối ưu hóa cho sự biểu hiện trong tế bào động vật có vú được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:127-140, và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ được mã hóa bởi trình tự nucleotit được tối ưu hóa biểu hiện trong tế bào động vật có vú được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:113-126, hoặc

(ii) mảnh chức năng và protein chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của chúng.

Trình tự axit amin của CDR1 V_H của kháng thể được nêu trong các SEQ ID NO: 1-14.

Trình tự axit amin của CDR2 V_H của kháng thể được nêu trong các SEQ ID NO: 15-28.

Trình tự axit amin của CDR3 V_H của kháng thể được nêu trong các SEQ ID NO: 29-42.

Trình tự axit amin của CDR1 V_L của kháng thể được nêu trong các SEQ ID NO: 43-56.

Trình tự axit amin của CDR2 V_L của kháng thể được nêu trong các SEQ ID NO: 57-70.

Trình tự axit amin của CDR3 V_L của kháng thể được nêu trong các SEQ ID NO: 71-84.

Vùng CDR được mô tả sử dụng hệ thống Kabat (Kabat, E. A., *et al.*, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Phương pháp khác xác định vùng CDR sử dụng phương pháp phát minh bởi Chothia (Chothia *et al.* 1989, Nature, 342:877-883). Sự định nghĩa Chothia dựa trên vị trí vùng có cấu trúc cuộn (loop). Tuy nhiên do thay đổi trong hệ thống đánh số sử dụng trong Chothia, hiện nay hệ thống này ít được sử dụng phổ biến. Các hệ thống khác để xác định CDR cũng tồn tại.

Mỗi kháng thể được cho rằng có thể gắn kết với ActRIIB và tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên đó được cung cấp chủ yếu bởi vùng CDR1, 2 và 3, trình tự CDR1, 2 và 3 của V_H và trình tự CDR1, 2 và 3 của V_L có thể được "trộn và ghép" (có nghĩa là, CDR từ các kháng thể khác nhau có thể được trộn và ghép, mỗi kháng thể bao gồm CDR1, 2 và 3 của V_H và CDR1, 2 và 3 của V_L tạo phân tử gắn kết kháng ActRIIB khác theo sáng chế. Gắn kết ActRIIB của kháng thể "được trộn và ghép" có thể được kiểm tra bằng thử nghiệm gắn kết được mô tả ở trên và trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (ví dụ, ELISA). Khi trình tự CDR V_H được trộn và ghép, trình tự CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 từ trình tự V_H cụ thể có thể được thay thế bằng trình tự CDR có cấu trúc tương đồng. Tương tự, khi trình tự CDR V_L được trộn và ghép, trình tự CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 từ trình tự V_L cụ thể có thể được thay thế bằng trình tự CDR có cấu trúc tương đồng. Điều này là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng trình tự V_H và V_L mới có thể được tạo ra bằng cách thay thế một hoặc nhiều trình tự CDR của vùng V_H và/hoặc V_L bằng các trình tự tương đồng về cấu trúc từ trình tự CDR được thể hiện ở đây cho kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp phân lập được, hoặc vùng gắn kết kháng nguyên của chúng có: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1-14; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15-28; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 29-42; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự SEQ ID NO: 43-56; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 57-70; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 71-84.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 1; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 15; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 29; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 43; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 57; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 71.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 2 vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 16; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 30; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 44; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 58; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 72.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 3; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 17; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 31; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 45; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 59; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 73.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 4; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 18; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 32; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 46; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 60; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 74.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 5; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 19; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 33; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 47; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 61; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 75.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 20; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 34; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 48; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 62; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 76.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 21; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 35; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 49; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 63; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 77.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 8; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 22; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 36; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 64; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 78.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 23; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 79.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 10; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 38; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 52; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 66; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 80.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 11; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 25; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 39; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 67; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 81.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 12; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 26; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 40; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 54; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 68; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 82.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 13; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 27; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 41; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 55; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 69; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 83.

Theo một phương án, kháng thể bao gồm: vùng biến đổi CDR1 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 14; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 28; vùng biến đổi CDR3 chuỗi nặng của SEQ ID NO: 42; vùng biến đổi CDR1 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 56; vùng biến đổi CDR2 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 70; và vùng biến đổi CDR3 chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 84.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm: (a) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 85 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 99; (b) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 86 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 100; (c) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 87 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 101; (d) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 88 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 102; (e) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 89 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 103; (f) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 90 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 104; (g) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 91 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 105; (h) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 92

và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 106; (i) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 93 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 107; (j) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 94 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 108; (k) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 95 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 109; (l) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 96 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 110; (m) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 97 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 111; hoặc (n) trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 98 và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 112.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm: (a) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 146 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 141; (b) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 147 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 142; (c) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 148 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 143; (d) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 149 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 144; (e) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 150 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 145; (f) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 156 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 151; (g) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 157 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 152; (h) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 158 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 153; (i) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 159 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 154; hoặc (j) trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 160 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 155.

Được sử dụng ở đây, kháng thể của người chứa vùng biến đổi trên chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ là “sản phẩm của” hoặc “bắt nguồn từ” trình tự dòng mầm cụ thể nếu vùng biến đổi hoặc chuỗi có độ dài đầy đủ của kháng thể thu được từ hệ thống mà sử dụng gen globulin miễn dịch dòng mầm của người. Hệ thống này bao gồm gây miễn dịch chuột chuyển gen mang gen globulin miễn dịch của người bằng kháng nguyên quan tâm hoặc sàng lọc thư viện gen globulin miễn dịch của người bộc lộ trên thực khuẩn thể bằng kháng nguyên quan tâm. Kháng thể của người là “sản phẩm của” hoặc “bắt nguồn từ” trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người có thể được xác định ví dụ, bằng cách so sánh trình tự axit amin của kháng thể của người với trình tự axit amin của globulin miễn dịch dòng mầm

của người và chọn trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người gần nhất về trình tự (có nghĩa là, % tương đồng lớn nhất) với trình tự kháng thể của người. Kháng thể của người là "sản phẩm của" hoặc "nhận được từ" trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người cụ thể có thể chứa axit amin khác khi so với trình tự dòng mầm, vì, ví dụ, đột biến soma xuất hiện tự nhiên hoặc đưa vào có chủ ý của đột biến định hướng vị trí. Tuy nhiên, kháng thể của người được chọn đặc trưng là ít nhất là 90% tương đồng trong trình tự axit amin so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm của người và chứa gốc axit amin nhằm xác định kháng thể này là của người khi so với trình tự axit amin globulin miễn dịch dòng mầm của loài khác (ví dụ, trình tự dòng mầm của chuột). Trong các trường hợp nhất định, kháng thể của người có thể ít nhất 80%, 90%, hoặc ít nhất 95%, hoặc thậm chí ít nhất là 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng về trình tự axit amin so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin dòng mầm. Điển hình là, kháng thể của người thu được từ trình tự dòng mầm của người cụ thể sẽ bộc lộ ít hơn 10 axit amin sai khác so với trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự globulin dòng mầm của người. Trong nhiều trường hợp, kháng thể của người có thể bộc lộ ít hơn 5, hoặc thậm chí không quá 4, 3, 2, hoặc 1 axit amin sai khác so với trình tự axit amin được mã hóa bởi gen globulin miễn dịch dòng mầm.

Theo một phương án kháng thể theo sáng chế được mã hóa bởi pBW522 hoặc pBW524 (đăng ký ở DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức vào ngày 18 tháng 8 năm 2009 số đăng ký lần lượt là DSM22873 và DSM22874).

Kháng thể tương đồng

Theo phương án khác nữa, kháng thể theo sáng chế có trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ; trình tự nucleotit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, trình tự nucleotit vùng biến đổi trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trình tự axit amin vùng biến đổi trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương đồng với trình tự nucleotit và axit amin của kháng thể đã mô tả ở đây, và trong đó kháng thể giữ lại đặc tính chức năng mong muốn của kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế.

Ví dụ, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp phân lập được (hoặc protein chức năng chứa vùng gắn kết kháng nguyên của nó) chứa vùng biến đổi

trên chuỗi nặng và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ, trong đó: vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự axit amin ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% (tốt hơn nếu ít nhất 95, 97 hoặc 99%) tương đồng với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 99-112; vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có trình tự axit amin ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% (tốt hơn nếu ít nhất 95, 97 hoặc 99%) tương đồng với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 85-98; và kháng thể biểu hiện ít nhất một đặc tính chức năng sau: (i) nó ức chế gắn kết myostatin *in vitro* hoặc *in vivo* và/hoặc (ii) làm giảm sự ức chế biệt hóa cơ thông qua con đường phụ thuộc Smad.

Trong ví dụ khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp phân lập được, (hoặc protein chức năng chứa vùng gắn kết kháng nguyên của nó) bao gồm chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, trong đó: chuỗi nặng có độ dài đầy đủ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% (tốt hơn nếu ít nhất 95, 97 hoặc 99%) so với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự SEQ ID NO: 146-150 và 156-160; chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% (tốt hơn nếu ít nhất 95, 97 hoặc 99%) so với trình tự axit amin được chọn từ nhóm axit amin của SEQ ID NO: 141-145 và 151-155; và kháng thể biểu hiện ít nhất một đặc tính chức năng: (i) nó ức chế sự gắn kết myostatin *in vitro* hoặc *in vivo* và/hoặc (ii) làm giảm sự ức chế biệt hóa cơ thông qua con đường phụ thuộc Smad. Tốt hơn nếu kháng thể này gắn kết với vùng gắn kết phối tử của ActRIIB. Theo ví dụ khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp phân lập được (hoặc protein chức năng có vùng gắn kết kháng nguyên của nó), bao gồm chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, trong đó: chuỗi nặng có độ dài đầy đủ được mã hóa bởi trình tự nucleoit ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% (tốt hơn nếu ít nhất 95, 97 hoặc 99%) tương đồng với trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 166-170 và 176-180; chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ được mã hóa bởi trình tự nucleotit ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% (tốt hơn nếu ít nhất 95, 97 hoặc 99%) tương đồng với trình tự nucleotit được chọn từ nhóm có trình tự SEQ ID NO: 161-165 và 171-175; và kháng thể biểu hiện ít nhất một đặc tính chức năng sau: (i) nó ức chế gắn kết myostatin *in vitro* hoặc *in vivo* và/hoặc (ii) làm giảm sự ức chế biệt hóa cơ thông qua con đường phụ thuộc Smad. Theo các phương án khác nhau, kháng thể này gắn kết với vùng gắn kết phối tử của ActRIIB.

Theo các phương án khác nhau, kháng thể có thể biểu hiện một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, hoặc ba đặc tính chức năng được thảo luận ở trên. Kháng thể có thể là, ví dụ, kháng thể của người, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể khảm. Tốt hơn nếu, kháng thể là kháng thể IgG1 của người hoàn chỉnh.

Theo phương án khác, trình tự axit amin V_H và/hoặc V_L có thể 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với trình tự đã bộc lộ ở trên. Theo phương án khác, trình tự axit amin V_H và/hoặc V_L có thể tương đồng ngoại trừ sự thể axit amin trong không quá 1, 2, 3, 4 hoặc 5 vị trí axit amin. Kháng thể có vùng V_H và V_L có độ tương đồng trình tự cao (có nghĩa là, 80% hoặc lớn hơn) so với vùng V_H và V_L lần lượt là SEQ ID NO 99-112 và SEQ ID NO: 85-98, có thể thu được bằng cách gây đột biến (ví dụ, đột biến định hướng vị trí hoặc đột biến qua PCR) phân tử axit nucleic lần lượt là SEQ ID NO: 127-140 và 113-126, sau đó kiểm tra chức năng còn lại (có nghĩa là, chức năng được bộc lộ ở trên) của kháng thể biến đổi được mã hóa sử dụng thử nghiệm chức năng đã mô tả ở đây.

Theo phương án khác, trình tự axit amin chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và/hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ có thể có độ tương đồng 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự đã bộc lộ ở trên. Kháng thể bao gồm chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ có độ tương đồng cao (có nghĩa là, 80% hoặc lớn hơn) với chuỗi nặng có độ dài đầy đủ của SEQ ID NO: 146-150 và 156-160 và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ của trình tự lần lượt là SEQ ID NO: 141-145 và 151-155, có thể thu được bằng cách gây đột biến (ví dụ, đột biến điểm định hướng hoặc đột biến qua PCR) phân tử axit nucleic lần lượt là SEQ ID NO: 166-170 và 176-180 và SEQ ID NO: 161-165 và 171-175, sau đó kiểm tra kháng thể biến đổi được mã hóa chức năng phần còn lại (có nghĩa là, chức năng được bộc lộ ở trên) sử dụng thử nghiệm chức năng đã mô tả ở đây.

Theo phương án khác, trình tự nucleotit chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và/hoặc chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ có thể 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với trình tự đã bộc lộ ở trên.

Theo phương án khác, trình tự nucleotit vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể tương đồng 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự đã bộc lộ ở trên.

Được sử dụng ở đây, phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là hàm số vị trí tương đồng được chia sẻ giữa các trình tự (có nghĩa là, % tương đồng = # vị trí tương đồng/tổng số # vị trí x 100), đưa vào thống kê số khoảng trống, và độ dài của mỗi khoảng trống, điều này cần được đưa vào để sắp hàng tối ưu hai trình tự. Việc so sánh trình tự và xác định phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể được thực hiện sử dụng thuật toán toán học, như mô tả dưới đây.

Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988), thuật toán này được tổng hợp trong chương trình ALIGN (bản 2.0), sử dụng bảng khối lượng gốc PAM120, điểm trừ độ dài khoảng trống là 12 và điểm trừ cho khoảng trống là 4. Ngoài ra, phần trăm tương đồng giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) được kết hợp trong chương trình GAP trong gói phần mềm GCG, sử dụng ma trận Blossom 62 hoặc ma trận PAM250, và trọng số khoảng trống là 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và trọng số độ dài là 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6.

Kháng thể với sự biến đổi bảo toàn

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có vùng biến đổi trên chuỗi nặng có chứa trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ bao gồm trình tự CDR1, CDR2, và CDR3, trong đó một hoặc nhiều trình tự CDR này có trình tự axit amin đặc hiệu dựa trên kháng thể được mô tả ở đây hoặc kháng thể biến đổi bảo toàn của nó, và trong đó kháng thể giữ lại đặc tính chức năng mong muốn của kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế. Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể kháng ActRIIB tái tổ hợp phân lập được, hoặc protein chức năng chứa vùng gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi trên chuỗi nặng bao gồm trình tự CDR1, CDR2, và CDR3 và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ bao gồm trình tự CDR1, CDR2, và CDR3, trong đó: trình tự axit amin vùng biến đổi trên chuỗi nặng CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1-14, và các biến đổi bảo toàn của chúng; trình tự axit

amin vùng biến đổi trên chuỗi nặng CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15-28, biến đổi trình tự bảo toàn của chúng; trình tự axit amin vùng biến đổi trên chuỗi nặng CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 29-42, và các biến đổi bảo toàn của chúng; trình tự axit amin vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 43-56, và các biến đổi bảo toàn của chúng; trình tự axit amin vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 57-70, và các biến đổi bảo toàn của chúng; trình tự axit amin vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 71-84, và các biến đổi bảo toàn của chúng. Theo các phương án biến đổi, kháng thể thể hiện ít nhất một trong các đặc tính chức năng sau đây: (i) kháng thể ức chế gắn kết myostatin *in vitro* hoặc *in vivo* và/hoặc (ii) làm giảm sự ức chế biệt hóa cơ thông qua con đường phụ thuộc Smad.

Theo phương án khác, kháng thể có thể biểu hiện một hoặc cả hai đặc tính chức năng được liệt kê ở trên. Kháng thể này có thể, ví dụ, là kháng thể của người, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể khảm.

Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế tối ưu hóa biểu hiện trong tế bào động vật có vú có trình tự chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và trình tự chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, trong đó một hoặc nhiều trình tự này có trình tự axit amin đặc hiệu dựa trên kháng thể mô tả ở đây hoặc các biến đổi bảo toàn của chúng, và trong đó kháng thể giữ được các đặc tính chức năng mong muốn của kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế. Theo đó, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng phân lập được kháng ActRIIB tối ưu hóa biểu hiện trong tế bào động vật có vú có chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ trong đó: chuỗi nặng có độ dài đầy đủ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 146-150 và 156-160, và các biến đổi bảo toàn của chúng; và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ có trình tự được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 141-145 và 151-155, và các biến đổi bảo toàn của chúng; và kháng thể thể hiện ít nhất một trong các đặc tính chức năng sau đây: (i) kháng thể ức chế gắn kết myostatin *in vitro* hoặc *in vivo* và/hoặc (ii) làm giảm sự ức chế biệt hóa cơ thông qua con đường phụ thuộc Smad.

Theo phương án khác, kháng thể có thể biểu hiện một hoặc cả hai đặc tính chức năng được liệt kê ở trên. Kháng thể này có thể là, ví dụ, kháng thể của người, kháng thể được làm như của người hoặc kháng thể khảm.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biến đổi trình tự bảo toàn" nhằm đề cập đến sự biến đổi axit amin mà không có tác động đáng kể hoặc làm thay đổi đặc tính gắn kết của kháng thể bao gồm trình tự axit amin này. Sự biến đổi bảo toàn này bao gồm thay thế, thêm và loại bỏ axit amin. Biến đổi có thể được đưa vào kháng thể theo sáng chế bằng kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, như đột biến điểm định hướng và đột biến qua PCR.

Thay thế axit amin bảo toàn là các thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương đồng. Các họ gốc axit amin có chuỗi bên tương đồng được xác định trong lĩnh vực này. Các họ này bao gồm axit amin có chuỗi bên là bazơ (ví dụ, lyzin, arginin, histidin), chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), chuỗi bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, cystein, tryptophan), chuỗi bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, phenylalanin, methionin), chuỗi bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleucin) và chuỗi bên có vòng thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Do đó, một hoặc nhiều gốc axit amin trong vùng CDR của kháng thể theo sáng chế có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác từ cùng họ chuỗi bên, và kháng thể biến đổi có thể được kiểm tra về chức năng còn giữ lại sử dụng thử nghiệm chức năng được mô tả ở đây.

Kháng thể gắn kết với epitop giống như kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop giống như các kháng thể kháng ActRIIB đặc hiệu khác nhau theo sáng chế được mô tả ở đây. Tất cả kháng thể được mô tả ở phần Ví dụ thực hiện sáng chế đều có khả năng phong bế sự gắn kết myostatin với ActRIIB gắn kết với cùng epitop trong ActRIIB với ái lực cao, epitop này được bao gồm giữa các axit amin 19-134 của SEQ ID NO:181.

Do đó, kháng thể khác có thể được xác định dựa trên khả năng cạnh tranh chéo của chúng (ví dụ, ức chế cạnh tranh gắn kết, theo phương thức có ý nghĩa thống kê) với kháng thể khác theo sáng chế trong thử nghiệm gắn kết ActRIIB tiêu

chuẩn. Khả năng của kháng thể kiểm nghiệm trong việc ức chế gắn kết của kháng thể theo sáng chế với ActRIIB của người chứng minh rằng kháng thể kiểm nghiệm có thể cạnh tranh với kháng thể gắn kết với ActRIIB của người; chẳng hạn như theo lý thuyết không giới hạn, kháng thể có thể gắn kết gắn kết với cùng epitop hoặc epitop liên quan (ví dụ, tương đồng về cấu trúc hoặc gần giống về không gian) trên ActRIIB của người so với kháng thể cạnh tranh với nó. Theo phương án nhất định, kháng thể gắn kết với cùng epitop trên ActRIIB của người so với kháng thể theo sáng chế là kháng thể tái tổ hợp của người. Kháng thể tái tổ hợp của người này có thể được điều chế và phân lập như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 85, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 99.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 86, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 100.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 87, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 101.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 88, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 102.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 89, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 103.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 90, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 104.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 91, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 105.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 92, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 106.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 93, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 107.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 94, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 108.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 95, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 109.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 96, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 110.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 97, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 111.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể có trình tự biến đổi trên chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 98, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 112.

Theo các thử nghiệm lập bản đồ epitop chi tiết hơn, vùng gắn kết của kháng thể cụ thể theo sáng chế được xác định rõ ràng hơn.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop chứa các axit amin 78-83 của SEQ ID NO: 181 (WLDDFN – SEQ ID NO:188).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết với epitop chứa các axit amin 76-84 của SEQ ID NO: 181 (GCWLDDFNC – SEQ ID NO:186).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết với epitop chứa các axit amin 75-85 của SEQ ID NO: 181 (KGCWLDDFNCY – SEQ ID NO:190).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết với epitop chứa các axit amin 52-56 của SEQ ID NO: 181 (EQDKR – SEQ ID NO:189).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết với epitop chứa các axit amin 49-63 của SEQ ID NO: 181 (CEGEQDKRLHCYASW – SEQ ID NO:187).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết với epitop chứa các trình tự này hoặc epitop chứa sự tổ hợp của các vùng epitop này.

Do đó, sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết với epitop bao gồm hoặc chứa axit amin 78-83 của SEQ ID NO: 181 (WLDDFN) và axit amin 52-56 của SEQ ID NO: 181 (EQDKR).

Kháng thể được thiết kế và biến đổi

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được điều chế sử dụng kháng thể có một hoặc nhiều trình tự V_H và/hoặc V_L được thể hiện ở đây như nguyên liệu ban đầu để thiết kế kháng thể biến đổi, kháng thể biến đổi có thể mang đặc tính thay đổi so với kháng thể ban đầu. Kháng thể có thể được thiết kế bằng cách thay đổi một hoặc nhiều gốc trong một hoặc cả hai vùng biến đổi (có nghĩa là, V_H và/hoặc V_L), ví dụ, bên trong một hoặc nhiều vùng CDR và/hoặc bên trong một hoặc nhiều vùng khung hoạt động. Ngoài ra hoặc theo phương án khác, kháng thể có thể được thiết kế bằng cách thay đổi gốc bên trong vùng cố định, ví dụ, để thay đổi chức năng phản ứng trả lời kích thích của kháng thể.

Một kiểu thiết kế vùng biến đổi có thể được tiến hành là ghép CDR. Kháng thể tương tác với kháng nguyên đích phần lớn thông qua gốc axit amin nằm trong sáu vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining regions - CDR) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vì lý do này, trình tự axit amin trong CDR đa dạng giữa từng kháng thể hơn so với trình tự bên ngoài CDR. Vì trình tự CDR chịu trách nhiệm cho hầu hết các

tương tác kháng thể-kháng nguyên, có thể biểu hiện kháng thể tái tổ hợp bất chước đặc tính của kháng thể đặc hiệu tự nhiên bằng cách thiết kế vectơ biểu hiện chứa trình tự CDR từ kháng thể tự nhiên cụ thể được ghép vào trình tự khung hoạt động từ kháng thể khác với các đặc tính khác. (xem, ví dụ, Riechmann, L. *et al.*, 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. *et al.*, 1986 Nature 321:522-525; Queen, C. *et al.*, 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Patent Mỹ số 5,225,539 bởi Winter, và U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 to Queen *et al.*).

Do đó, phương án khác theo sáng chế đề cập đến kháng thể kháng ActRIIB đơn dòng phân lập được, hoặc protein chức năng chứa vùng gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi trên chuỗi nặng lần lượt chứa trình tự CDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1-14; trình tự CDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15-28; trình tự CDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 29-42; và vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ lần lượt chứa trình tự CDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 43-56; trình tự CDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 57-70; trình tự CDR3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 71-84. Do đó, kháng thể này chứa trình tự CDR của V_H và V_L của kháng thể đơn dòng, còn có thể chứa trình tự khung hoạt động khác so với kháng thể này.

Trình tự khung hoạt động này có thể thu được từ cơ sở dữ liệu ADN được công bố hoặc tài liệu tham khảo đã công bố bao gồm trình tự gen kháng thể dòng mầm. Ví dụ, trình tự ADN dòng mầm đối với gen vùng biến đổi trên chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm của người "VBase" (có trên Internet ở www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), cũng như trong Kabat, E. A., *et al.*, [nêu trên]; Tomlinson, I. M., *et al.*, 1992 J. mol. Biol. 227:776-798; và Cox, J. P. L. *et al.*, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836.

Ví dụ về trình tự khung sử dụng trong kháng thể theo sáng chế đó là các trình tự tương đồng cấu trúc với trình tự khung sử dụng ở kháng thể được lựa chọn của sáng chế, ví dụ, trình tự liên ứng và/hoặc trình tự khung sử dụng trong kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Trình tự CDR1, 2 và 3 của V_H, và trình tự CDR1, 2 và 3 của V_L, có thể được nối vào vùng khung có trình tự giống hệt như được tìm thấy trong gen globulin

miễn dịch dòng mầm từ đó nhận được trình tự khung, hoặc trình tự CDR có thể được chèn vào vùng khung chứa một hoặc nhiều đột biến so với trình tự dòng mầm. Ví dụ, có thể thấy rằng, trong nhiều trường hợp, việc gây đột biến các gốc trong vùng khung để duy trì hoặc tăng cường ái lực gắn kết kháng nguyên của kháng thể là có ích (xem ví dụ, U.S. Patents. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 và 6,180,370 to Queen *et al*).

Một dạng khác của biến đổi vùng biến đổi là gây đột biến các gốc axit amin trong các vùng CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 của V_H và/hoặc V_L để cải thiện một hoặc nhiều đặc tính gắn kết (ví dụ, ái lực) của kháng thể quan tâm, được biến đổi đến như "làm thành thực ái lực". Đột biến định hướng vị trí hoặc đột biến qua PCR có thể được tiến hành để tạo ra đột biến và tác động lên sự gắn kết kháng thể, hoặc đặc tính chức năng mong muốn, có thể được xác định trong thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* như được mô tả ở đây và được đề xuất trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Sự biến đổi bảo toàn (như được thảo luận ở trên) có thể được đưa vào. Đột biến có thể là thay thế, bổ sung hoặc loại bỏ axit amin. Hơn nữa, điển hình là không nhiều hơn một, hai, ba, bốn hoặc năm gốc trong vùng CDR bị thay đổi.

Do đó, theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng kháng ActRIIB phân lập được, hoặc protein chức năng chứa vùng gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi trên chuỗi nặng có: vùng CDR1 của V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 1-14 hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm sự thay thế, mất hoặc thêm axit amin so với trình tự SEQ ID NO: 1-14; vùng CDR2 của V_H có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15-28, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm sự thay thế, mất hoặc thêm axit amin so với SEQ ID NO: 15-28; vùng CDR3 của V_H có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 29-42, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm sự thay thế, mất hoặc thêm axit amin so với trình tự SEQ ID NO: 29-42; vùng CDR1 của V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 43-56, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm sự thay thế, mất hoặc thêm axit amin so với SEQ ID NO: 43-56; vùng CDR2 của V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 52-70, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm sự thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung axit amin so với SEQ ID NO: 52-70; và vùng CDR3 của V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ

ID NO: 71-84, hoặc trình tự axit amin có một, hai, ba, bốn hoặc năm sự thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung axit amin so với SEQ ID NO: 71-84.

Ghép miền gắn kết kháng nguyên vào khung hoặc khuôn biến đổi

Rất nhiều loại khung hoạt động hoặc khuôn kháng thể/globulin miễn dịch có thể được sử dụng miễn là polypeptit được tạo ra bao gồm ít nhất một vùng gắn kết mà gắn kết đặc hiệu với ActRIIB. Khung hoạt động hoặc khuôn này chứa 5 idiotyp chính của globulin miễn dịch ở người, hoặc mảnh của nó (chẳng hạn như chúng đã được bộc lộ ở đây), và bao gồm globulin miễn dịch của loài động vật khác, ví dụ, có các khía cạnh được làm giống như của người. Kháng thể chuỗi nặng đơn chẳng hạn như các kháng thể được xác định ở lạc đà được quan tâm đặc biệt trong vấn đề này. Khung hoạt động, khuôn và mảnh tiếp tục được khám phá và phát triển bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh, sáng chế dự định tạo ra kháng thể không dựa trên globulin miễn dịch sử dụng khuôn không phải từ globulin miễn dịch trên đó CDR theo sáng chế được ghép vào. Khung hoạt động hoặc khuôn không phải từ globulin miễn dịch đã biết hoặc trong tương lai được sử dụng, miễn là chúng chứa vùng gắn kết đặc hiệu đối với protein đích của SEQ ID NO: 181 (trong nhiều phương án, miền gắn kết phối tử của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 182). Hợp chất này được biết đến ở đây là “polypeptit chứa vùng gắn kết đặc hiệu đích”. Ví dụ về khung hoạt động không phải từ globulin miễn dịch cũng được mô tả ở phần dưới đây (kháng thể lạc đà và khuôn không phải từ kháng thể).

Kháng thể lạc đà

Protein kháng thể thu được từ thành viên của họ lạc đà và lạc đà một bướu (*Camelus bactrianus* và *Camelus dromaderius*) bao gồm các thành viên mới trên thế giới như các loài lạc đà không bướu (*Lama paccos*, *Lama glama* và *Lama vicugna*) được đặc trưng bởi kích thước, sự phức tạp về cấu trúc và tính kháng nguyên với đối tượng là người. Các kháng thể IgG nhất định từ họ động vật có vú này được tìm thấy trong tự nhiên không có chuỗi nhẹ, và do đó khác biệt về cấu trúc với cấu trúc bậc bốn gồm bốn chuỗi điển hình có hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, của các kháng thể của các động vật khác (xem công bố đơn quốc tế số WO94/04678).

Vùng của kháng thể lạc đà mà là miền biến đổi duy nhất nhỏ được xác định là V_{HH} có thể thu được bằng kỹ thuật di truyền để tạo ra protein nhỏ có ái lực cao đối với đích, tạo ra protein được biến đổi từ kháng thể có khối lượng phân tử nhỏ được biết đến là “thể nano của lạc đà” (xem US5,759,808; Stijlemans, B. *et al.*, 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. *et al.*, 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. *et al.* 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. *et al.* 2002 Int J Ung thư 89: 456-62; và Lauwereys, M. *et al.* 1998 EMBO J 17: 3512-3520). Thư viện được thiết kế của kháng thể lạc đà và mảnh kháng thể có sẵn trên thị trường, ví dụ, từ Ablynx, Ghent, Bỉ. So với các kháng thể không có nguồn gốc từ người khác, trình tự axit amin của kháng thể lạc đà có thể được biến đổi tái tổ hợp để thu được trình tự tương tự gần hơn với trình tự của người, có nghĩa là, thể nano có thể được “làm giống như của người”. Do đó, tính kháng nguyên của kháng thể lạc đà có bản chất thấp đối với người có thể được giảm hơn nữa.

Thể nano của lạc đà có trọng lượng phân tử xấp xỉ một phần mười phân tử IgG của người, và protein này có đường kính chỉ vài nanomet. Một hệ quả của kích thước nhỏ là khả năng của thể nano của lạc đà gắn kết với vị trí kháng nguyên mà là không nhìn thấy được về mặt chức năng của các protein kháng thể lớn hơn, nghĩa là, thể nano của lạc đà hữu ích làm thuốc thử phát hiện kháng nguyên mà nếu dùng kỹ thuật miễn dịch học cổ điển sẽ khó phát hiện, và làm chất điều trị có tiềm năng. Do đó, hệ quả khác nữa của kích thước nhỏ là thể nano của lạc đà có thể ức chế như một kết quả của sự gắn kết với vị trí đặc hiệu trong khe hoặc kẽ hẹp của protein đích, và do đó có thể đáp ứng khả năng tương đồng gần về chức năng của thuốc có trọng lượng phân tử thấp cổ điển hơn so với chức năng của kháng thể cổ điển.

Trọng lượng phân tử thấp và kích thước nhỏ gọn cũng làm cho thể nano của lạc đà vô cùng bền nhiệt, bền với độ pH cực đoan và với sự thủy phân bằng protein, và tính kháng nguyên kém. Hệ quả khác là thể nano của lạc đà dễ dàng di chuyển từ hệ tuần hoàn vào mô, và thậm chí vượt qua hàng rào máu não và có thể điều trị rối loạn ảnh hưởng đến mô thần kinh.

Thể nano cũng có thể tạo điều kiện thuận lợi để chuyển thuốc qua hàng rào máu não (xem US2004/0161738). Đặc tính này được kết hợp với tính kháng nguyên thấp với người chỉ ra tiềm năng trị liệu lớn. Ngoài ra, những phân tử này có thể được biểu

hiện đầy đủ trong tế bào sinh vật nhân sơ chẳng hạn như *E. coli* và được biểu hiện như protein dung hợp với thực khuẩn thể và có chức năng.

Do đó, đặc trưng theo sáng chế là kháng thể hoặc thể nano của lạc đà có ái lực cao đối với ActRIIB. Theo các phương án nhất định ở đây, kháng thể hoặc thể nano của lạc đà được tạo ra tự nhiên ở lạc đà, có nghĩa là, được tạo ra ở lạc đà sau khi gây miễn dịch với ActRIIB hoặc mảnh peptit của chúng, sử dụng kỹ thuật đã mô tả ở đây đối với kháng thể khác. Theo một phương án, thể nano lạc đà kháng ActRIIB thiết kế, có nghĩa là, được tạo ra bằng việc lựa chọn ví dụ, từ thư viện thực khuẩn thể biểu lộ thể nano lạc đà đột biến thích hợp sử dụng quy trình sàng lọc với ActRIIB như đích tác động được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế ở đây. Thể nano thiết kế có thể cũng được điều chỉnh bằng kỹ thuật di truyền để có thời gian bán rã trong đối tượng nhận là từ 45 phút đến hai tuần. Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc thể nano của lạc đà thu được bằng cách ghép trình tự CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể của người theo sáng chế vào trình tự khung hoạt động của kháng thể miễn đơn hoặc của nanobody, như được mô tả trong, ví dụ, công bố đơn Patent quốc tế số WO94/04678.

Khuôn không phải từ kháng thể

Khung hoạt động hoặc khuôn không phải từ globulin miễn dịch đã biết bao gồm, nhưng không bị giới hạn trong số, Adnectin (fibronectin) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, Thụy Sĩ), miền kháng thể (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) và Ablynx nv (Zwijnaarde, Bỉ)), lipocalin (Anticalin) (Pieris Proteolab AG, Freising, Đức), được chất miễn dịch chất điều biến nhỏ (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxybody (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Protein A (Affibody AG, Thụy Điển) và affilin (gamma-crystallin hoặc ubiquitin) (Scil Proteins GmbH, Halle, Đức), phân tử bắt chước protein epitop (Polyphor Ltd, Allschwil, Thụy Sĩ).

(i) Khuôn fibronectin

Khuôn fibronectin được dựa trên nhiều phương án về miền fibronectin loại III (ví dụ, mô đun thứ mười của fibronectin loại III (miền 10 Fn3)). Miền fibronectin loại III có 7 hoặc 8 mạch beta được phân bố ở giữa hai tấm beta, tự đóng gói lẫn nhau hình

thành lõi protein, và cũng chứa các cuộn (tương tự CDR) kết nối các mạch beta với nhau và được phơi nhiễm với dung môi. Có ít nhất ba cuộn này ở tại mỗi gờ của kẹp tấm beta, trong đó gờ này là giới hạn của protein vuông góc với hướng của mạch beta (US 6,818,418).

Khuôn có nền là fibronectin không phải là globulin miễn dịch, mặc dù sự toàn bộ sự cuộn gấp có quan hệ gần với sự cuộn gấp của mảnh kháng thể nhỏ nhất có chức năng, vùng biến đổi của chuỗi nặng, mà bao gồm đơn vị nhận biết kháng nguyên toàn vẹn ở IgG lạc đà và lạc đà không bướu. Vì cấu trúc này, kháng thể không phải globulin miễn dịch bắt chước đặc tính gắn kết kháng nguyên tương tự như trong tự nhiên và có ái lực với kháng nguyên của kháng thể. Khuôn này có thể được sử dụng trong sự tạo vòng xoắn ngẫu nhiên và chiến lược dịch chuyển *in vitro* tương tự với quy trình thành thực ái lực của kháng thể *in vivo*. Các phân tử có nền fibronectin này có thể được sử dụng làm khuôn trong đó vùng vòng xoắn của phân tử này có thể được thay thế bằng CDR theo sáng chế sử dụng kỹ thuật tách dòng chuẩn.

(ii) Ankyrin – Thành phần cặp đôi phân tử

Công nghệ dựa trên việc sử dụng protein với các modul lặp lại bắt nguồn từ ankyrin làm khuôn để mang vùng biến đổi có thể được sử dụng để gắn kết với các đích khác nhau. Modul lặp lại ankyrin là polypeptit gồm 33 axit amin bao gồm hai chuỗi xoắn α đối song song và vòng β . Sự gắn kết các vùng biến đổi phần lớn là được tối ưu hóa bằng cách sử dụng biểu lộ ribosom.

(iii) Maxybody/Avime - Avidia

Avime thu được từ miền A trong tự nhiên chứa protein chẳng hạn như LRP-1. Miền này được sử dụng tự nhiên cho tương tác protein-protein và với trên 250 protein của người có cấu trúc dựa trên miền A. Avime chứa một số monome (2-10) “miền A” khác nhau được liên kết bằng mỗi liên kết axit amin. Avime có thể được tạo ra mà có thể gắn kết với kháng nguyên đích sử dụng hệ phương pháp được mô tả trong, ví dụ, US2004/0175756; US2005/0053973; US2005/0048512; và US2006/0008844.

(vi) Protein A – Affibody

Phối tử ái lực Affibody® là protein nhỏ, đơn giản bao gồm một bó xoắn có 3 vòng xoắn dựa trên khuôn của một trong số các miền gắn kết IgG của Protein A. Protein A là protein bề mặt của vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Miền khuôn này chứa 58 axit amin, 13 axit amin được ngẫu nhiên hóa để tạo thư viện Affibody® với lượng lớn các loại phối tử (Xem ví dụ, US 5,831,012). Phân tử Affibody® bắt chước kháng thể, chúng có khối lượng phân tử là 6 kDa, so với khối lượng phân tử của kháng thể là 150 kDa. Mặc dù kích thước nhỏ của nó, phần gắn kết của phân tử Affibody® tương tự với phần gắn kết của kháng thể.

(v) Anticalins – Pieris

Anticalins® là sản phẩm được phát triển bởi công ty Pieris ProteoLab AG. Chúng bắt nguồn từ lipocalin, nhóm phổ biến của protein nhỏ và thường liên quan đến vận chuyển sinh lý hoặc bảo quản hợp chất nhạy cảm hóa học hoặc không hòa tan được. Nhiều lipocalin tự nhiên có ở mô hoặc dịch thể của người.

Kết cấu protein gợi nhớ tới các globulin miễn dịch, với các vòng xoắn siêu biến trên đỉnh của khung hoạt động không linh động. Tuy nhiên, trái ngược với kháng thể hoặc mảnh tái tổ hợp của chúng, lipocalin bao gồm chuỗi polypeptit duy nhất với 160 đến 180 gốc axit amin, chỉ lớn hơn một chút so với miền globulin miễn dịch đơn.

Bộ bốn vòng xoắn, tạo ra bao gắn kết, thể hiện tính mềm dẻo cấu trúc rõ ràng và dung nạp nhiều loại khác nhau của mạch bên. Do đó, phần gắn kết được tái tạo hình lại trong quy trình độc quyền để nhận biết phân tử đích định trước có hình dạng khác nhau với ái lực và tính đặc hiệu cao.

Một protein của họ lipocalin, protein gắn kết bilin (bilin-binding protein (BBP)) của *Pieris brassicae* được sử dụng để phát triển anticalin bằng cách gây đột biến bộ bốn vòng. Một ví dụ của đơn sáng chế mô tả "anticalin" là công bố đơn quốc tế số WO1999/16873.

(vi) Protein Affilin – Scil

Phân tử Affilin™ là protein nhỏ không phải là globulin miễn dịch được thiết kế có ái lực đặc hiệu hướng tới protein và phân tử nhỏ. Phân tử Affilin™ mới có thể được

lựa chọn rất nhanh từ hai thư viện, mỗi thư viện dựa trên protein khuôn bắt nguồn từ người khác nhau.

Phân tử Affilin™ không biểu hiện tính tương đồng về cấu trúc bất kỳ với các protein globulin miễn dịch. Protein Scil tận dụng hai khuôn Affilin™, một trong số chúng là dạng tinh thể gama, protein có cấu trúc thị kính của người và kiểu khác là protein siêu họ "ubiquitin". Cả hai khuôn của người rất nhỏ, có độ bền ở nhiệt độ cao và kháng lại sự thay đổi độ pH và với chất gây biến tính. Sự ổn định cao này phần lớn là do cấu trúc tấm beta được mở rộng của protein. Ví dụ về protein biến đổi dạng tinh thể gama được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO2001/004144 và ví dụ về protein "tương tự ubiquitin" được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO2004/106368.

(vii) Yếu tố bắt chước protein epitop (Protein Epitope Mimetics (PEM))

PEM là phân tử giống như peptit, dạng vòng, kích thước trung bình (trọng lượng phân tử 1-2kDa) bắt chước cấu trúc bậc hai dạng kẹp tóc beta của protein, cấu trúc bậc hai chính này liên quan đến các tương tác protein.

Thiết kế khung hoạt động hoặc Fc

Kháng thể thiết kế theo sáng chế bao gồm kháng thể trong đó các biến đổi được tạo ra với các gốc khung hoạt động trong V_H và/hoặc V_L , ví dụ, để cải thiện đặc tính của kháng thể. Điển hình là, các biến đổi khung hoạt động này được tạo ra để làm giảm khả năng gây đáp ứng miễn dịch của kháng thể. Ví dụ, một phương án là “tạo đột biến trở lại” một hoặc nhiều gốc khung hoạt động thành trình tự dòng mầm tương ứng. Cụ thể hơn, kháng thể trải qua đột biến soma có thể chứa gốc khung hoạt động khác với trình tự dòng mầm sinh mà từ đó kháng thể biến đổi. Các gốc này có thể được nhận biết bằng cách so sánh trình tự khung hoạt động kháng thể với trình tự dòng mầm từ đó kháng thể biến đổi. Để trình tự vùng khung hoạt động trở lại cấu hình dòng mầm của chúng, đột biến soma có thể được “đột biến trở lại” thành trình tự dòng mầm bằng cách, ví dụ, đột biến điểm định hướng hoặc đột biến qua PCR. Kháng thể bị “đột biến trở lại” cũng được bao hàm trong sáng chế.

Một ạng biến đổi khung hoạt động khác liên quan gây đột biến một hoặc nhiều gốc trong vùng khung hoạt động, hoặc thậm chí trong một hoặc nhiều vùng CDR, để

loại bỏ epitop tế bào T để từ đó làm giảm khả năng gây đáp ứng miễn dịch tiềm năng của kháng thể. Phương án này cũng được đề cập đến như là “khử miễn dịch” và được mô tả chi tiết trong US2003/0153043.

Ngoài cách tạo ra biến đổi hoặc thay vào việc tạo ra biến đổi trong vùng khung hoạt động hoặc CDR, kháng thể theo sáng chế có thể được thiết kế để bao gồm các biến đổi trong vùng Fc, điển hình là để thay đổi một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể, như thời gian bán rã của huyết thanh, cố định bổ thể, gắn kết thụ thể Fc, và/hoặc gây độc tế bào phụ thuộc kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được biến đổi về mặt hóa học (ví dụ, một hoặc nhiều gốc hóa học có thể được gắn kết với kháng thể) hoặc được biến đổi để thay đổi sự glycosyl hóa của chúng, thay đổi lần nữa một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể. Mỗi phương án sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Việc đánh số các gốc trong vùng Fc là theo cách đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Theo một phương án, vùng bản lề của CH1 được biến đổi sao cho số lượng gốc xystein trong vùng bản lề này thay đổi, ví dụ, tăng hoặc giảm. Phương án này cũng được mô tả trong US5,677,425. Số lượng gốc xystein trong vùng bản lề của CH1 được thay đổi, ví dụ, tạo điều kiện thuận lợi lắp ráp chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng hoặc làm tăng hoặc giảm tính ổn định của kháng thể.

Theo phương án khác, vùng bản lề Fc của kháng thể bị đột biến để giảm thời gian bán rã sinh học của kháng thể. Cụ thể hơn, một hoặc nhiều đột biến axit amin được đưa vào vùng phân cách của miền CH2-CH3 của mảnh bản lề Fc sao cho kháng thể có gắn kết protein Staphylococcal A (SpA) suy yếu so với gắn kết miền SpA của vùng bản lề Fc. Phương án này cũng được mô tả chi tiết trong US 6,165,745.

Theo phương án khác, kháng thể được biến đổi để làm tăng thời gian bán rã sinh học của nó. Nhiều phương thức là khả thi. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến sau có thể được đưa vào như: T252L, T254S, T256F, như đã mô tả trong US6,277,375. Theo một cách khác, để tăng thời gian bán rã sinh học, kháng thể có thể được biến đổi trong vùng CH1 hoặc CL để chứa epitop gắn kết thụ thể được tạo thành từ hai vòng xoắn của gắn kết với epitop miền CH2 vùng Fc IgG, như được mô tả trong US 5,869,046 và US 6,121,022.

Theo phương án khác nữa, vùng Fc được thay đổi bằng cách thay thế ít nhất một gốc axit amin bằng gốc axit amin khác để thay đổi chức năng phản ứng hiệu ứng của kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có thể bị thay thế bởi gốc axit amin khác sao cho kháng thể thay đổi ái lực đối với phối tử hiệu ứng nhưng giữ lại được khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể gốc. Phối tử hiệu ứng thay đổi ái lực có thể là, ví dụ, thụ thể Fc hoặc thành phần C1 của bổ thể. Phương pháp này được mô tả chi tiết hơn trong US5,624,821 và US5,648,260, đều bởi Winter *et al.* Cụ thể là, gốc 234 và 235 có thể bị đột biến. Cụ thể là, các đột biến này có thể thành alanin. Do đó, theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có sự đột biến trong vùng Fc ở một hoặc cả hai axit amin 234 và 235. Theo phương án khác, một hoặc cả hai axit amin 234 và 235 có thể được thế bằng alanin. Sự thay thế cả hai axit amin 234 và 235 bằng alanin tạo ra hoạt tính ADCC.

Theo phương án khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ các gốc axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác sao cho kháng thể có gắn kết C1q thay đổi và/hoặc làm giảm hoặc loại bỏ gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity -CDC). Phương án này được mô tả chi tiết hơn trong US6,194,551.

Theo phương án khác, một hoặc nhiều gốc axit amin được biến đổi để từ đó thay đổi khả năng kháng thể cố định bổ thể. Phương án này cũng được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO94/29351.

Theo phương án khác nữa, vùng Fc được biến đổi để tăng khả năng của kháng thể trung gian gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc làm tăng ái lực của kháng thể đối với thụ thể Fcγ bằng cách biến đổi một hoặc nhiều axit amin. Phương án này cũng được mô tả trong WO00/42072. Ngoài ra, phần gắn kết cho FcγR1, FcγR2, FcγR3 và FcRn trên IgG1 của người được lập bản đồ và các biến thể có gắn kết cải thiện được mô tả (xem Shields, R.L. *et al.*, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

Cũng theo phương án khác, sự glycosyl hóa kháng thể được biến đổi. Ví dụ, kháng thể aglycosyl hóa có thể được tạo ra (có nghĩa là, kháng thể không glycosyl hóa). Glycosyl hóa có thể được thay đổi để, ví dụ, tăng ái lực của kháng thể đối với

kháng nguyên. Sự biến đổi cacbohydrat này có thể được hoàn thành bằng cách; ví dụ, thay đổi một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong trình tự kháng thể. Ví dụ, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin có thể được tạo ra dẫn đến loại bỏ một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa trong khung hoạt động vùng biến đổi từ đó loại bỏ sự glycosyl hóa ở vị trí đó. Sự aglycosyl hóa này có thể làm tăng ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên. Phương thức này được mô tả chi tiết hơn trong các Patent Mỹ số 5,714,350 và 6,350,861 bởi Co *et al.*

Ngoài ra hoặc theo phương án khác, kháng thể có thể được tạo ra có dạng glycosyl hóa thay đổi, chẳng hạn như kháng thể hypofucosyl hóa có lượng gốc fucosyl giảm hoặc kháng thể có cấu trúc GlcNac phân đôi tăng. Các mẫu glycosyl hóa biến đổi này được chứng minh làm tăng khả năng ADCC của kháng thể. Sự biến đổi cacbohydrat này có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ có bộ máy glycosyl hóa biến đổi. Tế bào có bộ máy glycosyl hóa biến đổi được mô tả trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng làm tế bào chủ trong đó biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế từ đó tạo ra kháng thể glycosyl hóa biến đổi. Ví dụ, EP 1,176,195 bởi Hang *et al.* mô tả dòng tế bào có gen FUT8 bị gián đoạn về mặt chức năng, chúng mã hóa fucosyl transferaza, sao cho kháng thể biểu hiện trong dòng tế bào biểu hiện sự hypofucosyl hóa. Do đó, theo một phương án, kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng biểu hiện tái tổ hợp trong dòng tế bào mà biểu hiện mẫu hypofucosyl hóa, ví dụ, dòng tế bào động vật có vú biểu hiện không hiệu quả gen FUT8 mã hóa fucosyltransferaza. Công bố đơn quốc tế số WO03/035835 mô tả dòng tế bào CHO biến thể, tế bào Lec13, khả năng gắn fucoza với cacbohydrat liên kết với Asn(297), cũng dẫn đến quá trình hypofucosyl hóa kháng thể được biểu hiện trong tế bào chủ đó (cũng xem Shields, R.L. *et al.*, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Công bố đơn quốc tế WO99/54342 mô tả dòng tế bào được thiết kế để biểu hiện glycoprotein biến đổi glycosyl transferaza (ví dụ, beta(1,4)-N acetylglucosaminyltransferaza III (GnTIII)) sao cho kháng thể biểu hiện trong dòng tế bào được thiết kế tăng cấu trúc GlcNac phân đôi, điều này là tăng hoạt tính ADCC của kháng thể (xem Umana *et al.*, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180). Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất trong nấm men hoặc nấm sợi được thiết kế cho kiểu glycosyl hóa tương tự động vật có vú, và khả năng điều chế kháng thể thiếu fucoza như kiểu glycosyl hóa (xem, ví dụ, EP1297172B1).

Sự biến đổi khác của kháng thể gây bất ngờ theo sáng chế là sự pegyl hóa. Kháng thể có thể bị pegyl hóa để, ví dụ, làm tăng thời gian bán rã sinh học (ví dụ, huyết thanh) của kháng thể. Để pegyl hóa kháng thể, kháng thể hoặc mảnh của nó, thường được cho phản ứng với polyetylen glycol (PEG), ví dụ, este hoặc dẫn xuất aldehyt của PEG phản ứng lại, dưới điều kiện trong đó một hoặc nhiều nhóm PEG trở nên được gắn kết với kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Sự pegyl hóa có thể được tiến hành bằng phản ứng axyl hóa hoặc phản ứng alkyl hóa với phân tử PEG phản ứng (hoặc polyme hòa tan trong nước có khả năng phản ứng lại tương đương). Được sử dụng ở đây, thuật ngữ "polyetylen glycol" được mong đợi chứa bất kỳ dạng PEG nào có thể được sử dụng để tạo ra protein khác, như mono (C1-C10) alkoxy- hoặc aryloxy-polyetylen glycol hoặc polyetylen glycol-maleimit. Theo nhiều phương án, kháng thể bị pegyl hóa là kháng thể aglycosyl hóa. Phương pháp pegyl hóa protein được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được áp dụng cho kháng thể theo sáng chế (xem ví dụ, EP0154316 và EP0401384).

Sự biến đổi khác của kháng thể gây bất ngờ bởi sáng chế là sự kết hợp hoặc dung hợp protein của ít nhất vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế với protein huyết thanh, ví dụ, albumin huyết thanh người hoặc mảnh của chúng để tăng thời gian bán rã của phân tử được tạo ra (xem, ví dụ, EP0322094).

Khả năng khác là dung hợp ít nhất vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế với protein có khả năng gắn kết với protein huyết thanh, như albumin huyết thanh người để tăng thời gian bán rã của phân tử tạo ra (xem, ví dụ, EP0486525).

Phương pháp thiết kế kháng thể thay đổi

Như đã thảo luận ở trên, kháng thể kháng, ActRIIB có trình tự V_H và V_L hoặc trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ được thể hiện ở đây có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng ActRIIB mới bằng cách biến đổi trình tự chuỗi nặng và/hoặc trình tự chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, trình tự V_H và/hoặc V_L , hoặc vùng cố định được đính kèm theo đó. Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, đặc trưng cấu trúc của kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế được sử dụng để tạo kháng thể kháng ActRIIB liên quan đến cấu trúc mà giữ lại ít nhất một đặc tính chức năng của

kháng thể theo sáng chế, chẳng hạn như gắn kết với ActRIIB của người nhưng cũng ức chế một hoặc nhiều đặc tính chức năng của ActRIIB (ví dụ, ức chế sự hoạt hóa Smad).

Ví dụ, một hoặc nhiều vùng CDR của kháng thể theo sáng chế, hoặc đột biến của chúng, có thể được kết hợp tái tổ hợp với vùng khung hoạt động đã biết và/hoặc CDR khác để tạo kháng thể bổ sung, thiết kế tái tổ hợp, kháng ActRIIB theo sáng chế, như thảo luận ở trên. Cách biến đổi khác bao gồm các cách đã được mô tả trong phần trên. Nguyên liệu ban đầu cho phương pháp thiết kế là một hoặc nhiều trình tự V_H và/hoặc V_L được đề xuất ở đây, hoặc một hoặc nhiều vùng CDR của chúng. Để tạo kháng thể được thiết kế, không thực sự cần điều chế thực sự (có nghĩa là, biểu hiện protein) kháng thể có một hoặc nhiều trình tự V_H và/hoặc V_L được đề xuất ở đây, hoặc một hoặc nhiều vùng CDR của chúng. Hơn nữa, thông tin trong trình tự này được sử dụng làm vật liệu ban đầu để tạo trình tự “thể hệ thứ hai” được biến đổi từ trình tự gốc và sau đó trình tự “thể hệ thứ hai” được điều chế và biểu hiện dưới dạng protein.

Do đó, theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể kháng ActRIIB bao gồm: trình tự kháng thể vùng biến đổi trên chuỗi nặng có trình tự CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1-14, trình tự CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15-28 và/hoặc trình tự CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 29-42; và trình tự kháng thể vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ có trình tự CDR1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 43-56, trình tự CDR2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 57-70 và/hoặc trình tự CDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 71-84; thay đổi ít nhất một gốc axit amin trong trình tự kháng thể vùng biến đổi trên chuỗi nặng và/hoặc trình tự kháng thể vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ để tạo ít nhất một trình tự kháng thể được biến đổi; và biểu hiện trình tự kháng thể được biến đổi thành protein.

Do đó, theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp để điều chế kháng thể kháng ActRIIB được tối ưu hóa để biểu hiện trong tế bào động vật có vú bao gồm: trình tự kháng thể chuỗi nặng có độ dài đầy đủ có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 146-150 và 156-160; và trình tự kháng thể chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ có trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 141-145 và 151-155; thay đổi ít nhất một gốc axit amin trong trình tự kháng thể chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và/hoặc

trình tự kháng thể chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ để tạo ra ít nhất một trình tự kháng thể được biến đổi; và biểu hiện trình tự kháng thể được biến đổi thành protein.

Trình tự kháng thể biến đổi cũng có thể được tạo ra bằng cách sàng lọc thư viện kháng thể có trình tự CDR3 cố định được chọn trong số các nhóm bao gồm SEQ ID NO: 29-42 và SEQ ID NO: 71-84 hoặc phần quyết định gắn kết cần thiết tối thiểu như được mô tả trong US2005/0255552 và tính đa dạng trong trình tự CDR1 và CDR2. Sàng lọc có thể được thực hiện theo kỹ thuật sàng lọc thích hợp bất kỳ để sàng lọc kháng thể từ thư viện kháng thể, chẳng hạn như kỹ thuật trình diện thực khuẩn thể.

Kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn có thể được sử dụng để điều chế và biểu hiện trình tự kháng thể biến đổi. Kháng thể được mã hóa bởi trình tự kháng thể biến đổi là kháng thể giữ lại một, một vài hoặc tất cả đặc tính chức năng của kháng thể kháng ActRIIB được mô tả ở đây, trong đó đặc tính chức năng này bao gồm, nhưng không bị giới hạn với, gắn kết đặc hiệu với ActRIIB của người và ức chế hoạt hóa Smad.

Kháng thể được biến đổi có thể biểu hiện một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, hoặc ba hoặc lớn hơn đặc tính chức năng được thảo luận ở trên.

Đặc tính chức năng kháng thể được biến đổi có thể được xác định sử dụng thử nghiệm tiêu chuẩn sẵn có trong lĩnh vực này và/hoặc được mô tả ở đây, chẳng hạn như các thử nghiệm đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (ví dụ, ELISA).

Theo nhiều phương án nhất định của phương pháp thiết kế kháng thể theo sáng chế, đột biến có thể được đưa vào ngẫu nhiên hoặc chọn lọc trên toàn bộ hoặc một phần trình tự mã hóa kháng thể kháng ActRIIB và kháng thể kháng ActRIIB biến đổi được tạo ra có thể được sàng lọc về hoạt tính gắn kết và/hoặc đặc tính chức năng khác như đã mô tả ở đây. Phương pháp đột biến được mô tả trong lĩnh vực này. Ví dụ, công bố đơn quốc tế WO02/092780 đề cập đến phương pháp tạo và sàng lọc đột biến kháng thể sử dụng đột biến gen bão hòa, lắp ráp lai tổng hợp, hoặc sự kết hợp chúng. Theo cách khác, công bố đơn quốc tế WO03/074679 mô tả phương pháp sử dụng phương pháp sàng lọc tính toán để tối ưu hóa đặc tính hóa lý của kháng thể.

Phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể theo sáng chế.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế. Ví dụ về trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ tối ưu hóa biểu hiện trong tế bào động vật có vú được thể hiện ở trình tự SEQ ID NO: 161-165 và 171-175. Ví dụ về trình tự nucleotit của chuỗi nặng có độ dài đầy đủ tối ưu hóa biểu hiện trong tế bào động vật có vú được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 166-170 và 176-180.

Axit nucleic có thể có trong toàn bộ tế bào, trong dịch ly giải tế bào, hoặc có thể là axit nucleic được tinh chế ở dạng tinh sạch một phần hoặc gần như tinh sạch. Axit nucleic "phân lập được" hoặc "được lọc gần như là tinh sạch" khi được tinh sạch khỏi các thành phần tế bào hoặc tạp chất khác ví dụ, axit nucleic hoặc protein khác của tế bào, bằng kỹ thuật tiêu chuẩn, bao gồm xử lý alkalin/SDS, tạo băng CsCl, sắc ký cột, điện di gel agarosa và phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Xem, F. Ausubel, *et al.*, ed. 1987 *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing và Wiley Interscience, New York. Axit nucleic theo sáng chế có thể là, ví dụ, ADN hoặc ARN hoặc có thể hoặc không chứa trình tự intron. Theo một phương án, axit nucleic là phân tử ADN. Axit nucleic có thể có trong vector như vector trình diện thực khuẩn thể, hoặc trong vector plasmid tái tổ hợp. Sáng chế cũng đề xuất vector được đề cập đến như pBW522 và pBW524 (đăng ký ở DSMZ, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Đức vào 18/08/2009 với số đăng ký lần lượt là DSM22873 và DSM22874).

Axit nucleic theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Đối với kháng thể được biểu hiện bằng tế bào lai (ví dụ, tế bào lai được tạo ra từ chuột chuyển gen mang gen globulin miễn dịch của người như được mô tả dưới đây), cADN mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật tế bào lai có thể thu được bằng khuếch đại PCR tiêu chuẩn hoặc kỹ thuật tách dòng cADN. Đối với kháng thể thu được từ thư viện gen globulin miễn dịch (ví dụ, sử dụng kỹ thuật trình diện thực khuẩn thể), axit nucleic mã hóa kháng thể có thể được thu lại từ nhiều dòng thực khuẩn thể đa dạng là thành viên của thư viện.

Cũng được bao gồm trong phạm vi sáng chế là trình tự axit nucleic biến thể bao gồm một hoặc nhiều sự xóa bỏ, thêm hoặc thay thế. Theo một phương án, sáng chế

bao gồm một hoặc nhiều trình tự SEQ ID NO: 113-140 hoặc 161-180, trình tự này chứa sự thể nucleotit bảo toàn. Do sự thoái hóa của mã di truyền, axit amin có thể được mã hóa bởi một hai nhiều condon. Do đó, có khả năng thay đổi trình tự nucleotit, trong khi trình tự axit amin được dịch mã vẫn không đổi.

Khi mảnh ADN mã hóa các mảnh V_H và V_L thu được, đoạn ADN này có thể còn được điều biến bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn, ví dụ, chuyển gen vùng biến đổi thành gen chuỗi kháng thể có độ dài đầy đủ, thành gen mảnh Fab hoặc thành gen scFv. Trong các điều biến này, mảnh ADN mã hóa V_L hoặc V_H được liên kết hoạt động với phân tử ADN khác, hoặc với mảnh mã hóa protein khác, chẳng hạn như vùng cố định kháng thể hoặc phần tử nối linh hoạt. Thuật ngữ "liên kết hoạt động", như được sử dụng trong tình huống này, nhằm có nghĩa là hai đoạn ADN được kết hợp theo cách có thể hoạt động, ví dụ, sao cho trình tự axit amin được mã hóa bởi hai mảnh AND vẫn đúng khung đọc, hoặc sao cho protein được biểu hiện dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu mong muốn.

ADN phân lập được mã hóa vùng V_H có thể được chuyển thành gen chuỗi nặng có độ dài đầy đủ bằng cách liên kết điều khiển hoạt động ADN mã hóa V_H với phân tử ADN khác mã hóa vùng cố định chuỗi nặng (CH1, CH2 và CH3). Trình tự gen vùng cố định chuỗi nặng của người được biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ, Kabat, E. A., *et al.* [nêu trên]) và các mảnh ADN bao gồm các vùng này có thể thu được bằng khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng cố định chuỗi nặng có thể là vùng cố định IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM hoặc IgD. Theo một số phương án, vùng cố định chuỗi nặng được chọn trong số các isotyp IgG1. Đối với gen mảnh Fab chuỗi nặng, ADN mã hóa V_H có thể được liên kết điều khiển hoạt động với phân tử ADN khác chỉ mã hóa vùng cố định CH1 chuỗi nặng.

ADN phân lập được mã hóa vùng V_L có thể được chuyển thành gen chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ (cũng như thành gen Fab chuỗi nhẹ) bằng cách liên kết điều khiển hoạt động ADN mã hóa V_L với phân tử ADN khác mã hóa vùng cố định chuỗi nhẹ, CL. Trình tự gen vùng cố định chuỗi nhẹ người được biết đến trong lĩnh vực này (xem ví dụ, Kabat, E. A., *et al.* [nêu trên]) và đoạn ADN gắn kết với vùng này có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR tiêu chuẩn. Vùng cố định chuỗi nhẹ có thể là vùng cố định kappa hoặc lamda.

Để tạo gen scFv, mảnh ADN mã hóa V_H và V_L liên kết điều khiển hoạt động với mảnh khác mã hóa phần tử gắn kết linh động, ví dụ, mã hóa trình tự axit amin (Gly4-Ser)₃, sao cho trình tự V_H và V_L có thể được biểu hiện dưới dạng protein đơn chuỗi kề nhau, với vùng V_L và V_H được kết hợp bằng phần tử gắn kết linh động (xem ví dụ, Bird *et al.*, 1988 Science 242:423-426; Huston *et al.*, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, 1990 Nature 348:552-554).

Axit nucleic theo sáng chế có thể được sử dụng trong việc vận chuyển gen. Đó là, axit nucleic mã hóa polypeptit (kháng thể hoặc protein chức năng) theo sáng chế có thể được vận chuyển trực tiếp đến bệnh nhân để dịch mã ở bệnh nhân.

Axit nucleic đặc trưng là "được đóng gói" để sử dụng cho bệnh nhân. Chất dẫn vận chuyển gen có thể không phải là virus chẳng hạn như liposom, hoặc virus hổng chức năng tái bản, chẳng hạn như adenovirus được mô tả bởi Berkner, K.L., trong Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992) hoặc vector virus kết hợp adeno (adeno- (AAV) như được mô tả bởi Muzyczka, N., trong Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158, 97-129 (1992) và Patent Mỹ số 5,252,479. Theo cách khác, retrovirus chẳng hạn như lentivirus có thể được sử dụng. Ví dụ, phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit theo sáng chế có thể được thiết kế biểu hiện trong vector retrovirus hổng chức năng tái bản. Sau đó, cấu trúc biểu hiện này có thể được phân lập và đưa vào tế bào đóng gói được chuyển đổi với vector plasmit retrovirus chứa ARN mã hóa polypeptit, sao cho tế bào đóng gói sản xuất hạt virus xâm nhiễm chứa gen mong muốn. Tế bào sản xuất này có thể được dùng cho đối tượng để thiết kế tế bào *in vivo* và biểu hiện polypeptit *in vivo* (xem chương 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (và tài liệu tham khảo được viện dẫn ở đây) trong Human Molecular Genetics (1996), T Strachan và A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd).

Một phương thức khác là sử dụng "ADN trần" trong đó gen điều trị được tiêm trực tiếp vào mạch máu hoặc mô cơ.

Sản xuất kháng thể đơn dòng theo sáng chế

Kháng thể đơn dòng (mAb) có thể được điều chế bằng nhiều loại kỹ thuật, bao gồm hệ phương pháp kháng thể đơn dòng thông thường ví dụ, kỹ thuật lai tế bào sinh

đường tiêu chuẩn của Kohler và Milstein (1975 Nature 256: 495). Nhiều kỹ thuật để sản xuất kháng thể đơn dòng có thể được áp dụng ví dụ, biến nạp virus hoặc gen gây ung thư của tế bào lympho B.

Hệ thống động vật sản xuất tế bào lai là hệ thống chuột. Sản xuất tế bào lai trong chuột là quy trình được thiết lập rõ. Quy trình gây miễn dịch và kỹ thuật phân lập tế bào lá lách miễn dịch để dung hợp đã biết trong lĩnh vực này. Các phân dung hợp (ví dụ, tế bào u tủy chuột) và quy trình dung hợp cũng đã được biết đến.

Kháng thể khảm hoặc được làm giống như của người theo sáng chế có thể được điều chế dựa vào trình tự kháng thể đơn dòng chuột như được mô tả ở trên. ADN mã hóa globulin miễn dịch chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể nhận được từ tế bào lai chuột quan tâm và được thiết kế để chứa trình tự globulin miễn dịch không phải chuột (ví dụ, người) sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Ví dụ, để tạo kháng thể khảm, vùng biến đổi chuột có thể được gắn kết với vùng cố định của người sử dụng kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ, US4,816,567). Để tạo kháng thể được làm giống như của người, vùng CDR của chuột có thể được chèn vào khung hoạt động của người sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem ví dụ, các patent Mỹ số 5225539; 5530101; 5585089; 5,693,762 và 6,180,370).

Theo phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng của người. Kháng thể đơn dòng của người này định hướng kháng ActRIIB có thể được tạo ra sử dụng chuột chuyển gen hoặc chuyển nhiễm sắc thể mang các phần của hệ miễn dịch của người hơn là mang các phần của hệ miễn dịch chuột. Chuột chuyển gen và chuyển nhiễm sắc thể này bao gồm chuột được đề cập ở đây lần lượt là chuột HuMAb và KM, và được đề cập chung ở đây là "Ig chuột của người".

HuMAb mouse[®] (Medarex, Inc.) chứa các locut nhỏ gen globulin miễn dịch của người mã hóa trình tự globulin miễn dịch chuỗi nặng của người không được sắp xếp lại (μ và γ) và chuỗi nhẹ κ , cùng với đột biến nhắm đích không hoạt hóa các locut chuỗi μ và κ nội sinh (xem ví dụ, Lonberg, *et al.*, 1994 Nature 368(6474): 856-859). Do đó, chuột thể hiện sự biểu hiện IgM hoặc κ của chuột giảm, và đáp ứng với sự miễn dịch, gen chuyển chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào trải qua chuyển đổi lớp và đột biến soma tạo ra đơn dòng IgGk của người ái lực cao (Lonberg,

N. *et al.*, 1994 [nêu trên]; được xem xét trong Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. và Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol.13: 65-93, và Harding, F. và Lonberg, N., 1995 Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546). Điều chế và sử dụng chuột HuMAb, và biến đổi hệ gen được tiến hành ở chuột này, cũng đã được mô tả bởi Taylor, L. *et al.*, 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. *et al.*, 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaillon *et al.*, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi *et al.*, 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. *et al.*, 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon *et al.*, 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.*, 1994 International Immunology 579-591; và Fishwild, D. *et al.*, 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851, nội dung của tất cả các tài liệu ở đây được kết hợp bằng cách tham khảo toàn bộ. Ngoài ra, xem, các patent Mỹ số 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,770,429; và 5,545,807; cũng như các công bố đơn quốc tế số WO92/103918, WO93/12227, WO94/25585, WO97/113852, WO98/24884; WO99/45962; và WO01/14424.

Theo phương án khác, kháng thể của người theo sáng chế có thể được làm tăng lên bằng cách sử dụng chuột mang trình tự globulin miễn dịch của người trên gen chuyển và nhiễm sắc thể chuyển chẳng hạn như chuột mang gen chuyển chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển mang chuỗi nhẹ của người. Chuột này, được đề cập ở đây dưới dạng “chuột KM”, được mô tả chi tiết trong công bố đơn quốc tế số WO02/43478.

Ngoài ra, hệ động vật chuyển gen khác biểu hiện gen globulin miễn dịch của người có sẵn trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để tăng kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế. Ví dụ, hệ thống chuyển gen khác được đề cập đến như Xenomouse (Abgenix, Inc.) có thể được sử dụng. Chuột này được mô tả trong, ví dụ, các patent Mỹ số 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 và 6,162,963.

Hơn nữa, hệ thống động vật chuyển nhiễm sắc thể khác biểu hiện gen globulin miễn dịch của người có sẵn trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để tạo kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế. Ví dụ, chuột mang cả nhiễm sắc thể chuyển chuỗi nặng của người và nhiễm sắc thể chuyển chuỗi nhẹ của người, được đề cập đến như “chuột TC” có thể được sử dụng; chuột này được mô tả trong Tomizuka *et al.*, 2000

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Ngoài ra, bò mang nhiễm sắc thể chuyển chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được mô tả trong lĩnh vực này (Kuroiwa *et al.*, 2002 Nature Biotechnology 20:889-894) và có thể sử dụng để làm tăng kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế.

Kháng thể tái tổ hợp của người theo sáng chế có thể cũng được điều chế sử dụng phương pháp trình diện thực khuẩn thể để sàng lọc thư viện gen globulin miễn dịch của người. Phương pháp trình diện thực khuẩn thể này để phân lập kháng thể của người đã được thiết lập trong lĩnh vực này hoặc được mô tả ở phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Xem ví dụ: các patent Mỹ số 5,223,409; 5,403,484; 5,571,698; 5,427,908; 5,580,717; 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 và 6,593,081.

Kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế cũng có thể được điều chế sử dụng chuột SCID mà bên trong đó tế bào miễn dịch của người được tái kết cấu sao cho đáp ứng kháng thể của người có thể được tạo ra trong lúc gây miễn dịch. Chuột này được mô tả trong, ví dụ, các patent Mỹ số 5,476,996 và 5,698,767.

Tạo ra tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng của người

Để tạo ra tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế, tế bào lá lách và/hoặc tế bào hạch bạch huyết của chuột được gây miễn dịch có thể được phân lập và dung hợp với dòng tế bào bất tử thích hợp, như dòng tế bào u tủy chuột. Tế bào lai tạo ra có thể được sàng lọc để sản xuất kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Ví dụ, dịch huyền phù tế bào duy nhất của tế bào bạch huyết có nguồn gốc từ lá lách chuột được gây miễn dịch có thể được dung hợp với 1/6 lượng tế bào u tủy chuột không tiết Ag8.563-P3X63 (ATCC, CRL 1580) với 50% PEG. Tế bào được trải ở nồng độ xấp xỉ 2×10^5 trong đĩa vi lượng đáy phẳng, sau đó ủ trong hai tuần trong môi trường chọn lọc chứa 20% huyết thanh nhau thai vô tính, 18% môi trường điều kiện "653", 5% origen (IGEN), L-glutamin nồng độ 4mM, natri pyruvat nồng độ 1mM, HEPES nồng độ 1mM, 2-mercaptoetanol nồng độ 0.055mM, 50 đơn vị/ml penixilin, 50mg/ml streptomycin, 50mg/ml gentamycin và 1×HAT (Sigma; HAT được bổ sung sau khi dung hợp 24 giờ). Sau khoảng hai tuần, tế bào có thể được nuôi cấy trong môi trường trong đó HAT được thay thế bằng HT. Sau đó, các giếng riêng biệt có thể được

sàng lọc bằng ELISA đối với kháng thể IgM và IgG đơn dòng của người. Khi diễn ra sự tăng trưởng tế bào lai với số lượng lớn, môi trường nuôi cấy có thể được quan sát sau 10-14 ngày. Tế bào lai tiết kháng thể có thể được trải lại, sàng lọc lại và nếu vẫn dương tính đối với IgG người, kháng thể đơn dòng có thể được tách dòng ít nhất hai lần bằng cách pha loãng giới hạn. Sau đó, phân dòng ổn định có thể được nuôi cấy *in vitro* để tạo lượng nhỏ kháng thể trong môi trường nuôi cấy mô để xác định đặc tính.

Để tinh sạch kháng thể đơn dòng của người, tế bào lai được chọn có thể được tăng trưởng trong bình thót cổ 2 lít lắc quay để tinh sạch kháng thể đơn dòng. Dịch huyền phù có thể được lọc và cô đặc trước khi sắc ký ái lực với protein A-sepharosa (Pharmacia). IgG rửa giải có thể được kiểm tra bằng điện di gel và sắc ký lỏng hiệu năng cao để đảm bảo độ tinh sạch. Dung dịch đậm có thể được đổi thành PBS, và nồng độ có thể được xác định bởi OD₂₈₀ bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ mol 1,43. Kháng thể đơn dòng có thể được phân ước và bảo quản ở -80°C.

Tạo tế bào chuyển nhiễm sản xuất kháng thể đơn dòng

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sản xuất trong tế bào chủ là tế bào chuyển nhiễm sử dụng, ví dụ, kết hợp kỹ thuật ADN tái tổ hợp và phương pháp chuyển nhiễm gen đã được biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Ví dụ, để biểu hiện kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ hoặc một phần, có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn (ví dụ, khuếch đại PCR hoặc tách dòng cADN sử dụng tế bào lai biểu hiện kháng thể quan tâm) và ADN có thể được chèn vào vector biểu hiện sao cho gen này liên kết điều khiển hoạt động với các trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã. Trong trường hợp này, thuật ngữ "liên kết điều khiển hoạt động" nhằm để chỉ gen kháng thể được nối vào vector sao cho trình tự kiểm soát phiên mã và dịch mã trong vector cung cấp chức năng đã định của chúng để điều hòa phiên mã và dịch mã của gen kháng thể. Vector biểu hiện và trình tự kiểm soát biểu hiện được chọn để tương thích với tế bào chủ biểu hiện được sử dụng. Gen chuỗi nhẹ kháng thể và gen chuỗi nặng của kháng thể có thể được chèn vào trong các vector riêng hoặc, điển hình hơn, cả hai gen được chèn vào trong cùng một vector biểu hiện. Gen kháng

thể được chèn vào vector biểu hiện bằng phương pháp tiêu chuẩn (ví dụ, nối vị trí giới hạn bổ sung trên mảnh gen kháng thể và vector, hoặc nối đầu bằng nếu không có vị trí giới hạn). Vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được mô tả ở đây có thể được sử dụng để tạo gen kháng thể có độ dài đầy đủ của isotyp kháng thể bất kỳ bằng cách chèn chúng vào vector biểu hiện mã hóa sẵn vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ của isotyp kháng thể mong muốn sao cho mảnh V_H liên kết điều khiển hoạt động với đoạn CH trong vector và đoạn V_L được liên kết điều khiển hoạt động với đoạn CL trong vector. Ngoài ra hoặc theo một cách khác, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể mã hóa peptit tín hiệu tạo thuận lợi tiết chuỗi kháng thể từ tế bào chủ. Gen chuỗi kháng thể có thể được tách dòng vào vector sao cho peptit tín hiệu được liên kết đúng vào khung đọc ở đầu amino của gen chuỗi kháng thể. Peptit tín hiệu có thể là peptit tín hiệu globulin miễn dịch hoặc peptit tín hiệu khác loại (có nghĩa là, peptit tín hiệu từ protein không phải là globulin miễn dịch).

Bên cạnh gen chuỗi kháng thể, vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế mang trình tự điều hòa kiểm soát biểu hiện gen chuỗi kháng thể trong tế bào chủ. Thuật ngữ "trình tự điều hòa" nhằm bao gồm trình tự promoter, trình tự tăng cường và yếu tố kiểm soát biểu hiện khác (ví dụ, tín hiệu polyadenin hóa) mà kiểm soát phiên mã hoặc dịch mã gen chuỗi kháng thể. Trình tự điều hòa này được mô tả, ví dụ, trong Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990). Sẽ được đánh giá cao bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này rằng việc thiết kế vector, bao gồm lựa chọn trình tự điều hòa, có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự lựa chọn tế bào chủ được biến nạp, mức độ biểu hiện protein mong muốn, v.v. Trình tự điều hòa để biểu hiện tế bào chủ động vật có vú bao gồm các yếu tố virus mà hướng đến biểu hiện protein mức độ cao trong tế bào động vật có vú, chẳng hạn như promoter và/hoặc trình tự tăng cường thu được từ cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus (ví dụ, promoter của adenovirus hoạt động chủ yếu ở pha muộn-AdMLP)), và polyoma. Theo một cách khác, trình tự điều hòa không phải virus có thể được sử dụng, ví dụ, promoter ubiquitin hoặc promoter P-globin. Ngoài ra, yếu tố điều hòa được cấu tạo từ các nguồn khác nhau, chẳng hạn như hệ thống promoter SRA, mà chứa trình tự từ promoter sớm của SV40 và trình tự lặp lại đuôi dài của virus loại 1 gây bệnh bạch cầu tế bào T ở người (Takebe, Y. *et al.*, 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Bên cạnh gen chuỗi kháng thể và trình tự điều hòa, vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể mang trình tự bổ sung, chẳng hạn như, trình tự điều hòa tái bản vector trong tế bào chủ (ví dụ, gốc tái bản) và gen đánh dấu có thể chọn lọc. Gen đánh dấu có thể chọn lọc thúc đẩy chọn lọc tế bào chủ mà trong đó vector được đưa vào (xem, ví dụ, các patent Mỹ số 4,399,216, 4,634,665 và 5,179,017). Ví dụ, điển hình là gen đánh dấu có thể chọn lọc cung cấp sự kháng thuốc, chẳng hạn như G418, hygromycin hoặc metotrexat, trên tế bào chủ mà trong đó vector được đưa vào. Gen đánh dấu có thể chọn lọc được bao gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) (để sử dụng trong tế bào chủ dhfr với sự chọn lọc/khuếch đại metotrexat) và gen neo (đối với lựa chọn G418).

Đối với sự biểu hiện chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vector biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chuyển nhiễm vào tế bào chủ bằng kỹ thuật tiêu chuẩn. Nhiều dạng khác nhau của thuật ngữ "chuyển nhiễm" nhằm bao hàm rất nhiều loại kỹ thuật được sử dụng phổ biến để đưa ADN ngoại lai vào trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân thực ví dụ, xung điện, kết tủa canxi-phosphat, chuyển nhiễm DEAE-dextran và tương tự. Trên lý thuyết có thể biểu hiện kháng thể theo sáng chế trong tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân thực. Việc biểu hiện kháng thể trong tế bào nhân thực, và cụ thể là ở tế bào động vật có vú, có khả năng hơn so với sự lắp ráp và tiết ra kháng thể cuộn gập đúng và có hoạt tính miễn dịch. Biểu hiện gen kháng thể ở tế bào nhân sơ được công bố là không có hiệu quả trong sản xuất năng suất cao kháng thể có hoạt tính (Boss, M. A. và Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13).

Tế bào chủ động vật có vú biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm buồng trứng chuột Hamster Trung Quốc (tế bào CHO-Chinese Hamster Ovary)) (bao gồm tế bào CHO dhfr, được mô tả bởi Urlaub và Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 sử dụng với chất đánh dấu có khả năng chọn lọc DHFR, ví dụ, như được mô tả trong R.J. Kaufman và P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621), tế bào u tủy NSO, tế bào COS và tế bào SP2. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào CHO K1PD. Cụ thể, để sử dụng với tế bào u tủy NSO, hệ thống biểu hiện khác là hệ thống biểu hiện gen GS được bộc lộ trong các công bố đơn quốc tế số WO87/04462, WO89/01036 và EP 338,841. Theo một phương án, tế bào chủ động vật có vú biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm dòng tế bào động vật có vú

suỵ giảm biểu hiện gen FUT8, ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số US6,946,292B2. Khi vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa gen kháng thể được đưa vào trong tế bào chủ động vật có vú, kháng thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong thời gian đủ để cho phép biểu hiện kháng thể trong tế bào chủ hoặc tiết kháng thể vào môi trường tế bào chủ sinh trưởng. Kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy sử dụng phương pháp tinh sạch protein tiêu chuẩn.

Thể liên hợp miễn dịch

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả đặc trưng kháng thể kháng ActRIIB, hoặc mảnh của chúng, liên hợp với gốc có khả năng điều trị, ví dụ, chất độc tế bào, thuốc (ví dụ, thuốc ức chế miễn dịch) hoặc chất độc phóng xạ. Liên hợp này đề cập đến ở đây dưới dạng "liên hợp miễn dịch". Liên hợp miễn dịch bao gồm một hoặc nhiều chất độc tế bào được đề cập đến như là "chất độc miễn dịch". Chất độc tế bào hoặc chất gây độc tế bào bao gồm chất bất kỳ gây thiệt hại (ví dụ, tiêu diệt) tế bào.

Chất gây độc tế bào có thể liên hợp với kháng thể theo sáng chế sử dụng công nghệ phần tử nối có sẵn trong lĩnh vực này. Ví dụ về các loại phần tử liên kết được sử dụng để liên hợp chất độc tế bào với kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn với, hydrazon, thioete, este, disulfua và phần tử nối chứa peptit. Phần tử nối có thể được lựa chọn để, ví dụ, nhạy cảm phân cắt bởi pH thấp trong ngăn tiêu thể lyzosom hoặc nhạy cảm phân cắt bởi proteaza, chẳng hạn như các proteaza, theo nhiều phương án, được biểu hiện trong mô ung thư chẳng hạn như cathepsin (ví dụ, cathepsin B, C, D).

Thảo luận tiếp về các loại chất độc tế bào, phần liên kết và phương pháp liên hợp chất điều trị với kháng thể, cũng xem trong Saito, G. *et al.*, 2003 Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. *et al.*, 2003 Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. 2003 Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M., 2002 Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. và Kreitman, R. J., 2002 Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. và Springer, C.J., 2001 Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được liên hợp với isotop có hoạt tính phóng xạ để tạo ra dược chất phóng xạ gây độc tế bào, cũng được coi là thể liên hợp miễn dịch phóng xạ. Ví dụ về đồng vị phóng xạ có thể được liên hợp với kháng thể để sử dụng chẩn đoán hoặc điều trị, bao gồm nhưng không giới hạn ở, iot¹³¹, indi¹¹¹,

yttri⁹⁰, và luteti¹⁷⁷. Phương pháp điều chế thể liên hợp miễn dịch phóng xạ đã được thiết lập trong lĩnh vực này. Ví dụ về thể liên hợp miễn dịch phóng xạ có sẵn trên thị trường, bao gồm ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals) và BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), và phương pháp tương tự có thể được sử dụng để điều chế thể liên hợp miễn dịch phóng xạ sử dụng kháng thể theo sáng chế.

Các thể liên hợp kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để biến đổi đáp ứng sinh học có, và gốc được chất không được hiểu là bị giới hạn bởi các hóa chất điều trị cổ điển. Ví dụ, gốc được chất có thể là protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học mong muốn. Protein này có thể bao gồm, ví dụ, chất độc có hoạt tính enzym, hoặc mảnh có hoạt tính của nó, như abrin, rixin A, ngoại độc tố của pseudomonas, hoặc độc tố bạch hầu; protein như yếu tố hoại tử khối u hoặc interferon- γ ; hoặc, chất biến đổi đáp ứng sinh học như, ví dụ, lymphokin, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), yếu tố kích thích nhóm đại thực bào bạch cầu hạt (granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF")), yếu tố kích thích bạch cầu hạt (granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF")), hoặc các yếu tố tăng trưởng khác.

Kỹ thuật để liên hợp gốc điều trị với kháng thể được biết rõ, xem ví dụ, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", trong *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", trong *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", trong *Monoclonal Antibodies '84: Biological và Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", trong *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), và Thorpe *et al.*, "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Phân tử đặc hiệu kép

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu bao gồm kháng thể kháng ActRIIB, hoặc mảnh của nó, theo sáng chế. Kháng thể theo sáng chế, hoặc vùng gắn kết kháng nguyên của chúng, có thể được dẫn xuất hóa hoặc được nối với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác (ví dụ, kháng thể hoặc phối tử thụ thể khác) để tạo ra phân tử đặc hiệu kép gắn kết với ít nhất hai phần gắn kết hoặc hai phân tử đích khác nhau. Trên thực tế, kháng thể theo sáng chế có thể được dẫn xuất hóa hoặc được nối với nhiều hơn một phân tử chức năng khác để tạo ra phân tử đa gắn kết đặc hiệu có hơn hai phần gắn kết và/hoặc phân tử đích khác nhau; phân tử đa đặc hiệu này dự định bao gồm bằng thuật ngữ "phân tử đặc hiệu kép" được sử dụng ở đây. Để tạo phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế, kháng thể theo sáng chế có thể được nối về chức năng (ví dụ, bằng cách bắt cặp hóa học, dung hợp di truyền, sự kết hợp phi cộng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều phân tử gắn kết khác, như kháng thể, mảnh kháng thể khác, peptit hoặc yếu tố bất chức gắn kết, sao cho tạo ra phân tử đặc hiệu kép.

Theo đó, sáng chế bao gồm phân tử đặc hiệu kép chứa ít nhất một đặc hiệu gắn kết thứ nhất đối với ActRIIB và đặc hiệu gắn kết thứ hai đối với epitop đích thứ hai. Ví dụ, epitop đích thứ hai có thể là epitop ActRIIB khác với epitop đích thứ nhất.

Ngoài ra, theo sáng chế, trong đó phân tử đặc hiệu kép là đa đặc hiệu, phân tử có thể cũng chứa phần gắn kết đặc hiệu thứ ba, bên cạnh epitop đích thứ nhất và thứ hai.

Theo một phương án, phân tử đặc hiệu kép của sáng chế chứa đặc hiệu gắn kết ít nhất một kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, bao gồm ví dụ, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, hoặc chuỗi đơn Fv. Kháng thể cũng có thể là dime chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng, hoặc mảnh tối thiểu bất kỳ của chúng như Fv hoặc cấu trúc chuỗi đơn như mô tả trong Ladner *et al.* US4,946,778, nội dung của nó chỉ được kết hợp bằng cách tham chiếu.

Kháng thể khác có thể được áp dụng trong phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế là kháng thể đơn dòng của chuột, dạng khảm và được làm giống như của người.

Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách liên hợp các đặc hiệu gắn kết cấu thành, sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, mỗi đặc hiệu gắn kết của phân tử đặc hiệu kép có thể được tạo ra độc lập và sau đó được liên hợp với đặc hiệu gắn kết khác. Khi đặc hiệu gắn kết là protein hoặc peptit, đa dạng chất ghép cặp hoặc chất liên kết ngang có thể được sử dụng để liên hợp cộng hóa trị. Ví dụ về chất liên kết ngang bao gồm protein A, carbodiimite, N-succinimidyl-S-axetyl-thioaxetat (SATA), axit 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) (DTNB), o-phenylenedimaleimite (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), và sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (xem ví dụ, Karpovsky *et al.*, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA *et al.*, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Phương pháp khác bao gồm các phương pháp đã mô tả trong Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. No. 78,118-132; Brennan *et al.*, 1985 Science 229:81-83), và Glennie *et al.*, 1987 J. Immunol. 139: 2367-2375). Chất kết hợp là SATA và sulfo-SMCC, cả hai chất này từ Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Khi đặc hiệu gắn kết là kháng thể, chúng có thể được liên hợp bằng liên kết sulfhydryl của vùng bản lề đầu C của hai chuỗi nặng. Theo phương án cụ thể, vùng bản lề được biến đổi để chứa số gốc sulfhydryl lẻ, ví dụ, một, trước khi liên hợp.

Theo cách khác, cả hai tính đặc hiệu gắn kết đều có thể được mã hóa trong cùng vector và biểu hiện và lắp ráp trong cùng tế bào chủ. Phương pháp này đặc biệt hữu ích nếu phân tử đặc hiệu kép là protein dung hợp của mAbxmAb, mAbxFab, FabxF(ab')₂ hoặc phối tử xFab. Phân tử đặc hiệu kép theo sáng chế có thể là phân tử chuỗi đơn chứa một chuỗi kháng thể duy nhất và yếu tố quyết định gắn kết, hoặc phân tử đặc hiệu kép chuỗi đơn chứa hai yếu tố quyết định gắn kết. Phân tử đặc hiệu kép có thể chứa ít nhất hai phân tử chuỗi đơn. Phương pháp để điều chế phân tử đặc hiệu kép được mô tả ví dụ, trong các patent Mỹ số 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; và 5,482,858.

Gắn kết của phân tử đặc hiệu kép với đích đặc hiệu của chúng có thể được xác định bằng cách, ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay (RIA)), phân tích FACS, thử nghiệm sinh học (ví dụ, ức chế tăng trưởng), hoặc thử nghiệm Western Blot. Mỗi thử nghiệm này phát hiện sự có mặt phức hợp protein-

kháng thể mong muốn cụ thể bằng cách sử dụng chất đánh dấu (ví dụ, kháng thể) đặc hiệu với phức hợp quan tâm.

Kháng thể đa hóa trị

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đa hóa trị chứa ít nhất hai phần gắn kết kháng nguyên giống nhau hoặc khác nhau đồng nhất của kháng thể theo sáng chế gắn kết với ActRIIB. Theo một phương án, kháng thể đa hóa trị đề xuất ít nhất hai, ba hoặc bốn phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Các phần gắn kết kháng nguyên có thể được nối với nhau bằng dung hợp protein hoặc liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị. Ngoài ra, phương pháp liên kết được mô tả đối với phân tử đặc hiệu kép. Hợp chất hóa trị bốn có thể thu được ví dụ, bằng cách liên kết ngang kháng thể của kháng thể theo sáng chế với kháng thể gắn kết với vùng cố định của kháng thể theo sáng chế, ví dụ, vùng Fc hoặc vùng bản lề.

Dược phẩm

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm ví dụ, dược phẩm, chứa một hoặc tổ hợp kháng thể đơn dòng, hoặc phần gắn kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, được bào chế cùng với chất mang dược dụng. Chế phẩm này có thể chứa một hoặc tổ hợp của (ví dụ, hai hoặc nhiều khác nhau) kháng thể, hoặc phân tử kết hợp miễn dịch hoặc đặc hiệu kép của sáng chế. Ví dụ, dược phẩm của sáng chế có thể bao gồm chế phẩm của kháng thể gắn kết với epitop khác trên kháng nguyên đích hoặc có hoạt tính bổ sung.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được dùng trong liệu pháp kết hợp, có nghĩa là, kết hợp với chất khác. Ví dụ, điều trị kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng ActRIIB của sáng chế kết hợp với ít nhất một chất khác làm tăng khối lượng/sức mạnh cơ, ví dụ, IGF-1, IGF-2 hoặc loại khác của IGF-1 hoặc IGF-2, kháng thể kháng myostatin, polypeptit myostatin, protein giả myostatin liên kết ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận beta 2, chất chủ vận Ghrelin, SARM, chất chủ vận/bắt chước GH hoặc follistatin. Ví dụ, chất điều trị có thể được sử dụng trong điều trị kết hợp được mô tả chi tiết hơn dưới đây trong phần sử dụng kháng thể theo sáng chế.

Được sử dụng ở đây, "chất mang dược dụng" bao gồm bất kỳ hoặc tất cả dung môi, môi trường tạo sự phân tán, chất bao, chất kháng vi khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và chất trì hoãn hấp thụ, và tương tự mà tương thích sinh lý. Chất mang phải thích hợp để dùng theo đường tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, dùng ngoài đường tiêu hóa, xương sống hoặc biểu bì (ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền). Phụ thuộc vào đường dùng, hợp chất hoạt tính, có nghĩa là, kháng thể, thể liên hợp miễn dịch, hoặc phân tử đặc hiệu kép, có thể được bao phủ trong nguyên liệu bảo vệ hợp chất khỏi hoạt động của axit và điều kiện tự nhiên khác có thể làm mất hoạt tính của hợp chất.

Hợp chất dược theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều muối dược dụng. "Muối dược dụng" đề cập đến muối giữ lại hoạt tính sinh học mong muốn của hợp chất gốc và không truyền bất kỳ tác động độc hại không mong muốn (xem ví dụ, Berge, S.M., *et al.*, 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ví dụ về muối bao gồm muối axit và muối bazơ. Muối axit bao gồm muối có nguồn gốc từ axit vô cơ không độc, như axit clohydric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphoric và muối tương tự, cũng như từ axit hữu cơ không độc như axit aliphatic mono- và dicarboxylic, axit alkanoic được thế phenyl, axit hydroxy alkanoic, axit thơm, axit aliphatic và axit sulfonic thơm và axit tương tự. Muối bazơ bao gồm muối có nguồn gốc từ kim loại kiềm thổ, chẳng hạn như natri, kali, magie, canxi và tương tự, cũng như từ amin hữu cơ không độc như N,N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglucamin, cloprocain, colin, dietanolamin, etylenediamin, procain và tương tự.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm chất chống oxi hóa dược dụng. Ví dụ về chất chống oxi hóa dược dụng bao gồm: chất chống oxi hóa hòa tan trong nước, như axit ascorbic, xystein hydroclorua, natri bisulfat, natri metabisulfua, natri sulfua và tương tự; chất chống oxi hóa hòa tan trong dầu, như ascorbyl palmitat, hydroxyanisol được butyl hóa (BHA), hydroxytoluen được butyl hóa (BHT), lexithin, propyl gallat, alpha-tocopherol, và chất tương tự; và chất tạo chelat kim loại, như axit xitric, axit etylenediamin tetraaxetic (EDTA), sorbitol, axit tartaric, axit phosphoric, và chất tương tự.

Ví dụ về chất mang tan chứa nước và không chứa nước thích hợp có thể được dùng trong dược phẩm theo sáng chế bao gồm nước, etanol, polyol (như glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, tương tự), và hỗn hợp thích hợp của nó, dầu thực

vật, như dầu oliu, và este hữu cơ có khả năng tiêm được, như etyl oleat. Trạng thái lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng vật liệu phù, như lexitin, bằng cách duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán, và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt.

Chế phẩm này cũng có thể chứa tá dược như chất bảo quản, chất thẩm ướt, chất nhũ hóa và chất gây phân tán. Ngăn sự có mặt của vi sinh vật có thể được đảm bảo bởi sự tiết trùng quy trình, ở trên, và bởi sự tập hợp nhiều loại chất kháng vi khuẩn và kháng nấm, ví dụ, paraben, clobutanol, axit phenol sorbic, tương tự. Các chất đẳng trương, chẳng như đường, natri clorua, và chất tương tự cũng được mong muốn có trong chế phẩm. Ngoài ra, sự hấp thụ kéo dài của dạng dược phẩm để tiêm có thể đạt được bằng cách kết hợp các chất trì hoãn sự hấp thụ, chẳng hạn như nhôm monostearat và gelatin.

Chất mang dược dụng bao gồm dung dịch chứa nước hoặc chất phân tán và bột vô trùng đối với chế phẩm dung dịch hoặc chất phân tán để tiêm vô trùng dùng tức thì. Việc sử dụng môi trường và chất này đối với hoạt chất dược được biết đến trong lĩnh vực này. Trừ phạm vi mà môi trường hoặc chất thông thường bất kỳ không tương thích với hoạt chất, sử dụng chúng trong dược phẩm theo sáng chế được dự tính. Hợp chất có hoạt tính bổ sung có thể cũng được kết hợp vào chế phẩm.

Chế phẩm điều trị điển hình phải là vô trùng và ổn định trong các điều kiện bảo chế và bảo quản. Chế phẩm có thể được tạo thành công thức dưới dạng dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc cấu trúc được yêu cầu khác để thích hợp với nồng độ dược chất cao. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng và chất tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Trạng thái lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng chất phủ chẳng hạn như lexitin, bằng cách duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, chất này bao gồm chất đẳng trương, ví dụ, đường, polyalcohol như mannitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong chế phẩm. Sự hấp thụ kéo dài của chế phẩm để tiêm có thể được mang lại bằng cách chế phẩm bao gồm chất trì hoãn hấp thụ ví dụ, muối monosterat và gelatin.

Dung dịch tiêm vô trùng có thể được chuẩn bị bằng cách kết hợp hoạt chất ở lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một hoặc kết hợp các chất được liệt kê ở trên, như được yêu cầu, sau đó là vi lọc vô trùng. Thông thường, chất phân tán được điều chế bằng cách kết hợp hoạt chất vào chất dẫn được chất vô trùng chứa môi trường phân tán bazơ và chất cần thiết khác từ các chất được liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột vô trùng của chế phẩm của dung dịch tiêm vô trùng, phương pháp bào chế là làm khô chân không và làm khô lạnh (đông khô) để thu được bột hoạt chất cộng với chất bổ sung mong muốn bất kỳ từ dung môi được lọc vô trùng trước đó của chúng.

Lượng hoạt chất có thể được kết hợp với vật liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn sẽ thay đổi phụ thuộc vào đối tượng được điều trị, và chế độ áp dụng cụ thể. Lượng hoạt chất có thể được kết hợp với vật liệu chất mang để tạo thành dạng liều duy nhất thường là lượng chế phẩm tạo hiệu quả điều trị. Thông thường, chưa đến 100%, lượng này nằm trong phạm vi từ khoảng 0,01 đến khoảng 99% hoạt chất, từ khoảng 0,1% đến khoảng 70%, hoặc từ khoảng 1% đến khoảng 30% hoạt chất kết hợp với chất mang được dụng.

Phác đồ liều được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, liều đơn tổng hợp có thể được dùng, liều chia nhỏ có thể được dùng theo thời gian hoặc liều có thể được giảm hoặc tăng theo tỷ lệ như được xác định bởi nhu cầu của tình trạng điều trị. Điều này đặc biệt thuận lợi để bào chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng đơn vị liều dễ sử dụng và đồng nhất liều lượng. Dạng đơn vị liều sử dụng ở đây đề cập đến các đơn vị tách riêng vật lý phù hợp làm liều đơn vị đối với đối tượng được điều trị; mỗi đơn vị chứa lượng hoạt chất được xác định trước mà tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị mong muốn kết hợp với chất mang được dụng cần thiết. Đặc tính đối với dạng đơn vị liều của sáng chế được điều chỉnh và trực tiếp phụ thuộc vào đặc tính đặc biệt đơn nhất của hoạt chất và hiệu quả điều trị cụ thể cần đạt được, và giới hạn vốn có trong lĩnh vực này của hỗn hợp mà hoạt chất này đối với sự miễn cảm điều trị ở các cá thể.

Đối với việc áp dụng kháng thể, phạm vi liều từ khoảng 0,0001 đến 100mg/kg, và phổ biến hơn là từ 0,01 đến 5mg/kg, trọng lượng cơ thể người sử dụng. Ví dụ, liều có thể là 0,3mg/kg trọng lượng cơ thể, 1mg/kg trọng lượng cơ thể, 3mg/kg trọng lượng cơ thể, 5mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 10mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc trong phạm vi

vi 1-10mg/kg hoặc 3-7mg/kg. Chế độ điều trị điển hình đòi hỏi việc áp dụng một tuần/lần, hai tuần/ lần, ba tuần/ lần, bốn tuần/lần, một tháng/lần, ba tháng/lần hoặc ba đến sáu tháng/lần. Theo cách khác, kháng thể có thể được dùng khoảng một năm/lần hoặc chỉ một lần duy nhất. Cách áp dụng này có thể được tiến hành trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Chế độ liều của kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế bao gồm 1mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 3mg/kg trọng lượng cơ thể bằng cách dùng trong tĩnh mạch, với kháng thể đã có sẽ sử dụng một trong các lịch trình liều sau: sáu liều/bốn tuần, sau đó mỗi ba tháng; mỗi ba tuần; 3mg/kg trọng lượng cơ thể/ lần sau đó là 1mg/kg trọng lượng cơ thể/ba tuần.

Liều lượng sẽ là điều gây ra điều hòa tăng khối lượng và/hoặc sức mạnh cơ. Theo nhiều phương án, hiệu quả ở trên cơ xương. Theo nhiều phương án, liều lượng gây trương cơ không nhiều hơn việc tăng tỷ lệ kích thước cơ quan nội tạng (ví dụ, tim, phổi, gan, thận). Việc tăng tỷ lệ này có thể được so sánh bằng cách đo khối lượng hoặc thể tích.

Theo một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có đặc hiệu gắn kết khác nhau được dùng đồng thời, trong trường hợp này liều của mỗi kháng thể dùng nằm trong phạm vi được xác định. Kháng thể thường được dùng tại nhiều thời điểm. Khoảng thời gian giữa các liều đơn có thể là ví dụ, hằng tuần, hằng tháng, mỗi ba tháng, mỗi sáu tháng hoặc hằng năm. Khoảng thời gian cũng có thể không đều như được xác định bằng cách xác định nồng độ kháng thể với kháng nguyên đích trong máu bệnh nhân. Theo một số phương pháp, liều lượng được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể huyết tương khoảng 1-1000 μ g/ml và theo vài cách là khoảng 25-300 μ g/ml. Ví dụ, kháng thể ActRIIB theo sáng chế có thể được dùng đồng sử dụng với kháng thể kháng myostatin.

Theo cách khác, kháng thể có thể được dùng là chế phẩm giải phóng duy trì, trong trường hợp này cần dùng ít thường xuyên hơn. Liều lượng và tần suất thay đổi phụ thuộc vào thời gian bán rã của kháng thể ở bệnh nhân. Nhìn chung, kháng thể của người thể hiện thời gian bán rã dài nhất, sau đó là kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, và kháng thể không phải của người. Liều lượng và tần suất áp dụng có thể phụ thuộc khác nhau vào việc điều trị phòng ngừa hoặc điều trị bệnh. Trong việc áp dụng điều trị phòng ngừa, liều lượng tương đối thấp được dùng trong

khoảng thời gian tương đối không thường xuyên qua khoảng thời gian dài. Một vài bệnh nhân tiếp tục nhận điều trị trong thời gian còn lại của cuộc đời họ. Trong cách áp dụng điều trị, liều lượng tương đối cao trong khoảng thời gian tương đối ngắn đôi khi được yêu cầu cho đến khi sự tiến triển của bệnh giảm hoặc kết thúc hoặc đến khi bệnh nhân có sự cải thiện một phần hoặc toàn bộ triệu chứng bệnh. Sau đó, bệnh nhân có thể được áp dụng phác đồ phòng bệnh.

Mức độ liều thực tế của hoạt chất trong được phẩm theo sáng chế có thể thay đổi để thu được lượng hoạt chất có hiệu quả để thu được đáp ứng điều trị mong muốn ở bệnh nhân cụ thể, chế phẩm và chế độ áp dụng, không gây gộc cho bệnh nhân. Mức độ liều được lựa chọn phụ thuộc vào nhiều loại yếu tố dược động học bao gồm hoạt tính của chế phẩm cụ thể theo sáng chế được dùng, hoặc este, muối hoặc amit của chúng, đường dùng, thời gian dùng, tốc độ bài tiết hợp chất cụ thể được sử dụng, khoảng thời gian điều trị, được chất, hợp chất và/hoặc nguyên liệu khác được sử dụng kết hợp với chế phẩm cụ thể được dùng, tuổi, giới tính, cân nặng, tình trạng, sức khỏe tổng quát, tiền sử của bệnh nhân cần được điều trị, và các yếu tố tương tự đã biết rõ trong lĩnh vực y học.

"Liều có hiệu quả điều trị" của kháng thể kháng ActRIIB theo sáng chế có thể tạo ra sự giảm tính nghiêm trọng của triệu chứng bệnh, việc tăng tần suất và khoảng thời gian của giai đoạn không có triệu chứng bệnh, hoặc ngăn ngừa sự suy yếu hoặc mất khả năng do sự hành hạ của bệnh ví dụ, tăng khối lượng và/hoặc sức mạnh cơ.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng theo một hoặc nhiều cách sử dụng một hoặc nhiều cách thức khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Như sẽ được đánh giá cao bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này, đường dùng và/hoặc chế độ dùng sẽ thay đổi phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Cách thức dùng kháng thể theo sáng chế bao gồm trong tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng, dưới da, xương sống hoặc phương thức ngoài đường tiêu hóa khác, ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền. Cụm từ "dùng ngoài đường tiêu hóa" được sử dụng ở đây có nghĩa là cách thức dùng khác ngoài cách dùng qua đường tiêu hóa hoặc dùng tại chỗ, thường bằng cách tiêm, và bao gồm, không giới hạn ở, tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, nội tủy mạch, trong bao khớp, trong ổ mắt, trong tim, trong da, trong bụng, qua khí quản, dưới da, dưới biểu bì, trong khớp, dưới bao, dưới màng nhện, cột sống, tiêm ngoài

màng cứng và mô đệm. Theo một phương án, kháng thể được áp dụng trong tĩnh mạch. Theo phương án khác kháng thể được áp dụng dưới da.

Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng bằng cách dùng ngoài đường tiêu hóa như tại chỗ, dùng qua biểu bì, hoặc niêm mạc, ví dụ, trong mũi, miệng, âm đạo, trực tràng, dưới lưỡi hoặc cục bộ.

Hoạt chất có thể được bào chế với chất mang bảo vệ hợp chất chống lại sự giải phóng nhanh, chẳng hạn như chế phẩm giải phóng kiểm soát, bao gồm các hệ thống phân phối cấy, miếng dán truyền qua da, và hệ thống vận chuyển được bao vi nang. Polyme tương thích sinh học, có thể bị phân hủy sinh học có thể được sử dụng, ví dụ, etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp bào chế các chế phẩm này đã được cấp bằng sáng chế hoặc thường được biết bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Chế phẩm điều trị được dùng bằng thiết bị y tế đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, theo một phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể được áp dụng bằng dụng cụ tiêm dưới da hình kim, chẳng hạn như dụng cụ được thể hiện trong các patent Mỹ số 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 hoặc 4,596,556. Ví dụ về mô cấy và phương pháp hữu ích trong sáng chế này bao gồm: patent Mỹ số 4,487,603, sáng chế đề cập đến bơm vi truyền mô cấy để định lượng dược phẩm với tốc độ được kiểm soát; patent Mỹ số 4,486,194, sáng chế đề cập đến dụng cụ điều trị để dùng thuốc qua da; patent Mỹ số 4,447,233, sáng chế đề cập đến bơm truyền thuốc để vận chuyển thuốc với tỷ lệ truyền rõ ràng; patent Mỹ số 4,447,224, sáng chế thể hiện bộ dụng cụ dòng mô truyền khác nhau để vận chuyển thuốc liên tục; patent Mỹ số 4,439,196, sáng chế đề cập đến hệ thống vận chuyển thuốc thẩm lọc có các ngăn đa buồng. Và patent Mỹ số 4,475,196, sáng chế đề cập đến hệ vận chuyển thuốc thẩm lọc. Nhiều thiết bị khác như hệ cấy mô, vận chuyển và phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và bao gồm các thiết bị được điều chế bởi MicroCHIPS™ (Bedford, MA).

Theo các phương án nhất định, kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế có thể được bào chế để đảm bảo phân phối chính xác *in vivo*. Ví dụ, hàng rào máu não (blood-brain barrier (BBB)) ngăn chặn nhiều hợp chất ưa nước cao. Để đảm bảo hợp chất điều trị theo sáng chế vượt qua được BBB (nếu muốn), chúng có thể được bào chế, ví dụ, dạng liposom. Đối với phương pháp điều chế liposom, xem, ví dụ, các patent Mỹ 4,522,811; 5,374,548; và 5,399,331. Liposom có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc vận chuyển chọn lọc vào tế bào hoặc cơ quan cụ thể, do đó tăng cường vận chuyển thuốc đến đích (xem, ví dụ, V.V. Ranade, 1989 J. Clin Pharmacol. 29:685). Gốc hướng đích điển hình bao gồm folat hoặc biotin (xem, ví dụ, patent Mỹ 5,416,016); mannosit (Umezawa *et al.*, 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); kháng thể (P.G. Bloeman *et al.*, 1995 FEBS Lett. 357:140; M. Owais *et al.*, 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); thụ thể protein A bề mặt (Briscoe *et al.*, 1995 Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier *et al.*, 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); cũng xem K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273.

Sử dụng và phương pháp theo sáng chế

Kháng thể theo sáng chế có ứng dụng chẩn đoán và điều trị *in vitro* và *in vivo*. Ví dụ, phân tử này có thể dùng đối với tế bào trong nuôi cấy, ví dụ, *in vitro* hoặc *ex vivo*, hoặc với đối tượng, ví dụ, *in vivo*, để điều trị, ngăn ngừa hoặc chẩn đoán các rối loạn khác nhau. Do đó, kháng thể có thể được sử dụng trong cả điều trị bệnh, phòng bệnh và trì hoãn sự tấn công của hội chứng bệnh. Thuật ngữ "đối tượng" được sử dụng ở đây nhằm bao gồm người và động vật không phải người. Động vật không phải người bao gồm tất cả động vật có xương sống ví dụ, động vật có vú và động vật không có vú, ví dụ, động vật linh trưởng không phải là người, cừu, chó, mèo, bò, ngựa, gà, động vật lưỡng cư và bò sát.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc rối loạn bệnh lý (ví dụ, bệnh hoặc rối loạn teo cơ) bao gồm dùng lượng có hiệu quả điều trị kháng thể kháng ActRIIB.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng ActRIIB để sử dụng trong điều trị.

Sáng chế cũng đề xuất sử dụng kháng thể kháng ActRIIB trong sản xuất thuốc điều trị để điều trị rối loạn bệnh lý.

Phương pháp đặc biệt thích hợp để điều trị, phòng ngừa, cải thiện hoặc chẩn đoán rối loạn bệnh lý.

Được sử dụng ở đây, “rối loạn bệnh lý” bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh hoặc rối loạn về cơ xương, ví dụ, teo cơ. Có nhiều nguyên nhân gây teo cơ, bao gồm do điều trị bằng glucocorticoid như cortisol, dexametason, betametason, prednison, methylprednisolon, hoặc prednisolon. Teo cơ cũng có thể do bóc bỏ dây thần kinh do chấn thương thần kinh hoặc do thoái hóa, chuyển hóa hoặc viêm thần kinh (ví dụ, hội chứng Guillian-Barré, bệnh thần kinh ngoại biên, hoặc phơi nhiễm với chất độc môi trường hoặc thuốc).

Ngoài ra, teo cơ có thể do bệnh cơ, chẳng hạn như mất trương lực cơ, bệnh cơ bẩm sinh bao gồm bệnh sợi cơ, bệnh cơ do đa hạch/hạch nhỏ và bệnh ống cơ (nhân trung thể); bệnh cơ do ty thể; bệnh bại liệt tuần hoàn di truyền; bệnh cơ do viêm; bệnh cơ do chuyển hóa, chẳng hạn như do bệnh tích trữ glucogen hoặc lipid; viêm da cơ; viêm đa cơ; bao gồm viêm cơ toàn thân; hóa xương do viêm cơ; u cơ vân và myoglobin niệu.

Bệnh về cơ có thể do hội chứng loạn dưỡng cơ, chẳng hạn như Duchenne, Becker, trương lực cơ, loạn dưỡng cơ mặt-vai-cánh tay, Emery-Dreifuss, loạn dưỡng cơ hầu-mắt, loạn dưỡng cơ vai cánh tay, loạn dưỡng cơ đai chi, Fukuyama, loạn dưỡng cơ bẩm sinh, hoặc bệnh cơ ngoại biên do di truyền. Bệnh về cơ xương có thể cũng là chứng loãng xương, gãy xương, tầm vóc nhỏ, hoặc còi cọc.

Ngoài ra, teo cơ có thể do bệnh thần kinh vận động, teo cơ cột sống thời thơ ấu, xơ cứng bên do bệnh teo cơ, teo cơ xương sống thời thiếu niên, bệnh thần kinh vận động tự miễn với sự phong bế điều khiển đa trọng tâm, bệnh bại liệt do tổn hại sợi nối do bị đánh hoặc ở xương sống, cố định xương do chấn thương, nằm trên giường trong thời gian dài, không hoạt động chủ động, không hoạt động do nguyên nhân khách quan, áp lực chuyển hóa hoặc thiếu dinh dưỡng, ung thư, AIDS, bị đói, rối loạn tuyến giáp, bệnh đái tháo đường, nhược trương bẩm sinh lành tính, bệnh hạch trung tâm, tổn thương do bỏng, bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính, bệnh về gan (ví dụ như xơ hóa, xơ

gan), nhiễm trùng, suy thận, suy tim do sung huyết, sự già hóa, du hành không gian hoặc có thời gian trong môi trường không có trọng lực.

Ví dụ về tình trạng liên quan đến tuổi có thể được điều trị bao gồm, thiếu cơ, teo da, hao mòn cơ, teo não, xơ vữa động mạch, xơ cứng động mạch, khí thũng phổi, chứng loãng xương, viêm khớp mạn tính, thiếu khả năng miễn dịch, huyết áp cao, chứng mất trí, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer, bệnh đục thủy tinh thể, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi, ung thư tuyến tiền liệt, đột quy, tuổi thọ trung bình giảm, yếu, mất trí, nếp nhăn, suy chức năng thận, và bệnh mất thính giác do tuổi; rối loạn chuyển hóa, bao gồm bệnh đái tháo đường typ II, hội chứng chuyển hóa, đường huyết cao, và béo phì. Tất nhiên, bệnh nhân có thể mắc đồng thời nhiều tình trạng này, ví dụ, thiếu cơ và khí thũng phổi, hoặc thiếu cơ và suy chức năng thận.

Tình trạng khác được xác định là “rối loạn bệnh lý” như được nêu ở đây bao gồm bệnh thận hoặc suy thận cấp tính và/hoặc mạn tính, chứng xơ gan hoặc bệnh gan mạn tính, ung thư chẳng hạn như ung thư vú, bệnh Parkinson; tình trạng do chết neuron thần kinh, ví dụ, ALS, teo não, hoặc chứng mất trí và thiếu máu.

Tình trạng khác bao gồm chứng suy nhược cơ thể, chứng suy nhược do viêm khớp mạn tính và chứng suy nhược do ung thư.

Đến nay, có rất ít liệu pháp đáng tin cậy hoặc có hiệu quả được phát triển để điều trị những rối loạn này.

Dựa vào các bằng chứng đã được công bố về vai trò của activin gắn kết với ActRIIB trong số các thụ thể khác (Werner và Alzheimer, Cytokine Growth Factors Rev 2006, 17(3):157-171), góp phần gây xơ gan, thận và phổi và vai trò của myostatin, activin, hoặc ActRIIB trong bệnh ung thư (Tsuchida *et al*, Endo J, 2008). “Rối loạn bệnh lý” được nêu ở đây” bao gồm xơ gan, thận và phổi và các bệnh ung thư ví dụ bởi nhưng không bị giới hạn với rhabdomyosarcoma, ung thư cảm ứng tiêu xương, ung thư biểu mô tế bào máu, ung thư dạ dày ruột.

Sự ngăn ngừa có thể toàn diện, ví dụ, sự vắng mặt của toàn bộ tình trạng liên quan đến tuổi hoặc rối loạn chuyển hóa. Sự ngăn ngừa cũng có thể từng phần, sao cho

có khả năng xảy ra tình trạng hoặc rối loạn chuyển hóa liên quan đến tuổi ở đối tượng ít có khả năng xuất hiện so với ở đối tượng không nhận được kháng thể theo sáng chế.

Tình trạng liên quan đến tuổi được đề cập đến ở đây có thể bắt đầu ở tuổi 50 hoặc già hơn (ví dụ, 60, 70, 80 hoặc già hơn).

Theo một phương án, bệnh nhân có thể được điều trị trước bằng kháng thể kháng ActRIIB giai đoạn trước đến khoảng thời gian không được dự kiến trong lúc nghỉ /mất hoạt tính bắt buộc. Giai đoạn này có thể xuất hiện khi bệnh nhân nhập viện, ví dụ, để phẫu thuật hông hoặc chân. Sự bất hoạt có thể được cục bộ hóa, ví dụ bằng cách bó xương hoặc chi hoặc khớp gãy, hoặc bằng cách dùng thuốc gây tê.

Theo một phương án, bệnh nhân đang được điều trị bị gãy chi (ví dụ, chân hoặc tay) hoặc khớp (ví dụ, đầu gối hoặc hông). Do đó, Theo một phương án, bệnh nhân được điều trị bị gãy một hoặc nhiều xương cánh tay, xương quay, xương trụ, xương cổ tay, xương bàn tay, xương đòn, xương vai, xương đùi, khớp háng, xương bánh chè, xương chày, xương mác, xương sên, xương gót, xương cổ chân, xương bàn chân, đốt háng hoặc hồi tràng. Theo phương án khác, bệnh nhân trải qua hoặc sẽ trải qua phẫu thuật một trong các khớp sau: đầu gối, hông, mắt cá chân, vai, khuỷu tay. Phẫu thuật này bao gồm việc đặt lại vị trí hông và đầu gối.

Sự teo do cố định có thể xuất hiện nhanh, nhưng thường xuất hiện chậm. Do đó, theo một phương án, bệnh nhân, được nối lại hoặc cắt được cố định, hoặc sẽ được cố định trong hai tuần hoặc lâu hơn (ví dụ, 3 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần hoặc lâu hơn). Theo một phương án, bệnh nhân, nối lại hoặc cắt được cố định, hoặc sẽ được cố định trong vòng 1-8 tuần, 2-6 tuần hoặc 3-5 tuần.

Theo một phương án khác, bệnh nhân có thể là một người không có đáp ứng với điều trị nối xương trước đó. Ví dụ, bệnh nhân có thể không đáp ứng với điều trị bằng IGF-1, IGF-2 hoặc các loại của IGF-1 hoặc IGF-2, kháng thể kháng myostatin, propeptit myostatin, protein bẫy myostatin gắn kết ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận beta 2, chất chủ vận Ghrelin, SARM, cơ chủ vận/chất chủ vận GH hoặc follistatin. Cách đơn giản để xác định đáp ứng đối với việc điều trị của bệnh nhân có thể là đo thời gian bệnh nhân dùng để leo lên độ cao cầu thang đã biết và so sánh với kết quả trước và sau khi điều trị.

Kháng thể theo sáng chế có thể được áp dụng dưới dạng hoạt chất đơn nhất hoặc kết hợp với, ví dụ, tá dược hoặc kết hợp với, dược chất khác ví dụ, IGF-1, IGF-2 hoặc các loại IGF-1 hoặc IGF-2, kháng thể kháng myostatin, propeptit myostatin, protein bẫy myostatin gắn kết ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận 2, chất chủ vận Ghrelin, chất chủ vận/chất bắt chước SARM, GH hoặc follistatin. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất bắt chước IGF-1 như được bộc lộ trong công bố đơn Patent quốc tế WO2007/146689.

Phù hợp với vấn đề đã đề cập trước, sáng chế còn đề xuất một khía cạnh khác:

Phương pháp như được xác định ở trên bao gồm đồng sử dụng, ví dụ, dùng đồng thời hoặc theo thứ tự, lượng có hiệu quả điều trị của chất đối kháng ActRIIB, ví dụ, kháng thể theo sáng chế, và ít nhất một dược chất thứ hai, dược chất thứ hai này là IGF-1, IGF-2 hoặc các loại của IGF-1 hoặc IGF-2, kháng thể kháng myostatin, propeptit myostatin, protein giả myostatin gắn kết ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận beta 2, chất chủ vận Ghrelin, chất chủ vận/chất bắt chước SARM, GH hoặc follistatin.

Sáng chế cũng đề xuất sự kết hợp điều trị, ví dụ, kit, bao gồm lượng có hiệu quả điều trị của a) chất đối kháng ActRIIB, ví dụ, kháng thể theo sáng chế, và b) ít nhất một chất thứ cấp được chọn từ IGF-1, IGF-2 hoặc các loại IGF-1 hoặc IGF-2, kháng thể kháng myostatin, propeptit myostatin, protein giả myostatin gắn kết ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận beta 2, chất chủ vận Ghrelin, chất chủ vận/chất bắt chước SARM, GH hoặc follistatin, ví dụ, như được chỉ định ở trên. Kit này có thể cũng bao gồm hướng dẫn sử dụng.

Khi kháng thể theo sáng chế được dùng kết hợp với hoạt chất khác, liều lượng hợp chất chế phẩm đồng áp dụng sẽ phụ thuộc nhiều vào loại dược chất cùng được sử dụng, dược chất cụ thể được áp dụng, vào tình trạng được điều trị và v.v...

Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế được dùng chỉ cho nhóm bệnh nhân được chọn trong số các bệnh nhân bị teo cơ. Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế được áp dụng cho nhóm bệnh nhân bị teo cơ xương. Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế chỉ được dùng cho nhóm bệnh nhân được chọn từ bệnh nhân đáp ứng với điều trị kháng ActRIIB. Chất đánh dấu sinh học để xác định bệnh

nhân tăng khả năng xảy ra đáp ứng với điều trị kháng ActRIIB có thể là bất kỳ trường hợp nào nhưng không giới hạn sau đây: mức độ myostatin, GDF-11 hoặc activin trong huyết thanh cao so với bệnh nhân đối chứng.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để xác định mức ActRIIB, hoặc lượng tế bào chứa ActRIIB. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách cho tiếp xúc mẫu (ví dụ như mẫu *in vitro*) và mẫu đối chứng với kháng thể kháng ActRIIB trong điều kiện cho phép đối với sự hình thành phức hợp giữa kháng thể và ActRIIB. Phức hợp bất kỳ được hình thành giữa kháng thể và ActRIIB được nhận biết và so sánh với mẫu và đối chứng. Ví dụ, phương pháp phát hiện chuẩn, đã biết trong lĩnh vực này, như ELISA và thử nghiệm đếm dòng tế bào có thể được tiến hành sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Do đó, một khía cạnh của sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của ActRIIB (ví dụ, ActRIIB của người) trong mẫu, hoặc xác định lượng ActRIIB, bao gồm cho mẫu, mẫu đối chứng tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế, hoặc vùng gắn kết kháng nguyên của chúng, chúng gắn kết đặc hiệu với ActRIIB, trong điều kiện cho phép sự hình thành phức hợp giữa kháng thể hoặc phần của chúng và ActRIIB. Sau đó, sự hình thành phức hợp được phát hiện, trong đó sự khác nhau trong việc hình thành phức hợp giữa mẫu so với mẫu đối chứng được chỉ ra khi có mặt của ActRIIB trong mẫu.

Kit chứa chế phẩm cũng nằm trong phạm vi của sáng chế (ví dụ, kháng thể, kháng thể của người và phân tử đặc hiệu kép) của sáng chế và hướng dẫn sử dụng. Kit cũng có thể chứa ít nhất một chất bổ sung, hoặc một hoặc nhiều kháng thể bổ sung của sáng chế (ví dụ, kháng thể bao gồm hoạt tính bổ sung gắn kết với epitop trên kháng nguyên đích khác biệt so với kháng thể ban đầu). Kit thường bao gồm chất đánh dấu để cho thấy việc sử dụng kit mong đợi đạt được. Thuật ngữ chất đánh dấu bao gồm bất kỳ nguyên liệu viết hoặc nguyên liệu ghi lại cung cấp trên hoặc cùng với kit, hoặc theo cùng với kit. Kit cũng có thể chứa công cụ để chẩn đoán bệnh nhân có thuộc nhóm đáp ứng với điều trị kháng thể kháng ActRIIB hay không, như được xác định ở trên. Kit này có thể chứa kháng thể theo sáng chế ở dạng đông lạnh, pha loãng và hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế được mô tả đầy đủ, nó cũng được minh chứng bởi các ví dụ và yêu cầu bảo hộ sau, để chứng minh nhưng không nhằm giới hạn sáng chế.

Tổng quát

Thuật ngữ “chứa” có nghĩa là “bao gồm” cũng như là “bao hàm” ví dụ, chế phẩm “chứa” X có thể chứa riêng X hoặc có thể bao gồm một số chất bổ sung ví dụ, X + Y.

Thuật ngữ “khoảng” đề cập đến giá trị số trung bình của x , ví dụ, $x \pm 10\%$.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thử nghiệm chức năng

Tử nghiệm gen thông báo (Reporter gene assay (RGA))

Nuôi cấy dòng tế bào HEK293T/17

Duy trì tế bào gốc HEK293T/17 trong DMEM chứa FBS nồng độ 10%, L-glutamin nồng độ 2mM, penixilin (50IE/ml), và streptomycin (50µg/ml). Nuôi cấy tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ và nuôi cấy chuyển tiếp mỗi 3-4 ngày. Tách tế bào sử dụng AccutaseTM và sau đó chuyển vào bình mới chứa môi trường sạch.

Nuôi cấy các tế bào HEK293T/17 được chuyển nhiễm ổn định CAGA-12 lúc như đã mô tả ở trên đối với tế bào gốc HEK293T/17 nhưng bổ sung thêm vào môi trường sinh trưởng tế bào L-glutamin nồng độ 4mM và blastixidin nồng độ 3µg/ml bên cạnh sự bổ sung FBS, penixilin và streptomycin.

Thử nghiệm gen thông báo luxiferaza cảm ứng bởi myostatin

Để xác định khả năng kháng thể kháng ActRIIB ức chế sự truyền tín hiệu cảm ứng bởi myostatin, tiến hành thử nghiệm gen thông báo sử dụng dòng tế bào báo cáo ổn định HEK293T/17 CAGA-12. Cấu trúc thông báo luxiferaza CAGA-12 mang gen luxiferaza nằm xuôi dòng với trình tự khởi động tối thiểu và hộp đa CAGA đặc hiệu đối với Smad-2 và Smad-3 đã phosphoryl hóa. Sự bổ sung myostatin tinh sạch (nhưng cũng có thể là GDF-11, activin hoặc TGFβ) cảm ứng sự phosphoryl hóa Smad và do đó gắn kết với gen thông báo CAGA-12 và dẫn đến sự biểu hiện gen luxiferaza.

Ở mật độ 90% tế bào HEK293T/17 CAGA-12 luc, tế bào được tách ra như được mô tả và pha loãng trong môi trường nuôi cấy đến nồng độ $2,5 \times 10^5$ tế bào/ml. Sau đó, 100µl tế bào ở mỗi giếng được cấy vào đĩa 96 giếng đáy bằng và được ủ ở 37°C và 5% CO₂ qua đêm.

Vào ngày tiếp theo, pha loãng kháng thể (Fab hoặc IgG) và ActRIIB/Fc người tái tổ hợp, mà được sử dụng làm đối chứng dương trong PBS đến nồng độ mong muốn. Thêm vào 20µl dung dịch kháng thể vào giếng đã cấy ngày trước đó và nuôi cấy tế bào trong vòng 1 giờ để cho phép sự gắn kết với kháng thể. Cuối cùng, thêm 50ng/ml myostatin vào giếng và tiếp tục nuôi cấy tế bào qua đêm.

Sáng ngày tiếp theo, thêm 120µl chất phản ứng Bright-Glo luciferaza (Promega) vào mỗi giếng. Sau khi ủ hai phút, đọc sự phát quang trong máy đo phát quang. Tính toán nồng độ ức chế tối đa một nửa (giá trị IC₅₀) sau khi chuẩn độ đầy đủ kháng thể tương ứng.

ELISA đặc hiệu

Đánh giá tính đặc hiệu kháng thể Fab kháng ActRIIB với ActRIIB của người và khả năng phản ứng chéo với ActRIIA của người và ActRIIB của chuột bằng thiết lập ELISA. Ngoài ra, xác định sự gắn kết với thụ thể liên quan (bộ đếm-đích: TGF-βRII/Fc người (R&D systems), TGF-βRI chuột (ALK-5)/Fc (R&D systems), Activin RIB của người (ALK-4)/Fc (R&D systems)). Để thực hiện, thêm 5µg/ml (nếu không được đề cập theo cách khác) protein tái tổ hợp được pha loãng trong PBS vào đĩa MaxiSorp™ 96 giếng đáy phẳng đen và ủ qua đêm ở 4°C để phủ.

Vào sáng ngày tiếp theo, rửa đĩa thử nghiệm bằng TBST và phong bế bằng MTBST. Sau khi rửa đĩa vài lần, thêm 5µg/ml Fab kháng ActRIIB và ủ trong 2,5 giờ. Sau đó, phát hiện các Fab gắn kết kháng nguyên bằng cách ủ với kháng thể của dê đặc hiệu với Fab IgG của người liên hợp với alkaline phosphatase, sau đó thêm chất huỳnh quang AttoPhos. Ghi lại sự phát huỳnh quang ở 535nm với sự kích hoạt ở 430nm bằng máy đọc đĩa TECAN Spectrafluor.

ELISA tương tác gắn kết ActRIIB/Fc-Myostatin

Để xác định liệu Fab ức chế hoạt động thông qua sự phong bế phần gắn kết myostatin của ActRIIB của người, tiến hành ELISA tương tác hActRIIB/Fc-myostatin. Để thực hiện, pha loãng myostatin tái tổ hợp đến nồng độ 5µg/ml trong PBS và phủ lên đĩa Maxisorp đáy phẳng 96 giếng màu đen. Vào sáng ngày tiếp theo, phong bế các giếng bằng MTBST. Trong khi đó, ủ trước 50µg/ml Fab kháng ActRIIB với 10µg/ml ActRIIB/Fc trong TBST trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau cùng bổ sung vào các giếng đã được phủ và phong bế (1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng). Sau khi rửa bằng đệm TBST, tiến hành phát hiện ActRIIB/Fc đã gắn kết sử dụng kháng thể chuột không gắn chất đánh dấu kháng Ig người đặc hiệu Fc và kháng thể phát hiện của cừu kháng IgG chuột được đánh dấu POD. Sau khi rửa giếng vài lần bằng đệm TBST, thêm chất Quanta Blu™ Fluorogenic Peroxidaza. Đọc sự phát huỳnh quang trong máy đọc GENiosPro™ (kích thích 320nm, phát xạ 430nm).

Gắn kết với tế bào

Tế bào

Tạo ra tế bào HEK293T/17 chuyển nhiễm ổn định ActRIIA và ActRIIB của người sử dụng tế bào HEK293T/17 (ATCC) được chuyển nhiễm với pEGFP (Clontech)-ActRIIB(ECD) tuyến tính hóa hoặc -ActRIIA(ECD) và pPGK-puro (AddGene) làm cho tuyến tính sử dụng FuGENE6 (Roche), được duy trì trong DMEM chứa 10% FBS, 2mM L-glutamin, penixilin (50IE/ml), streptomycin (50µg/ml) và puromycin (2µg/ml). Nuôi tế bào trong tủ ấm ở 37°C và 5% CO₂ và cấy chuyển sau mỗi 3-4 ngày. Tách tế bào sử dụng Accutase™ và sau đó được chuyển vào bình mới chứa môi trường sạch.

Thu tế bào cơ xương của người (Human skeletal muscle cells -huSkMC) (Cambrex) đến độ mật độ là khoảng 70- 90%. Đối với các tế bào này, hút bỏ môi trường nuôi cấy, môi trường tăng trưởng (GM) chứa môi trường cơ bản của cơ xương (skBM; Lonza) được bổ sung FCS 20% (Amimed), và rửa tế bào bằng HEPES-BSS và ủ bằng Trypsin /EDTA. Sau khi tách tế bào, trung hòa trypsin bằng dung dịch làm trung hòa trypsin. Ly tâm tế bào ở 220xg trong 5 phút và tái huyền phù tủa trong môi trường tăng trưởng cơ xương. Sau đó, sử dụng tế bào để thử nghiệm hoặc tạo giống để

nuôi cấy ở mật độ ~ 3500 tế bào/cm². Nuôi tế bào trong máy ủ ở 37°C và 5% CO₂ và nuôi cấy thứ cấp sau mỗi 5-6 ngày.

Chuẩn độ FACS tế bào biểu hiện hActRIIA và hActRIIB

Xác định nồng độ có hiệu quả tối đa một nửa (EC50) của kháng thể kháng ActRIIB qua sự gắn kết với hActRIIA và hActRIIB tế bào bằng FACS.

Đối với điều này, ủ các pha loãng theo dãy của Fab hoặc IgG kháng ActRIIB với 1×10^4 tế bào HEK293T/17 được biến nạp hActRIIA, hActRIIB hoặc tế bào gốc/giống trong 1 giờ ở 4°C. Sau vài bước rửa, phát hiện Fab hoặc IgG đã gắn vào tế bào bằng kháng thể thứ cấp của dê kháng IgG người liên hợp với phycoerythrin. Sau khi ủ một giờ ở 4°C, rửa tế bào lại và tái huyền phù trong đệm FACS và xác định cường độ huỳnh quang của tế bào trong thiết bị FACSArrayTM.

Gắn kết với tế bào cơ xương người sơ cấp

Ủ Fab hoặc IgG kháng ActRIIB cũng như Fab hoặc IgG isotyp đối chứng (10μg) với 10^5 huSkMC trong dung dịch đệm FACS (PBS, 2% FCS, 1mM EDTA)/ống trong 1 giờ ở 4°C. Sau các bước rửa, phát hiện Fab hoặc IgG gắn tế bào bằng kháng thể thứ cấp của dê kháng IgG (H+L) của người liên hợp với phycoerythrin, mà được pha loãng với tỷ lệ 1:200 trong đệm FACS. Sau 1 giờ ủ ở 4°C trên máy lắc, rửa lại tế bào và tái huyền phù trong đệm FACS và xác định cường độ huỳnh quang của tế bào trong thiết bị FACSCaliberTM.

Xác định ái lực

Xác định ái lực của Fab kháng ActRIIB của người đã chọn sử dụng máy cộng hưởng Plasmon bề mặt (Biacore)

Để cố định kháng nguyên trực tiếp, sử dụng hóa ghép cặp EDC-NHS tiêu chuẩn. Phủ chip CM5 (Biacore, Thụy Điển) bằng xấp xỉ 6000RU ActRIIB/Fc của người hoặc của chuột, hoặc xấp xỉ 1500 RU ActRIIA/Fc của người (theo hoạt tính của kháng nguyên) trong đệm acetat nồng độ 10mM, ở độ pH 4,5. Đối với dòng tế bào tham chiếu, sử dụng lượng HAS tương ứng. Tiến hành tái tạo bằng 5μl đệm Glyxin/HCl nồng độ 10mM với độ pH 1,5.

Theo cách khác, kháng nguyên không được cố định ngay, nhưng được bắt giữ trên chip CM5, mà được biến đổi với kháng thể kháng Fc của người (kit bắt giữ Fc, GE Healthcare/Biacore). Trong dòng tế bào tham chiếu, cố định kháng thể bắt giữ, nhưng không cố định kháng nguyên đã bắt giữ. Tiến hành tái tạo sử dụng 2 lần nạp 5 μ l $MgCl_2$ nồng độ 3M.

Thực hiện đo động học trong PBS của Dulbecco ở tốc độ chảy là 20 μ l/min sử dụng dây pha loãng theo chuỗi của mẫu Fab. Nồng độ Fab nằm trong khoảng từ 15,6 đến 500nM. Thời gian nạp mẫu với mỗi nồng độ là 1 phút. Thời gian phân tách được cài đặt ít nhất là 2 phút (hoặc hơn, theo ái lực được xác định). Sử dụng sự nạp trống chứa đệm chạy để tham chiếu hai lần. Khớp toàn bộ mọi cảm biến gam sử dụng phần mềm đánh giá BIA 3.2 (Biacore, Thụy Điển).

Thử nghiệm CK

Bắt đầu biệt hóa sau khi cấy 24 giờ bằng cách chuyển tế bào từ GM sang môi trường biệt hóa không chứa huyết thanh chứa môi trường cơ sở của cơ xương (skeletal muscle basel medium-skBM). Biệt hóa tế bào trong 3 ngày trong sự vắng mặt và có mặt myostatin (R&D systems) hoặc protein TGF- β khác và kháng thể đã kiểm tra ở nồng độ đã xác định. Rửa tế bào bằng PBS và sau đó ly giải bằng đệm ly giải chất báo cáo (Promega) và được bảo quản cho đến khi đo ở $-80^{\circ}C$. Xác định hoạt tính CK sử dụng thuốc thử CK (IFCC) (Thermo Electron). Chuẩn bị thuốc thử CK theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Điều chỉnh ly giải tế bào đến nhiệt độ phòng, bổ sung thuốc thử CK và đọc ngay lập tức sự hấp thụ ở 340nm trong 20 phút, khoảng thời gian đọc 1 phút. Chuẩn bị đường chuẩn CK mới sử dụng CK từ cơ thỏ (Roche Diagnostics). Xác định hàm lượng protein sử dụng kit BCA.

Mô hình động vật

Chọn ngẫu nhiên chuột CB17/ICR-*Prkdc^{scid}*/Crl cái chín tuần tuổi (n=10/nhóm, Charles River, Germany) theo trọng lượng cơ thể và sau đó được xử lý trong màng bụng với kháng thể kháng ActRIIB của người (MOR8159, MOR8213) hoặc kháng thể đối chứng IgG ở liều lượng 10mg/kg (Nghiên cứu 1; nghiên cứu so sánh), hoặc với MOR8213 ở liều lượng 25, 5, hoặc 1mg/kg (Nghiên cứu 2; nghiên cứu đáp ứng liều

lượng) vào ngày 0, 3, 7, 14, 21, 28 và 35 (một lần/tuần vào ngày thứ 3). Trọng lượng cơ thể được xác định hai lần/tuần. Sau khi xử lý sáu tuần (42 ngày), gây chết chuột bằng CO₂. Thu lại và cân cơ cẳng chân, cơ sinh đôi cẳng chân với bàn chân, cơ tứ đầu và cơ ngực.

Quy trình xử lý

Kháng thể đối chứng: kháng lysozym-hIgG gà,

Nồng độ: 2mg/ml (nghiên cứu 1), 5mg/ml (nghiên cứu 2), thể tích áp dụng: 5ml/kg

Chất dẫn thuốc: xitrat nồng độ 50mM, NaCl nồng độ 140 mM hoặc PBS

Kháng thể kháng ActRIIB của người: MOR8159 và MOR8213 kháng-ActRIIB, hIgG

Nồng độ: 2mg/ml (nghiên cứu 1), 5mg/ml (nghiên cứu 2), 1mg/ml (nghiên cứu 2), 0,2mg/ml (nghiên cứu 2), thể tích áp dụng: 5ml/kg

Chất dẫn thuốc: xitrat nồng độ 50mM, NaCl nồng độ 140 mM

Nhóm điều trị:

Nghiên cứu 1; So sánh MOR08159 và MOR08213

- 1 đối chứng IgG, i.p. (kháng lysozym –IgG gà), 10mg/kg
- 2 kháng ActRIIB-MOR8159, tiêm màng bụng (i.p.), 10mg/kg
- 3 kháng ActRIIB-MOR8213, i.p, 10mg/kg

Nghiên cứu 2; đáp ứng liều của MOR08213

- 1 đối chứng IgG, i.p. (kháng lysozym IgG gà), 25mg/kg
- 2 kháng ActRIIB-MOR8213, i.p., 25mg/kg
- 3 kháng ActRIIB-MOR8213, i.p., 5mg/kg
- 4 kháng ActRIIB-MOR8213, i.p., 1mg/kg

Điều kiện duy trì

Nuôi nhốt các động vật thành các nhóm có bốn đến năm động vật ở 25°C với chu kỳ sáng tối là 12:12 giờ. Cho chúng ăn theo chế độ phòng thí nghiệm tiêu chuẩn bao gồm 18,2% protein và 3,0% chất béo với năng lượng là 15,8 MJ/kg (NAFAG 3890, Kliba). Cung cấp thức ăn và nước tùy ý. Thực hiện thử nghiệm ở động vật theo luật có hiệu lực ở Canton của Basel-City, Thụy Sĩ.

Phương pháp

Phân tích thống kê

Biểu hiện kết quả dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM. Thực hiện phân tích thống kê sử dụng thử nghiệm đa so sánh của Dunnett sau sự phân tích một chiều các biến thể. kiểm nghiệm việc điều trị (kháng thể MOR8159 và MOR8213 kháng-ActRIIB) về khác biệt với đối chứng (kháng thể đối chứng) và sự khác biệt được xem xét là có ý nghĩa khi giá trị xác suất là $< 0,05$: *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, NS: không có ý nghĩa với đối chứng IgG. Thực hiện phân tích thống kê bằng GraphPad Prism phiên bản 5.0 (GraphPad Software, Inc). Có thể tính toán trọng lượng cơ thể bằng trừ đi trọng lượng cơ thể ở ngày 0, và chuẩn hóa khối lượng cơ bằng trọng lượng cơ thể ở ngày 0 (trọng lượng cơ thể ban đầu).

Sàng lọc, nhận dạng và nghiên cứu đặc tính của kháng thể

Tạo ra kháng thể điều trị kháng protein ActRIIB của người bằng cách chọn dòng có ái lực gắn kết cao, sử dụng thư viện bộ lộ thực khuẩn thể của các protein biến thể của kháng thể có trên thị trường, MorphoSys HuCAL GOLD® làm nguồn

Thư viện HuCAL GOLD® là thư viện Fab (Knappik *et al.*, 2000) trong đó tất cả sáu CDR được đa dạng hóa bằng phương pháp thích hợp, và dùng kỹ thuật CysDisplay™ để liên kết Fab với bề mặt thực khuẩn thể (WO01/05950).

Sử dụng thư viện phagemit HuCAL GOLD® (Rothe *et al.*, 2008) để chọn mảnh kháng thể Fab đặc hiệu.

Lựa chọn bằng cách sàng lọc kháng thể đặc hiệu ActRIIB từ thư viện

Để chọn kháng thể nhận biết ActRIIB của người, áp dụng nhiều kế hoạch sàng lọc.

Tóm lại, chia kháng thể-thực khuẩn thể HuCAL GOLD® thành một số tập hợp chứa các gen chủ (master) VH khác nhau.

Thực hiện các sàng lọc tế bào khác cho mỗi tập hợp riêng đã nêu nhờ đó vòng chọn lọc trên tế bào chuyển nhiễm ActRIIB chuyển tiếp được thay bằng vòng sàng lọc trên protein ActRIIB/Fc người tái tổ hợp.

i. Sàng lọc toàn bộ tế bào

Để sàng lọc, trộn hạt thực khuẩn thể được pha loãng trong PBS với thể tích tương đương của PBS/BSA và phong bế. Đồng thời, cũng trong ống phong bế trước, tái huyền phù 1×10^7 tế bào tương ứng biểu hiện hActRIIB/tập hợp thực khuẩn thể trong PBS/ 3% FCS/ 0,04% NaN_3 và phong bế trong mỗi giờ tại 4°C trên máy lắc. Ly tâm nhẹ xuống các tế bào phong bế, tái huyền phù trong hạt thực khuẩn thể phong bế trước và ủ trong ba giờ. Trong thời gian đó, chuẩn bị 1×10^7 tế bào khóa knock-down hActRIIB/ tập hợp thực khuẩn thể.

Rửa phức hợp thực khuẩn thể-tế bào bằng PBS/BSA, sau đó rửa bằng PBS. Tiến hành rửa giải hạt thực khuẩn thể từ tế bào biểu hiện hActRIIB bằng rửa giải axit với đệm glyxin, độ pH là 2,2. Sau khi ly tâm, trung hòa dịch rửa giải bằng cách bổ sung Tris không phải là đệm.

Sau khi gây nhiễm và sau đó ly tâm, tái huyền phù hạt vi khuẩn trong môi trường 2xYT, trải lên đĩa thạch chứa LB/CAM/Glc và ủ qua đêm ở 37°C . Sáng ngày kế tiếp, lấy các khuẩn lạc ra khỏi đĩa thạch, giải phóng và khuếch đại thực khuẩn thể.

ii. Sàng lọc pha rắn

Để sàng lọc pha rắn, phủ ActRIIB/Fc người tái tổ hợp lên đĩa MaxiSorp™ ở 4°C qua đêm. Sau khi rửa giếng được phủ bằng PBS, phong bế bằng 5% MPBST.

Trước khi chọn lọc, hấp thụ trước thực khuẩn thể HuCAL GOLD[®] trong đệm phong bế. Thêm thực khuẩn thể bị phong bế vào kháng nguyên được phủ và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa loại thực khuẩn thể không đặc hiệu bằng PBST và PBS. Rửa giải thực khuẩn đã gắn kết bằng cách bổ sung DTT nồng độ 20mM. Sử dụng rửa giải thu được để xâm nhiễm dịch nuôi cấy *E. coli* TG-1. Sau khi nhiễm, trải vi khuẩn lên đĩa thạch LB/CAM/Glc và ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Sáng ngày kế tiếp, lấy các khuẩn lạc ra khỏi đĩa thạch, giải phóng và khuếch đại thực khuẩn thể.

Phương pháp sàng lọc thành công nhất được cho thấy là các sàng lọc tế bào/protein khác nhau với vòng sàng lọc đầu tiên trên tế bào HEK293T/17 chuyển nhiễm ActRIIB, sau đó chọn lọc quay lại trên ActRIIB/Fc của người tái tổ hợp và lặp lại trên tế bào chuyển nhiễm.

Phân tích Fab được phân tích sự gắn kết tế bào HEK293 gốc hoặc chuyển nhiễm rhActRIIB.

Fab MOR07079 ưu tiên liên kết với tế bào nhiễm ActRIIB có EC50 là 20nM (Fig. 1). Trong ELISA ức chế gắn kết myostatin, Fab MOR07079 thể hiện hoạt tính ức chế và rhActRIIB/Fc bị phong bế gắn kết với myostatin. Sự ức chế gắn kết myostatin mạnh trong ELISA được phản ánh bằng sự ức chế myostatin trong thử nghiệm gen thông báo sử dụng HEK293-CAGA12 đối với MOR07079. Sử dụng ELISA đặc hiệu, MOR07079 thể hiện là gắn kết đặc hiệu với ActRIIB của người và chuột và không với thụ thể TGFβRII, ALK4 và ALK5 không liên quan. MOR07079 cũng được thể hiện là ưu tiên gắn kết với ActRIIB hơn là so với ActRIIA.

Điều chế globulin miễn dịch HuCAL[®]

i. Chuyển Fab thành dạng IgG

Để biểu hiện globulin miễn dịch (Ig) có độ dài đầy đủ, tách dòng thứ cấp các mảnh của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL) từ vector biểu hiện Fab pMORPH[®]X9_FH sang dãy vector pMORPH[®]2_h_Ig cho IgG2. Chuyển đổi các dòng đã chọn thành dạng IgG1LALA câm, trong đó leuxin ở vị trí 234 và 235 được gây đột biến thành alanin để phá hủy gắn kết FcRγ và chức năng phản ứng trả lời kích thích bị làm yếu đi.

Sử dụng enzym giới hạn thích hợp (Knappik *et al.*, 2000) để tách dòng thứ cấp mảnh miền VH và VL vào pMORPH[®]2_h_IgG2, pMORPH[®]2_h_IgG1LALA, pMORPH[®]2_h_Igκ, và pMORPH[®]2_h_Igλ2.

Phân tích trình tự tất cả các chế phẩm ADN trước khi xâm nhiễm vào tế bào HKB11.

ii. Biểu hiện và tinh sạch IgG trong thời gian ngắn

Chuyển nhiễm ADN vector biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ vào IgG tế bào nhân thực HKB11. Thu dịch nổi nuôi cấy tế bào ở ngày thứ 3 hoặc 7 sau khi chuyển nhiễm và xử lý sắc ký ái lực protein A tiêu chuẩn. Nếu không được đề cập khác, tiến hành trao đổi đệm bằng PBS của Dulbecco 1 x (độ pH 7,2) và lọc vô trùng mẫu (0,2μm).

Thư viện thành thực CDR-L3 và CDR-H2

Để tăng ái lực và hoạt tính sinh học của mảnh kháng thể được chọn, tối ưu hóa song song vùng CDR-L3 và CDR-H2 bằng cách tạo đột biến catxet sử dụng đột biến trực tiếp tại ba nucleotit (Virnekas *et al.*, 1994, Nucleic Acids Res. 22:5600-5607), trong đó vùng khung hoạt động được giữ không đổi (Nagy *et al.*, 2002, Nature Medicine, 8:801-807). Trước khi tách dòng thư viện thuần thực, tất cả mảnh Fab gốc được chuyển từ vector biểu hiện pMORPH[®]X9 sang vector thành thực CysDisplay[™] pMORPH[®]25 ở vị trí giới hạn *XbaI/EcoRI*. Vector này có protein thực khuẩn thể pIII dung hợp với gốc xystein đầu N cũng như là gốc xystein đầu C dung hợp với chuỗi kháng thể Fd và do đó cho phép thực khuẩn thể gắn kết disulfua của mảnh Fab tương ứng trên bề mặt thực khuẩn thể.

Đối với thể hệ của thư viện CDR-H2 vùng CDR-H2 của mỗi Fab gốc được cắt bỏ và được thay thế bằng hợp thành thực CDR-H2 đa dạng cao .

Đồng thời, vùng CDR-L3 của dòng gốc được thay thế bằng hợp thành thực CDR-L3 được đa dạng hóa.

Kích thước của thư viện thành thực nằm trong khoảng từ 4×10^5 đến 1×10^8 dòng vô tính. Nền vector là dưới 1% trong mọi trường hợp. Kiểm tra chất lượng bằng sự sắp xếp có thứ tự của dòng đơn tính biểu hiện chất lượng cao của mỗi thư viện.

Đối với mỗi thư viện thành thực CDR-L3 và CDR-H2, thực khuẩn thể biểu hiện kháng thể được tạo thành và hàm lượng thực khuẩn thể được xác định bằng cách chuẩn độ vết.

Quy trình sàng lọc đối với sự thành thực ái lực

Thực khuẩn thể bội lệ kháng thể từ các thư viện thành thực sau đây được xử lý để tách dải mẫu và sàng lọc:

Vị trí chính 1: MOR07079 (L-CDR3 thuần thực)

Vị trí chính 1: MOR07079 (H-CDR2 thuần thực)

Sàng lọc thành thực bằng cách sử dụng kháng thể tương ứng được thực hiện trên hActRIIB/Fc và trên huSkMC biotiny hóa.

Thực khuẩn thể 2×10^{10} hoặc 1×10^{11} /mã phụ, được lấy từ thư viện thành thực được tạo mới được sử dụng cho vòng chọn lọc đầu tiên.

Nhiều sàng lọc khác nhau được thực hiện do đó vòng chọn lọc trên hActRIIB/Fc biotiny hóa tái tổ hợp được thay bằng vòng chọn lọc trên huSkMC.

Đối với vòng thứ nhất và thứ ba của dung dịch sàng lọc hActRIIB/Fc tái tổ hợp được biotiny hóa được bắt giữ trên Dynabead được phủ Streptavidin. Áp dụng các quy trình sau đây: đối với mỗi nhóm thực khuẩn thể, hạt Streptavidin được rửa bằng PBS và tái tạo huyền phù trong đệm phong tỏa. Trộn các hạt thực khuẩn thể được pha loãng trong PBS với đệm phong bế chứa 0,1% Tween20 và cố định trên mâm quay. Làm sạch trước các hạt thực khuẩn thể để loại bỏ thực khuẩn thể đã gắn kết vào Streptavidin hoặc thực khuẩn thể gắn vào hạt được thực hiện hai lần: mỗi nhóm thực khuẩn thể đã phong bế hạt Streptavidin được thêm vào các hạt thực khuẩn thể đã phong bế và được ủ trên mâm quay. Sau khi tách hạt thông qua thiết bị từ tính, dịch nổi thực khuẩn thể được chuyển sang ống phản ứng mới được đã phong bế trước và bước hấp phụ trước được lặp lại.

Sau các quy trình phong bế, thêm kháng nguyên hActRIIB/Fc đã biotiny hóa vào các hạt thực khuẩn thể được làm sạch trước và phong bế và ủ trên mâm quay. Phức hợp thực khuẩn thể-kháng nguyên được bắt giữ bằng cách sử dụng hạt

streptavidin được phong tỏa, thêm vào nhóm sàng mẫu thực khuẩn thể và tiếp tục ủ. Thu các hạt thực khuẩn thể gắn kết với hạt. Sau đó rửa các chuỗi bằng PBST và PBS. Rửa giải các hạt thực khuẩn thể từ hạt Streptavidin được thực hiện bằng cách thêm 20 mM DTT. Thu dịch rửa giải và sử dụng để nhiễm canh trường *E. coli* TG-1 được phát triển đến OD_{600nm} 0,6-0,8.

Sau khi nhiễm và sau đó ly tâm, tái huyền phù cặn vi khuẩn trong môi trường 2xYT, đổ đĩa trên các đĩa aga LB/CAM/Glc và ủ qua đêm ở 37°C. Sáng ngày kế tiếp, cạo khuẩn lạc khỏi đĩa và giải phóng thực khuẩn thể và khuếch đại phần lớn như được mô tả (Krebs et al., 2001) với ngoại lệ là các tế bào nhiễm thực khuẩn thể hỗ trợ được phát triển ở 22°C qua đêm trong môi trường chứa 0,25 mM IPTG. Vòng thứ ba lựa chọn mẫu hòa tan trên hActRIIB/Fc đã biotinyl hóa được thực hiện theo quy trình của vòng thứ nhất trừ khi giảm lượng kháng nguyên được sử dụng và giảm tính nghiêm ngặt của điều kiện rửa.

Đối với vòng sàng lọc mẫu thứ hai (trên huSkMC biểu hiện hActRIIB nội sinh), trộn các hạt thực khuẩn thể được pha loãng trong PBS với các thể tích PBS/BSA bằng nhau và được phong bế. Cùng lúc đó với mỗi mã phụ 9x10⁵ huSkMC được phong bế bằng PBS/FCS/0,02% NaN₃ ở 4°C. Tế bào được phong bế được kéo dài, tái huyền phù cùng với các hạt thực khuẩn thể được phong bế trước và được ủ thêm.

Rửa phức hợp thực khuẩn thể-tế bào bằng PBS/BSA, sau đó rửa trong PBS. Ly tâm tế bào ở 410xg trong 2 phút ở 4°C. Rửa giải các hạt thực khuẩn thể có tính axit từ hActRIIB biểu hiện huSkMC được thực hiện bằng bước ủ 10 phút bằng đệm glyxin, độ pH=2,2. Sau khi ly tâm, trung hòa nước rửa giải bằng cách thêm Tris không chứa đệm. Dịch nổi chứa thực khuẩn thể được sử dụng để nhiễm canh trường *E. coli* TG-1 được phát triển đến OD_{600nm} 0,6-0,8.

Sau khi nhiễm và sau đó ly tâm, tái tạo huyền phù các viên vi khuẩn trong môi trường 2xYT, đổ đĩa trên đĩa aga LB/CAM/Glc và ủ qua đêm ở 37°C. Sáng ngày kế tiếp, cạo khuẩn lạc khỏi đĩa và phục hồi và khuếch đại thực khuẩn thể như đã được mô tả (Krebs et al., 2001) với ngoại trừ rằng tế bào nhiễm thực khuẩn thể hỗ trợ được nuôi cấy ở 22°C qua đêm trong môi trường chứa 0,25mM IPTG.

Phương pháp đải mẫu thành công nhất dẫn đến mọi chất gắn kết có hiệu quả đã chứng minh là đải mẫu vi phân với vòng thứ nhất và thứ ba được thực hiện trên ActRIIB/Fc được biotinyl hóa và vòng thứ hai trên huSkMC.

Sau khi giả trình tự, Fab được lựa chọn để biểu hiện và tinh chế, và Fb có triển vọng nhất tiếp tục được nghiên cứu đặc tính.

Hầu hết kháng thể kháng ActRIIB đều thể hiện gắn kết với tế bào HEK293T/17 được chuyển nhiễm hActRIIB bằng giá trị EC50 trong phạm vi tối đa thấp hơn hai lần số nanomol. Một số Fabs có thể được thay thế myostatin từ ActRIIB/Fc trong myostatin gắn kết ELISA ức chế, nhưng trong số chúng chỉ MOR08067 thể hiện sự ức chế đầy đủ của hoạt tính cảm ứng bởi myostatin trong thử nghiệm gen thông báo (Fig. 2).

Ái lực tóm lược của những Fab có triển vọng đối với ActRIIB/Fc ở người và chuột được liệt kê ở bảng ở bảng dưới đây (Bảng 1).

Fab	Xác định KD (Biacore)	
	ActRIIB-Fc ở người KD [nM]	ActRIIB-Fc ở chuột KD [nM]
MOR07079	51	62
MOR08047	23	22
MOR08062	15	17
MOR08067	<0,1	<0,1
MOR08077	11	13
MOR08078	9	10

Bảng 1: Dữ liệu về ái lực của kháng-ActRIIB Fab-FH với kháng nguyên ActRIIB

Dòng Fab MOR08067 thể hiện sự ức chế tốt trong RGA cảm ứng myostatin cũng như gắn kết với tế bào HEK293 được chuyển nhiễm hActRIIB. Xác định ái lực bằng

Biacore thể hiện giá trị KD với ActRIIB/Fc ở người và chuột dưới 100 pM. MOR08067 và các ứng viên khác được lựa chọn để tối ưu hóa thêm bằng phương pháp tách dòng ngang, trong khi MOR08067, chứa vị trí glycosyl hóa gắn kết N tiềm ẩn cũng trải qua phương pháp loại glycosyl hóa.

Tối ưu hóa kháng thể có nguồn gốc từ ái lực thành thực đầu tiên

Loại glycosyl hóa MOR08067

Theo phân tích trình tự kháng thể này chứa vị trí glycosyl hóa gắn kết N tiềm ẩn bên trong CDR-H2 của chuỗi nặng. Loại bỏ vị trí này để thu được MOR08156 và MOR08159. Đặc trưng của các hợp chất này MOR08067 được mô tả sau đây.

a) Tách dòng chéo Fab tối ưu hóa

Để cải thiện chức năng và loại bỏ vị trí glycosyl hóa liên kết với N tiềm ẩn trong CDR-H2s và/hoặc CDR-L3s, vùng CDR-H2 và CDR-L3 được tối ưu hóa độc lập từ Fab thành thực ái lực do sự thành thực ái lực đầu tiên thành thực được kết hợp trong khi tiếp tục tách mỗi họ. Các thể hệ MOR07079 đi vào tách dòng ngang. Khảo nghiệm khoảng 200 dịch tan vi khuẩn trong ái lực FACS xếp hạng trên HEK293T/17/ActRIIB và dòng đơn tính Fab, MOR08144 và MOR08213 có triển vọng nhất được biểu hiện và tinh chế.

Xác định đặc trưng của kháng thể được tối ưu hóa

Trong các phần sau đây, các thể hệ loại glycosyl hóa của MOR08067 (MOR08156, MOR08159) và hai dòng vô tính chéo có nguồn gốc từ MOR08067 (MOR08144 và MOR08213) được mô tả chi tiết.

Khả năng của Fab được tối ưu ức chế tín hiệu myostatin trong thử nghiệm gen thông báo được xác định, với tất cả các chất gắn kết có khả năng cảm ứng > 95% sự ức chế ở nồng độ cao nhất (Fig. 3).

Trong thí nghiệm xác định ái lực sử dụng Biacore, MOR08159 và MOR08213 được nhận dạng là chất gắn kết có tiềm năng cao với cả ActRIIB ở người và chuột (bảng 2). Rõ ràng là, khi ái lực của các Fab thành thực và tối ưu tăng phản ánh hiệu lực trong thử nghiệm gen thông báo cảm ứng bởi myostatin cũng tăng.

Fab	Xác định KD (Biacore)	
	ActRIIB-Fc KD ở người [pM]	ActRIIB-Fc KD ở chuột [pM]
MOR08159	3,8	3,1
MOR08213	13,2	13,5

Bảng 2: Dữ liệu ái lực của Fab kháng-ActRIIB với kháng nguyên ActRIIB

Biến đổi IgG2 của các Fab thành thực ái lực (Thành thực lần 1)

Fab có triển vọng nhất bắt nguồn từ sự thành thực ái lực đầu tiên được chọn từ biến đổi IgG2.

Biểu hiện IgG2 được thực hiện bằng sự chuyển nhiễm tạm thời của tế bào HKB11 và globulin miễn dịch chiều dài nguyên vẹn được tinh chế từ dịch nổi canh trường tế bào. Khi biến đổi IgG, tất cả các ứng viên giữ lại khả năng của chúng phụ thuộc liều ức chế hoạt tính cảm ứng myostatin trong thử nghiệm gen chỉ thị. (bảng 3).

IgG	IC50 [nM]	% ức chế
MOR08067	2,57	86,5
MOR08144	0,5	94,9
MOR08156	0,19	97,4
MOR08159	0,32	99
MOR08213	0,32	98,6

Bảng 3: Xác định IC50 của IgG kháng-ActRIIB trong thử nghiệm gen thông báo luxiferaza cảm ứng bởi myostatin

MOR08159 và MOR08213 được khảo nghiệm cho khả năng gắn kết với nguyên bào cơ sơ cấp ở người bằng FACS, và gắn kết đặc hiệu với các tế bào này được báo cáo, tương ứng với biểu hiện thấp của ActRIIB trên các tế bào này (Fig. 4).

MOR08159 và MOR08213 biểu hiện khả năng nghịch đảo hoàn toàn sự ức chế cảm ứng myostatin của biệt hóa nguyên bào xương thứ cấp (Fig. 5). Các kháng thể này cũng tăng sự biệt hóa mức cơ bản trên đây khi vắng mặt myostatin ngoại sinh, do chúng có thể trung hòa các phối tử ActRIIB được tạo ra nội sinh.

Thành thực ái lực lần thứ hai

Chọn lọc các ứng viên thành thực ái lực lần thứ hai để cải thiện hiệu lực.

1. Xây dựng thư viện thành thực CDR-L3 và CDR-H2

Để tăng ái lực và hoạt tính sinh học của các mảnh kháng thể được chọn (ví dụ, MOR08067), các vùng CDR-L1 và CDR-H2 được tối ưu hóa bằng hợp gây đột biến bằng cách sử dụng đột biến điểm định hướng bộ 3 nucleotit (Virnekas *et al.* [*supra*]), do đó vùng khung được giữ cố định (Nagy *et al.* [*supra*]). Trước khi tách dòng thành thực, tất cả các mảnh Fab gốc được chuyển từ vector biểu hiện pMORPH[®]X9 vào vector thành thực CysDisplay[™] pMORPH[®]25 qua vị trí giới hạn *XbaI/EcoRI*.

Kích thước của tất cả thư viện thành thực thu được luôn tối thiểu 1×10^7 dòng vô tính độc lập. Nền vector dưới 1% trong mọi trường hợp. Đối chứng chất lượng bằng cách sắp xếp dòng vô tính đơn bội lộ chất lượng cao của mỗi thư viện.

Đối với mỗi thư viện thành thực CDR-L1 và CDR-H2, thực khuẩn thể biểu hiện kháng thể được chuẩn bị và chuẩn độ thực khuẩn thể được xác định bằng chuẩn độ điểm.

ii. Kế hoạch đãi mẫu, phân loại ái lực và sàng lọc cho kháng thể được cải tiến

Đãi mẫu vi sai cho vòng hai của thành thực ái lực được bao gồm tế bào HEK293T/17 gốc và huSkMC biểu hiện ActRIIB ở người nội sinh ở mức thấp. Hơn nữa, kháng nguyên hActRIIB/Fc biotinyl hóa tái tổ hợp được bao gồm trong toàn bộ kế hoạch đãi mẫu.

Để phân loại Fab kháng-ActRIIB, khoảng 2700 dịch tan vi khuẩn (~ 88 dòng vô tính với mỗi mã phụ đãi mẫu) là ái lực được phân loại dựa trên kháng nguyên

hActRIIB/Fc biotinyI hóa tái tổ hợp và chế phẩm mụn màng của tế bào HEK293T/17 chuyển nhiễm hActRIIB trong phương pháp dựa vào MSD. Kết quả với nhân tố phân loại ái lực cao được sắp xếp.

Hơn nữa, dòng đơn tính được chọn ngẫu nhiên không thể hiện khi kết quả được đánh giá trong phân loại ái lực FACS. Vì vậy, dịch tan vi khuẩn được sàng lọc bằng cách sử dụng HEK293T/17 và/hoặc tế bào HEK293T/17 chuyển nhiễm hActRIIB gốc. Fab gắn kết tế bào được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp IgG kháng-người dê tiếp hợp phycoerythrin (H+L). Định lượng biểu hiện Fab trong dịch tan được thực hiện đồng thời.

Tất cả các kế hoạch sàng lọc mẫu thu được kháng thể đặc hiệu kháng ActRIIB. Các thể hệ MOR08067 có thể được nhận dạng sau khi phân tích trình tự. Tất cả các chất gắn kết được làm thành thực trong CDR-H2.

Biến đổi IgG2 và đặc trưng của IgG2 (Thành thực lần thứ 2)

Mặt khác, Fab có triển vọng nhất có nguồn gốc từ thành thực ái lực thứ hai được lựa chọn cho biến đổi IgG2. Biểu hiện IgG2 được thực hiện bằng sự chuyển nhiễm tạm thời của tế bào HKB11 và globulin miễn dịch chiều dài đầy đủ được tinh chế từ dịch nổi canh trường tế bào. Toàn bộ IgG thử nghiệm có thể đảo ngược hoàn toàn ức chế cảm ứng myostatin của sự biệt hóa nguyên bào cơ xương sơ cấp. (bảng 4).

IgG	Thử nghiệm CK IC50 [nM]
MOR08159	1,89
MOR08213	1,7
MOR08806	0,52
MOR08807	5,02
MOR09032	1,02
MOR09058	2,3

Bảng 4: Xác định IC50 của IgG kháng-ActRIIBs trong ức chế cảm ứng bởi myostatin trong thử nghiệm biệt hóa cơ xương

Đánh giá khả năng của kháng-ActRIIB Ab để trung hòa gắn kết của myostatin cũng như phối tử họ TGF β khác với ActRIIB trên nguyên bào cơ xương sơ cấp ở người. Trong thử nghiệm biệt hóa nguyên bào cơ, đánh giá tiềm năng ức chế sự biệt hóa phối tử khác nhau với sự vắng mặt hoặc có mặt của MOR08159 hoặc MOR08213.

	không chứa Ab		MOR08159		MOR08213	
Phối tử họ TGF β	IC ₅₀ (ng/ml)	E _{max} (% đối chứng)	IC ₅₀ (ng/ml)	E _{max} (% đối chứng)	IC ₅₀ (ng/ml)	E _{max} (% đối chứng)
Myostatin	8,5 $\pm$ 0,6	25,7 $\pm$ 1,5	42,7 $\pm$ 5,8	28,9 $\pm$ 4,8	35,1 $\pm$ 5,1	35,3 $\pm$ 4,5
GDF-11	7,0 $\pm$ 1,2	23,2 $\pm$ 3,8	13,3 $\pm$ 0,9	22,1 $\pm$ 2,1	12,0 $\pm$ 1,0	27,1 $\pm$ 2,6
Activin A	14,7 $\pm$ 2,9	37,1 $\pm$ 3,9	34,7 $\pm$ 9,0	61,9 $\pm$ 5,4	41,9 $\pm$ 3,4	57,2 $\pm$ 1,9
BMP-2	26,9 $\pm$ 2,6	2,6 $\pm$ 4,2	34,0 $\pm$ 2,6	5,1 $\pm$ 3,4	32,3 $\pm$ 1,4	4,8 $\pm$ 1,9

Bảng 5: Xác định IC₅₀ và E_{max} của ức chế cảm ứng phối tử khác nhau của thử nghiệm biệt hóa cơ xương với sự có mặt hoặc không có mặt của MOR08159/MOR08213 (10 μ g/ml)

Myostatin và GDF-11 có thể ức chế sự biệt hóa nguyên bào cơ ở người với hiệu quả tương tự và với phạm vi tương tự. Với sự có mặt của nồng độ đơn của MOR08159 hoặc MOR08213, đáp ứng liều myostatin và GDF-11 được thay đổi theo cách tương tự. Activin A cũng có thể ức chế sự biệt hóa, tuy nhiên với sự có mặt của MOR08159 hoặc MOR08213, quan sát thấy sự thay đổi không đồng thời đi kèm bởi sự thay đổi trong E_{max} và hiệu lực. Đáp ứng BMP-2 không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của MOR08159 hoặc MOR08213, gợi ý là nó không xuất hiện thông qua sự gắn kết ActRIIB.

Xác định đặc trưng của kháng thể kháng-ActRIIB trong nghiên cứu chuột *in vivo*

Đánh giá khả năng kháng-ActRIIB để gây ra chứng phì đại cơ trong chuột SCID sử dụng tiêm màng bụng (i.p.) MOR08159 hoặc MOR08213, 10mg/kg i.p. mỗi tuần trong 6 tuần (Fig. 6).

Cả hai kháng thể có thể gây ra phì đại hoàn toàn của toàn bộ cơ kiểm chứng ở cuối nghiên cứu. Tầm quan trọng tăng trong tổng thể trọng của chuột được điều trị kháng thể kháng-ActRIIB được phát hiện sớm ngay sau 1 tuần điều trị.

MOR08213 có thể gây ra sự phì đại hoàn toàn phụ thuộc liều của tất cả cơ kiểm chứng ở 5 và 25 mg/kg trong khi không có thay đổi đáng kể được nhận thấy ở liều 1mg/kg (Fig. 7).

Nghiên cứu phong bế chéo

Duy trì tế bào HEK293T/17 chuyển nhiễm ổn định ActRIIB trong DMEM chứa 10% FBS, 2mM L-glutamin, penixilin (50 IE/ml), streptomycin (50µg/ml) và puromycin (2µg/ml). Nuôi tế bào trong thiết bị ủ ở 37°C và CO₂ 5 % và nuôi cấy thứ cấp mỗi 3-4 ngày. Tách bỏ tế bào bằng cách sử dụng Accutase™ và sau đó chuyển vào trong bình mới chứa môi trường sạch.

Đánh giá khả năng kháng thể kháng-ActRIIB gắn kết với cùng một epitop ActRIIB của người bằng FACS sử dụng tế bào biểu hiện hActRIIB.

Vì điều này, ủ IgG kháng-ActRIIB với 1×10^5 tế bào chuyển nhiễm hActRIIB/giếng trong 1 giờ ở 4°C. Sau khi rửa, ủ IgG kháng-ActRIIB biotin hóa khác hoặc IgG biotin hóa đối chứng ở nồng độ đẳng mol với IgG kháng ActRIIB đầu tiên trong 1 giờ ở 4°C. Sau khi rửa, phát hiện IgG biotin hóa gắn kết tế bào bằng streptavidin-APC (Biolegend). Sau một giờ ủ ở 4°C, rửa lại tế bào và tái huyền phù trong đệm FACS và xác định mật độ huỳnh quang của tế bào trong thiết bị FACSArray™.

Thử nghiệm khả năng gắn kết đồng thời của MOR08159 và MOR08213 với tế bào chuyển nhiễm ActRIIB của người bằng FACS, và báo cáo gắn kết đặc hiệu của một mình MOR08159 (bôi đen đậm nét) hoặc khi có mặt MOR08213 (nét đứt đậm nét) so với isotyp đối chứng (màu đen) hoặc isotyp đối chứng khi có mặt MOR08213 (nét đứt) (Fig. 8).

Khi có mặt MOR08213, gắn kết của MOR08159 bị giảm đáng kể gợi ý rằng hai kháng thể này gắn kết với cùng vị trí hoặc với các vị trí có thể có một vài mức độ nổi

chồng, hoặc gắn kết của MOR08213 với vị trí khác biệt nhưng gần, có thể gây cản trở không gian gắn kết của MOR08159.

Lập bản đồ epitop

Sử dụng một số phương pháp bổ sung để xác định epitop gắn kết kháng thể MOR08159. Trong ví dụ này, đánh số gốc với sự tham chiếu trình tự axit amin ActRIIB chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO: 181).

Lai điểm (Dot blot)

Tiến hành phân tích lai điểm của epitop MOR08159. Chấm ActRIIB nguyên bản và biến tính (bị khử và làm biến tính nhiệt) lên trên màng nitrocellulose, dò bằng MOR08159, và phát hiện bằng kháng thể kháng kháng thể của người được gắn nhãn. Chỉ phát hiện ActRIIB nguyên bản, nhưng không phát hiện ActRIIB khử và biến tính do nhiệt. Kết quả cho thấy rằng epitop là epitop cấu hình.

Nghiên cứu đột biến

Tạo thư viện vùng ngoại bào của ActRIIB (aa 21 – 120) bằng PCR ưu tiên lỗi và biểu hiện các biến thể trong chu chất của *E. coli*. Thử nghiệm sự gắn kết của khoảng 30000 (phần nhỏ của kích thước thư viện theo lý thuyết) biến thể này đối với MOR08159 bằng sàng lọc để lọc khuẩn lạc và nhuộm western. Xác định các biến thể chỉ thể hiện yếu hoặc không gắn kết với MOR08159 bởi ELISA. Mức biểu hiện (được phát hiện bằng kháng thể kháng kháng thể Flag) và so sánh sự gắn kết MOR08159 của các biến thể ActRIIB với ActRIIB kiểu dại. Nếu biểu hiện tối thiểu là 75% kiểu dại và gắn kết với MOR08159 nhỏ hơn 25%, biến thể được đánh giá là có liên quan trong gắn kết MOR08159. Xem xét chỉ những biến thể có đột biến điểm duy nhất, mà không biến dạng cấu trúc rõ ràng (như ví dụ, đột biến cysteine tạo cầu S-S).

Hầu hết các đột biến có gắn kết MOR08159 bị ngăn cản được tìm thấy trong dải từ vị trí K75 đến D81, chỉ ra rằng vùng này quan trọng cho gắn kết kháng thể. Các đột biến ở vị trí W78, D80 và D81 được phát hiện là làm giảm gắn kết MOR08159 đáng kể.

Dàn peptit vòng

Ủ tập hợp các peptit vòng dẫn xuất từ kháng nguyên trình diện trên chip peptit với kháng thể quan tâm. Tiến hành xác định gắn kết kháng thể peptit bằng phân tích RepliTope trong đó ủ chip peptit với kháng thể sơ cấp sau đó là kháng thể thứ cấp đánh dấu huỳnh quang định hướng kháng phần Fc của kháng thể sơ cấp. Sau một số bước rửa, làm khô chip peptit bằng cách sử dụng ly tâm chip và quét trong hệ thống quét chip có độ phân tách cao với các thiết lập bước sóng thích hợp.

Chip bao gồm ba dàn phụ, mỗi dàn phụ thể hiện peptit vòng có nguồn gốc từ ActRIIB (với gốc Cys được đổi thành Ser), mà được quét (định dạng quét peptit 15/12). Với thử nghiệm đối chứng, thực hiện ủ chip với kháng thể không liên quan (ACE18543, mẫu đối chứng isotop) sau đó là kháng thể thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang (kháng IgG của người đánh dấu Cy-5) để xác định tín hiệu dương tính giả. Ngoài ra, thực hiện ủ với kháng thể đích, sau đó ủ với kháng thể thứ cấp đánh dấu huỳnh quang.

Kháng thể MOR08159 (ACE19819) được thể hiện là nhận dạng một epitop, mà được tìm thấy trong ba peptit được thử nghiệm (số 18-20).

18 IELVKKGSWLDDFNS (SEQ ID NO: 183)

19 VKKGSWLDDFNSYDR (SEQ ID NO: 184)

20 GSWLDDFNSYDRQES (SEQ ID NO: 185)

Trình tự thông thường đối với các peptit này mà MOR08159 được coi là gắn kết với là 76GCWLDDFNC84 (SEQ ID NO: 186).

Vùng thứ hai có các đặc tính gắn kết yếu hơn cũng được nhận dạng bằng cách sử dụng phương pháp này. Vùng thứ hai này có trình tự 49CEGEQDKRLHCYASW63 (SEQ ID NO: 187).

Tinh thể học tia X

Biểu hiện aa20-120 và aa24-117 của ActRIIB ở người. Ngoài ra, biểu hiện và tinh sạch vùng Fab và Fv MOR08159 (thực hiện tất cả các biểu hiện trong *E. coli*). Sử dụng các protein này, bốn phức protein (Fab MOR08159- 20-120 ActRIIB, Fab

MOR08159- 24-117 ActRIIB, Fv MOR08159- 20-120 ActRIIB, Fv MOR08159- 24-117 ActRIIB) được chuẩn bị, tinh sạch và kết tinh hóa

Cấu trúc tia X của Fab MOR08159 tự do được phân giải đến độ phân giải 1,78Å. Cấu trúc tia X của phức Fv với ActRIIB-LBD được phân tách đến độ phân giải 3,35Å. Bằng cách sử dụng khoảng cách 3,9Å tiêu chuẩn giới hạn xác định các gốc tiếp xúc, có thể xác định được rằng trình tự 76GCWLDDFNC84 là vùng quan trọng với phân bố gắn kết tính trạng trội từ trình tự 78WLDDFN83 (SEQ ID NO: 188). Hơn nữa, sự tương tác cũng được phát hiện với vùng peptit 49CEGEQDKRLHCYASW63.

Kết quả cho thử nghiệm bản đồ epitop được tóm tắt trong Fig. 9.

Xác nhận ái lực bằng SET

Chuẩn bị các pha loãng theo dãy của kháng nguyên (miền ngoại bào của ActRIIB hoặc ActRIIA) trong PBS 0,5% (khối lượng/thể tích) BSA/0,02% (khối lượng/thể tích) Tween 20 và thêm kháng thể (MOR08159) vào mỗi nồng độ kháng nguyên đến khi đạt được nồng độ kháng thể không đổi. Phân phối hai lần 100µl/giếng mỗi hỗn hợp pha loãng vào đĩa polypropylen MTP 96 giếng (Greiner). Đệm thử nghiệm đóng vai trò làm đối chứng âm và mẫu không chứa kháng nguyên làm đối chứng dương (Bmax). Đậy kín đĩa và ủ qua đêm. Phủ đĩa 96 giếng High Bind MTP (Meso Scale Discovery) bằng 25µl ActRIIB-Fc của chuột nồng độ 0,1µg/ml được pha loãng trong PBS. Sau đó, đậy kín đĩa này và ủ qua đêm ở 4°C. Sau khi ủ, rửa High Bind MTP được phủ kháng nguyên bằng PBS/0,05% (khối lượng/thể tích) Tween 20. Sau đó, phong bế đĩa bằng PBS/5% (khối lượng/thể tích) BSA. Lặp lại các bước rửa và chuyển 50µl/giếng chế phẩm kháng thể-kháng nguyên từ đĩa polypropylen MTP sang đĩa High Bind MTP phủ kháng nguyên. Ủ High Bind MTP trong 25 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau ba bước rửa bổ sung, thêm 25µl/giếng kháng thể phát hiện của dê kháng kháng thể của người đánh dấu Sulfo-Tag (Meso Scale Discovery) nồng độ 1µg/ml được pha loãng trong đệm thử nghiệm và ủ trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa đĩa, chuyển 50µl Read Buffer (Meso Scale Discovery) vào trong mỗi giếng. Tạo và phát hiện tín hiệu quang hóa điện tử (ECL) bằng thiết bị đọc Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

Các giá trị ECL được lập biểu đồ với nồng độ kháng nguyên tương ứng. K_D được xác định bằng cách khớp biểu đồ với mô hình khớp được mô tả bởi Piehler J, *et al.* (J Immunol Methods; 1997, 201(2): 189-206).

Giá trị K_D và độ lệch chuẩn báo cáo được xác định từ các giá trị K_D riêng lẻ thu được từ các thử nghiệm độc lập.

Từ các thử nghiệm này, xác định được giá trị trung bình của hằng số cân bằng K_D là 1,73 ($\pm 0,31$) pM đối với ActRIIB ở người, trong khi xác định được giá trị trung bình của hằng số cân bằng phân ly K_D là 434 (± 25) pM đối với ActRIIA.

Được hiểu rằng sáng chế được mô tả chỉ bằng cách ví dụ và các sửa đổi có thể được thực hiện mà vẫn nằm trong phạm vi và tinh thần của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng đã nêu gắn kết với miền gắn kết phối tử của ActRIIB, và trong đó kháng thể này bao gồm CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9 và 11; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 23 và 25; CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37 và 39; CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 51 và 53; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 65 và 67; và CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 79 và 81.
2. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng đã nêu gắn kết với ActRIIB giữa các axit amin 19-134 của SEQ ID NO: 181.
3. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng đã nêu gắn kết với ActRIIB với K_D nhỏ hơn hoặc bằng 1nM.
4. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng đã nêu gắn kết với ActRIIB với K_D nhỏ hơn hoặc bằng 100pM.
5. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể đã nêu hoặc mảnh chức năng của nó ức chế myostatin gắn kết với ActRIIB.
6. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này ức chế sự truyền tín hiệu do myostatin kích thích bằng thử nghiệm gen thông báo phụ thuộc Smad.

7. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này gắn kết với ActRIIB với ái lực gấp 10 lần hoặc cao hơn so với ái lực gắn kết với ActRIIA.

8. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm:

(a) CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 23; CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37; CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65; và CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 79; hoặc

(b) CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 11; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 25; CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 39; CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 67; và CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 81.

9. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó chứa:

(a) trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 93 và trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 107; hoặc

(b) trình tự biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 95 và trình tự biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 109.

10. Kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng này gắn kết với epitop chứa hoặc bao gồm:

(a) các axit amin 78-83 của SEQ ID NO: 181 (WLDDFN—SEQ ID NO:188); hoặc

(b) các axit amin 76-84 của SEQ ID NO: 181 (GCWLDDFNC—SEQ ID NO:186); hoặc

(c) các axit amin 75-85 của SEQ ID NO: 181 (KGCWLDDFNCY—SEQ ID NO:190); hoặc

(d) các axit amin 52-56 của SEQ ID NO: 181 (EQDKR—SEQ ID NO:189); hoặc

(e) các axit amin 49-63 của SEQ ID NO: 181 (CEGEQDKRLHCYASW—SEQ ID NO:187); hoặc

(f) các axit amin 78-83 của SEQ ID NO: 181 (WLDDFN) và các axit amin 52-56 của SEQ ID NO: 181 (EQDKR).

11. Kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này thuộc isotyp của IgG1.

12. Kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này được biến đổi chức năng tác động thông qua đột biến vùng Fc.

13. Trình tự polynucleotit phân lập được mã hóa vùng biến đổi trên chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh chức năng đã nêu gắn kết với miền gắn kết phối tử của ActRIIB, và trong đó kháng thể này bao gồm CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9 và 11; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 23 và 25; CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37 và 39; CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 51 và 53; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 65 và 67; và CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 79 và 81.

14. Vector tách dòng chứa một hoặc nhiều bản sao của trình tự polynucleotit phân lập được theo điểm 13.

15. Vector biểu hiện chứa một hoặc nhiều bản sao của trình tự polynucleotit phân lập được theo điểm 13.
16. Tế bào chủ chứa một hoặc nhiều bản sao của vector theo điểm 14 hoặc 15.
17. Quy trình điều chế kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm các bước nuôi cấy tế bào chủ chứa vector tách dòng hoặc vector biểu hiện mã hóa kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, và phân lập kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó.
18. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.
19. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó dược phẩm này còn chứa chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.
20. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung.
21. Dược phẩm theo điểm 20, trong đó hoạt chất bổ sung đã nêu được chọn từ IGF-1, IGF-2 hoặc các biến thể có hoạt tính của IGF-1 hoặc IGF-2, kháng thể kháng myostatin, tiền peptit myostatin, protein bảo vệ myostatin mà gắn kết với ActRIIB nhưng không hoạt hóa nó, chất chủ vận beta 2, chất chủ vận Ghrelin, SARM, chất chủ vận/chất bắt chước GH, và follistatin.
22. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1.
23. Kháng thể được mã hóa bởi pBW524 (DSM22874).
24. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm trình tự biến đổi chuỗi nặng và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự biến đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 93.
25. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm trình tự biến đổi chuỗi nặng và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự biến đổi chuỗi nặng này chứa: CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng chứa

26. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm: trình tự biến đổi chuỗi nặng và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự biến đổi chuỗi nặng này chứa SEQ ID NO: 107.

27. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm: trình tự biến đổi chuỗi nặng và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự biến đổi chuỗi nhẹ chứa: CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 51, CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 65; và CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 79.

28. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm:

CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 9; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 23; CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 37; CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 51; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65; và CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 79.

29. Kháng thể kháng ActRIIB hoặc mảnh chức năng chứa phần gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm:

CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 11; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 25; CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nặng của SEQ ID NO: 39; CDR1 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 53; CDR2 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 67; và CDR3 của vùng biến đổi trên chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 81.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Novartis AG

<120> Kháng thể kháng thụ thể activin IIB (ActRIIB), quy trình điều chế và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> 53508

<150> US 61/173004

<151> 2009-04-27

<150> US 61/306137

<151> 2010-02-19

<160> 190

<170> Patentin bản 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 1

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 2

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 3

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 4

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 5

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 6

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 7

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 8

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 9

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 10

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 11

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 12

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 13

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 14

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Tyr	Ile	Asn
1				5					10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 15

Thr	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 16

Thr	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 17

Thr	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 18
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 18

Thr	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 19

Met	Ile	Asn	Ala	Pro	Ile	Gly	Thr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 20

Gln	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Gly	Met	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 21
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 21

Met	Ile	Asn	Ala	Pro	Ile	Gly	Thr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 22

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

Gly

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 23

Thr	Ile	Asn	Pro	Val	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 24
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 24

Gln	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Gly	Met	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 25

Asn	Ile	Asn	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 26

Thr	Ile	Asn	Pro	Pro	Thr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 27
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 27

Gly	Ile	Asn	Pro	Pro	Ala	Gly	Thr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 28

Asn	Ile	Asn	Pro	Ala	Thr	Gly	His	Ala	Asp	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 29

Gly	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr
1				5	

<210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 30

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 31

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 32

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 33

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 34

Gly	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr
1				5	

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 35

Gly	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr
1				5	

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 36

Gly	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr
1				5	

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 37

Gly	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr
1				5	

<210> 38

<211> 6

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 38

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 39

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 40

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 41

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 42

Gly Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 43
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 43

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 44

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 45

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
 1 5 10

<210> 46
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 46

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn
1				5					10				

<210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 47

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn
1				5					10				

<210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 48

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn
1				5					10				

<210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 49

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 50

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 51

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 52

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 53

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn
1				5					10				

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 54

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn
1				5					10				

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 55

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn
1				5					10				

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 56

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn
1				5					10				

<210> 57

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 57

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 58

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 59

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 60

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 61

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 62

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 63

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 64

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 65

<211> 11

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 65

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 66

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 67

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 68

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 69

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 70

Leu	Met	Ile	Tyr	Gly	Val	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 71

Gln	Ala	Trp	Thr	Ser	Lys	Met	Ala	Gly
1				5				

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 72

Ser	Ser	Tyr	Thr	Arg	Met	Gly	His	Pro
1				5				

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 73

Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Gly	Val	Thr	Pro	Pro
1				5					10

<210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 74

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 75

Gln	Ala	Trp	Thr	Ser	Lys	Met	Ala	Gly
1				5				

<210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> CDR

<400> 76

Gln Ala Trp Thr Ser Lys Met Ala Gly
1 5

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 77

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 78

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 79

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> CDR

<400> 80

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 81

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 82

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 83

Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Gly
1				5					10

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> CDR

<400> 84

Gly Thr Phe Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 85

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Thr Ser Lys
85 90 95

Met Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 86

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 86

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Gly His Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 87

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 87

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Gly Lys Gly
85 90 95

Val Thr Pro Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 88
<211> 113
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 88

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 89
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 89

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Thr Ser Lys
 85 90 95

Met Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 90

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Thr Ser Lys
85 90 95

Met Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 91
<211> 113
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 91

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 92
<211> 113
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 92

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 93
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 93

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 94
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 94

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 95

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 95

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 96
<211> 113
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 96

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 97
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 97

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 98
 <211> 113

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 98

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 99
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 99

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Asn 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 100
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 100

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Asn 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 101
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 101

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Asn 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 102
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 102

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Asn 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 103
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 103

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Met Ile Asn Ala Pro Ile Gly Thr Thr Arg 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 104

<211> 115

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 104

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 105

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Met Ile Asn Ala Pro Ile Gly Thr Thr Arg 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 106
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 106

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Asn Thr Arg 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 107
 <211> 115

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 107

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Ser 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser
 115

<210> 108

<211> 115

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 108

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 109

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ile Thr Leu 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 110
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 110

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Pro Thr Gly Gly Thr Tyr 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 111
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 111

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Pro Ala Gly Thr 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 112
<211> 115
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 112

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Ala Thr Gly His Ala Asp 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser
115

<210> 113

<211> 336

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 113

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc caggcttgga cttctaagat ggctggtgtg 300
tttggcggcg gcaçgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 114
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 114
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc tcttcttata ctcgtatggg tcatcctgtg 300
 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 115
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 115
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc gctacttatg gtaagggtgt tactcctcct 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 116
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 116
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 117
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 117
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc caggcttgga cttctaagat ggctggtgtg 300
 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 118
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VL

<400> 118
 gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc caggcttgga cttctaagat ggctggtgtg 300

tttggcgggc gcacgaagtt aaccgttctt ggccag 336

<210> 119
<211> 339
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 119
gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 120
<211> 339
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 120
gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 121
<211> 339
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 121

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

<210> 122

<211> 339

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 122

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccggt cttggccag	339

<210> 123

<211> 339

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 123

gatatcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg	180
agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240

caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtgggttc ttattatggt 300
gtgttttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 124
<211> 339
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 124
gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtactg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtgggttc ttattatggt 300
gtgttttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 125
<211> 339
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 125
gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtgggttc ttattatggt 300
gtgttttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag 339

<210> 126
<211> 339
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> VL

<400> 126

gatatcgcac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc	60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag	120
catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgggtgttt ctaagcgccc ctcaggcgtg	180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg	240
caagcgggaag acgaagcggg ttattattgc ggtacttttg ctggtgggtc ttattatggt	300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtt cttggccag	339

<210> 127

<211> 345

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 127

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagt	60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc	120
cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac	180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat	240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt	300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacgggta gctca	345

<210> 128

<211> 345

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 128

caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagt	60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc	120
cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac	180

gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 129
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 129
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac 180
 gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 130
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 130
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgtcttac 180
 gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 131
 <211> 345

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 131

```
caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc      120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcatg attaatgctc ctattggtac tactcgttat      180
gctcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat      240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt      300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca                        345
```

<210> 132

<211> 345

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 132

```
caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc      120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggccag attaatgctg cttctggtat gactcgttat      180
gctcagaagt ttcagggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat      240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt      300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca                        345
```

<210> 133

<211> 345

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> VH

<400> 133

```
caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc      120
```

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcatg attaatgctc ctattggtac tactcgttat 180
gctcagaagt ttcaggggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 134
<211> 345
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 134
caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcact atcaatccgg tttctggcaa tacgcgttac 180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 135
<211> 345
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 135
caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcact atcaatccgg tttctggctc tacgtcttac 180
gcgcagaagt ttcagggccg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 136
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 136
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccgata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggccag attaattgctg cttctggtat gactcgttat 180
 gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgatgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 137
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 137
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccgata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaattgctg ctgctggtat tactctttat 180
 gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgatgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 138
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 138
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcact attaatactc ctactggagg tacttattat 180
 gctcagaagt ttcaggggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 139
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 139
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagt 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcgtg attaatactc ctgctggtac tacttcttat 180
 gctcagaagt ttcaggggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 140
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> VH

<400> 140
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagt 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagt gatgggcaat attaatactg ctactggtca tgctgattat 180
 gctcagaagt ttcaggggtcg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gcagcctgcg tagcgaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtggtggt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctca 345

<210> 141
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 141

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 142

<211> 217

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ

<400> 142

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 143
<211> 217
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ

<400> 143

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 144
<211> 217
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ

<400> 144

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 145
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ

<400> 145

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 146
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 146

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Ser 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
145					150					155					160
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
				165					170						175
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
			180					185					190		
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
		195					200					205			
Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
	210					215					220				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
			260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
		275					280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
	290					295					300				
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305					310					315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335	
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
			340					345					350		
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
		355					360					365			

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 147

<211> 445

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 147

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 148
<211> 445
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng

<400> 148

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ile Thr Leu 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 149
<211> 445
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 149

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Pro Ala Gly Thr 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	195	200	205
Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	210	215	220
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	260	265	270
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	290	295	300
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	305	310	315
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	325	330	335
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	340	345	350
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	355	360	365
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	370	375	380
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	385	390	395
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	405	410	415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 150
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 150

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Ala Thr Gly His Ala Asp 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 151
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 151

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 152

<211> 217

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ

<400> 152

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 153

<211> 217

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ

<400> 153

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 154

<211> 217

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ

<400> 154

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 155

<211> 217

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ

<400> 155

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Ala Gly Gly
 85 90 95

Ser Tyr Tyr Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 156
<211> 441
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng

<400> 156

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Thr Ile Asn Pro Val Ser Gly Ser 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 157

<211> 441

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 157

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 158
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 158

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Ala Ala Ala Gly Ile Thr Leu 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 159
<211> 441
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng

<400> 159

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 Ser
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Pro Ala Gly Thr 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 160
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 160

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 Ser
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Ala Thr Gly His Ala Asp 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 Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 225 230 235 240

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 245 250 255

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 260 265 270

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
305 310 315 320

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
325 330 335

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
340 345 350

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
370 375 380

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 161

<211> 651

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ

<400> 161
 cagagcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc caggccagtc tatcacaatc 60
 agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag 120
 caccocggca agggcccca gctgatgac tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg 180
 tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg 240
 caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcggatc atactacggc 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc cccagcgtg 360
 accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420
 atcagcgact tctaccagc cgccgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480
 aaggccggcg tggagaccac caccocccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540
 agctacctga gcctgacccc cgagcagtgg aagagccaca ggtcctacag ctgccagggtg 600
 acccagcagg gcagcaccgt ggaaaagacc gtggcccca cagagtgcag c 651

<210> 162
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 162
 cagagcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc caggccagtc tatcacaatc 60
 agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag 120
 caccocggca agggcccca gctgatgac tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg 180
 tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg 240
 caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcggatc atactacggc 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc cccagcgtg 360
 accctgttcc cccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420
 atcagcgact tctaccagc cgccgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480
 aaggccggcg tggagaccac caccocccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540
 agctacctga gcctgacccc cgagcagtgg aagagccaca ggtcctacag ctgccagggtg 600
 acccagcagg gcagcaccgt ggaaaagacc gtggcccca cagagtgcag c 651

<210> 163
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 163
 cagagcgcac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catccccgga aggcgcccga acttatgatt tatgggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
 actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggagatag cagccccgtc 480
 aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 164
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 164
 cagagcgcac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggt tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catccccgga aggcgcccga acttatgatt tatgggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
 agcaaccggt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360

actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
 aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 165
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 165
 cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
 tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
 catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgggtgttt ctaagcgtcc ctccaggcgtg 180
 agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
 caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
 gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
 actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
 ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
 aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
 acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 166
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 166
 caggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaagggtg 60

tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcagctaca tcaactgggt ccgccaggct	120
cctgggcagg gactggagtg gatgggcacc atcaaccccg tgtccggcag caccagctac	180
gcccagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca ccagcatcag caccgcctac	240
atggagctgt ccaggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caggggcggc	300
tggttcgact actggggcca gggcaccctg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc	360
cccagcgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacct ccggcggcac agccgccctg	420
ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg	540
tccagcgtgg tgacagtgcc cagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagtgg agcccaagag ctgcgacaag	660
accacacact gccccccctg cccagcccc gaagctgcag gcggcccttc cgtgttcctg	720
ttcccccca agcccaagga caccctgatg atcagcagga ccccgaggt gacctgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga ggaccagag gtgaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggagcagt acaacagcac ctacagggtg	900
gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag	960
gtctccaaca aggccctgcc tgccccatc gaaaagacca tcagcaaggc caagggccag	1020
ccacgggagc cccaggtgta caccctgccc ctttctcggg aggagatgac caagaaccag	1080
gtgtccctga cctgtctggt gaagggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaacggcc agcccagaaa caactacaag accaccccc cagtgtctgga cagcgacggc	1200
agcttcttcc tgtacagcaa gctgaccgtg gacaagagca ggtggcagca gggcaacgtg	1260
ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgagc	1320
ctgtcacccg gcaag	1335

<210> 167
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 167

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaagggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcagctaca tcaactgggt gcgccaggct      120
ccagggcagg gactggagtg gatgggccag atcaacgccg ccagcggcat gaccagatac      180
gcccagaagt tccagggcag agtcacaatg accagggaca cctctatcag caccgcctac      240
atggagctgt ccaggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caggggcggc      300
tggttcgact actggggcca gggcaccctg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc      360
cccagcgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacct ccggcggcac agccgccctg      420
ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg      540
tccagcgtgg tgacagtgcc cagcagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagtgg agcccaagag ctgcgacaag      660
acccacacct gccccccctg cccagcccc gaagctgcag gcggcccttc cgtgttcctg      720
ttcccccca agcccaagga caccctgatg atcagcagga cccccgaggt gacctgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga ggaccagag gtgaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggagcagt acaacagcac ctacagggtg      900
gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagaata caagtgcaag      960
gtctccaaca aggccctgcc tgcccccatc gaaaagacca tcagcaaggc caagggccag     1020
ccacgggagc ccaggtgta caccctgccc ctttctcggg aggagatgac caagaaccag     1080
gtgtccctga cctgtctggt gaagggttc taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag     1140
agcaacggcc agcccagaaa caactacaag accaccccc cagtgtctgga cagcgacggc     1200
agcttcttcc tgtacagcaa gctgaccgtg gacaagagca ggtggcagca gggcaacgtg     1260
ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gagcctgagc     1320
ctgtcacccg gcaag                                           1335

```

<210> 168

<211> 1335

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 168

```

caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc      120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcaat attaattgctg ctgctggtat tactctttat      180
gctcagaagt ttcagggctg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat      240
atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtggt      300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcctc caccaaggggt      360
ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgctgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaadc ttgtgacaaa      660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagcagcgg ggggaccgtc agtcttcctc      720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag     1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag     1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag     1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc     1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc     1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc     1320
ctgtctccgg gtaaa                                           1335

```

<210> 169

<211> 1335

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 169

```

caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt cgcceaagcc      120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggg attaatectc ctgctggtac tacttcttat      180
gctcagaagt ttcagggctg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat      240
atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgg      300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcctc caccaagggt      360
ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaadc ttgtgacaaa      660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagcagcgg ggggaccgtc agtcttcctc      720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtgggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag     1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag     1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag     1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc     1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc     1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc     1320
ctgtctccgg gtaaa                                           1335

```

<210> 170

<211> 1335

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 170

```

caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg      60
agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc      120
cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcaat attaatcctg ctactggtca tgctgattat      180
gctcagaagt ttcagggctg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat      240
atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgg      300
tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcctc caccaagggt      360
ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg      600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaadc ttgtgacaaa      660
actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaagcagcgg ggggaccgtc agtcttcctc      720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg      780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg      840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgggtg      900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag      960
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag     1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag     1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag     1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc     1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc     1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc     1320
ctgtctccgg gtaaa                                           1335

```

<210> 171
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 171
 cagagcgccc tgacccagcc cgccagcgtg tccggcagcc caggccagtc tatcacaatc 60
 agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag 120
 caccgccgca aggcccccaa gctgatgata tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg 180
 tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg 240
 caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcggatc atactacggc 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc ccccagcgtg 360
 accctgttcc ccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420
 atcagcgact tctacccagg cgccgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480
 aaggccggcg tggagaccac cacccccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540
 agctacctga gcctgacccc cgagcagtgg aagagccaca ggtcctacag ctgccagggtg 600
 acccagcagg gcagcaccgt ggaaaagacc gtggccccaa ccgagtgcag c 651

<210> 172
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nhẹ

<400> 172
 cagagcgccc tgacccagcc cgccagcgtg tccggcagcc caggccagtc tatcacaatc 60
 agctgcaccg gcacctccag cgacgtgggc agctacaact acgtgaactg gtatcagcag 120
 caccgccgca aggcccccaa gctgatgata tacggcgtga gcaagaggcc cagcggcgtg 180
 tccaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacaat cagtgggctg 240
 caggctgagg acgaggccga ctactactgc ggcacctttg ccggcggatc atactacggc 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtg ctgggccagc ctaaggctgc ccccagcgtg 360
 accctgttcc ccccagcag cgaggagctg caggccaaca aggccaccct ggtgtgcctg 420

atcagcgcact tctacccagg cgccgtgacc gtggcctgga aggccgacag cagccccgtg 480
aaggccggcg tggagaccac cccccccagc aagcagagca acaacaagta cgccgccagc 540
agctacctga gcctgacccc cgagcagtgg aagagccaca ggtcctacag ctgccagggtg 600
acccacgagg gcagcaccgt ggaaaagacc gtggcccca cagagtgcag c 651

<210> 173
<211> 651
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ

<400> 173
cagagcgcac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctccaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgacat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 174
<211> 651
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ

<400> 174
cagagcgcac tgacccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120

catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcgccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 175
<211> 651
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ

<400> 175
cagagcgcac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60
tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg tcttataatt atgtgaattg gtaccagcag 120
catcccgga aggcgccgaa acttatgatt tatggtgttt ctaagcgtcc ctcaggcgtg 180
agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgcga gcctgaccat tagcggcctg 240
caagcggaag acgaagcgga ttattattgc ggtacttttg ctggtggttc ttattatggt 300
gtgtttggcg gcggcacgaa gttaaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360
actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420
ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcgccagc 540
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600
acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc a 651

<210> 176
<211> 1323

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 176

caggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaaggtg	60
tcttgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcagctaca tcaactgggt ccgccaggct	120
cctgggcagg gactggagtg gatgggcacc atcaaccccg tgtccggcag caccagctac	180
gcccagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca ccagcatcag caccgcctac	240
atggagctgt ccaggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caggggcggc	300
tggttcgact actggggcca gggcacctg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc	360
cccagcgtgt tccccctggc ccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccctg	420
ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag ccagtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg	540
tccagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcacc agacctacac ctgcaacgtg	600
gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaccgtgg agaggaagtg ctgcgtggag	660
tgccccccct gccagcccc ccagtgggc ggaccctccg tgttctgtt ccccccaag	720
ccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc cccgaggtga cctgcgtggg ggtggacgtg	780
agccacgagg acccagaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac	840
gccaagacca agcccagaga ggaacagttt aacagcacct tcagggtggt gtccgtgctg	900
accgtggtgc accaggactg gctgaacggc aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag	960
ggcctgccag ccccatcga gaaaaccatc agcaagacca agggccagcc acgggagccc	1020
caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccctgacc	1080
tgtctggtga agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag	1140
cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttctg	1200
tacagcaagc tgacagtgga caagagcagg tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc	1260
gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtccccggc	1320
aag	1323

<210> 177
 <211> 1323
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 177
 caggtgcagc tgggtgcagag cggagctgag gtgaagaagc caggcgccag cgtcaaggtg 60
 tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agcagctaca tcaactgggt gcgccaggct 120
 ccagggcagg gactggagtg gatgggccag atcaacgccg ccagcggcat gaccagatac 180
 gcccagaagt tccagggcag agtcacaatg accagggaca cctctatcag caccgcctac 240
 atggagctgt ccaggctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caggggcggc 300
 tggttcgact actggggcca gggcacctg gtgaccgtgt cctcagctag caccaagggc 360
 cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccctg 420
 ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag ccagtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540
 tccagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgtg 600
 gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaccgtgg agaggaagtg ctgcgtggag 660
 tgccccccct gccagcccc cccagtggcc ggaccctcgg tgttctgttt ccccccaag 720
 cccaaggaca ccctgatgat cagcaggacc cccgaggtga cctgcgtgggt ggtggacgtg 780
 agccacgagg acccagaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 840
 gccaaagacca agcccagaga ggaacagttt aacagcacct tcaggggtgggt gtccgtgctg 900
 accgtgggtgc accaggactg gctgaacggc aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag 960
 ggcttgccag ccccatcga gaaaaccatc agcaagacca agggccagcc acgggagccc 1020
 caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccctgacc 1080
 tgtctgggtga agggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 1140
 cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttctctg 1200
 tacagcaagc tgacagtgga caagagcagg tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc 1260
 gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc 1320
 aag 1323

<210> 178
 <211> 1323
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 178
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcaat attaatgctg ctgctggtat tactctttat 180
 gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcttc caccaagggc 360
 cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccctg 420
 ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgagctggaa cagcggagcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcacc cagacctacac ctgcaacgtg 600
 gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaccgtgg agcggaggtg ctgcgtggag 660
 tgccccccct gccctgcccc tctgtggcc ggaccctcgc tgttcctgtt ccccccaag 720
 cccaaggaca cctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtgggt ggtggacgtg 780
 agccacgagg accccgaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 840
 gccaagacca agccccggga ggaacagttc aacagcacct tccgggtgggt gtccgtgctg 900
 accgtgggtg accaggactg gctgaacggc aaagaatata agtgcaaggt gtccaacaag 960
 ggctgcctg cccccatcga gaaaaccatc agcaagacaa agggccagcc cagggaaccc 1020
 caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccctgacc 1080
 tgtctgggtg agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 1140
 cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttcctg 1200
 tacagcaagc tgacagtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc 1260
 gtgatgcagc aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtcccccgcc 1320

aaa

1323

<210> 179
 <211> 1323
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> chuỗi nặng

<400> 179
 caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120
 cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcggg attaatectc ctgctggtac tacttcttat 180
 gctcagaagt ttcagggtcg ggtcaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240
 atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgg 300
 tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcttc caccaagggc 360
 cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccctg 420
 ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgagctggaa cagcggagcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcacc cagacctacac ctgcaacgtg 600
 gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaccgtgg agcgggaagt ctgcgtggag 660
 tgccccccct gccctgcccc tctgtgggcc ggaccctcgg tgttctgttt ccccccaag 720
 cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggg ggtggacgtg 780
 agccacgagg accccgaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 840
 gccaagacca agccccggga ggaacagttc aacagcacct tccgggtggg gtccgtgctg 900
 accgtggtgc accaggactg gctgaacggc aaagaataca agtgcaaggt gtccaacaag 960
 ggctgcctg cccccatcga gaaaaccatc agcaagacaa agggccagcc cagggaaccc 1020
 caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccctgacc 1080
 tgtctggtga agggcttcta cccagcgcac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 1140
 cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttctg 1200
 tacagcaagc tgacagtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc 1260

gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc 1320

aaa 1323

<210> 180

<211> 1323

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng

<400> 180

caggtgcaat tggttcagag cggcgcggaa gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60

agctgcaaag cctccggata tacctttact tcttcttata ttaattgggt ccgccaagcc 120

cctgggcagg gtctcgagtg gatgggcaat attaatcctg ctactggtca tgctgattat 180

gctcagaagt ttcagggctg ggtgaccatg acccgtgata ccagcattag caccgcgtat 240

atggaactga gccgcctgcg tagcgatgat acggccgtgt attattgcgc gcgtgggtgt 300

tggtttgatt attggggcca aggcaccctg gtgacggtta gctcagcttc caccaagggc 360

cccagcgtgt tccccctggc cccctgcagc agaagcacca gcgagagcac agccgccctg 420

ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgagctggaa cagcggagcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgcc gtgctgcaga gcagcggcct gtacagcctg 540

agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcaac ttcggcaccc agacctacac ctgcaacgtg 600

gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaccgtgg agcggagtg ctgcgtggag 660

tgccccccct gccctgcccc tctgtggcc ggaccctccg tgttcctgtt ccccccaag 720

ccaaggaca cctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgcgtggg ggtggacgtg 780

agccacgagg accccgaggt gcagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 840

gccaagacca agccccggga ggaacagttc aacagcacct tccgggtggg gtccgtgctg 900

accgtgggtg accaggactg gctgaacggc aaagaatata agtgcaaggt gtccaacaag 960

ggcctgcctg cccccatcga gaaaaccatc agcaagacaa agggccagcc cagggaaccc 1020

caggtgtaca ccctgcccc cagccgggag gaaatgacca agaaccaggt gtccctgacc 1080

tgtctgggtg agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 1140

cccgagaaca actacaagac ccccccccc atgctggaca gcgacggcag cttcttctg 1200

tacagcaagc tgacagtgga caagagccgg tggcagcagg gcaacgtggt cagctgcagc 1260
 gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgagcct gtcccccggc 1320
 aaa 1323

<210> 181
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 181

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

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

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95

Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110

Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190

Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220

Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240

His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255

Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile

370 375 380
 Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys
 385 390 395 400

 Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu
 405 410 415

 Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val
 420 425 430

 His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro
 435 440 445

 Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Ala Cys Trp Asp His Asp
 450 455 460

 Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu
 465 470 475 480

 Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu
 485 490 495

 Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile
 500 505 510

 <210> 182
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 182

 Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
 1 5 10 15

 Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu
 20 25 30

 Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser
 35 40 45

Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe
 50 55 60

Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln
 65 70 75 80

Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr
 85 90 95

His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro
 100 105 110

Thr Ala Pro Thr
 115

<210> 183
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 183

Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Ser Trp Leu Asp Asp Phe Asn Ser
 1 5 10 15

<210> 184
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 184

Val Lys Lys Gly Ser Trp Leu Asp Asp Phe Asn Ser Tyr Asp Arg
 1 5 10 15

<210> 185
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 185

Gly Ser Trp Leu Asp Asp Phe Asn Ser Tyr Asp Arg Gln Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 186

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 186

Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys
 1 5

<210> 187
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 187

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp
 1 5 10 15

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 188

Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 1 5

<210> 189
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 189

Glu Gln Asp Lys Arg
 1 5

<210> 190
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 190

Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
 1 5 10

1/9

Fig. 1

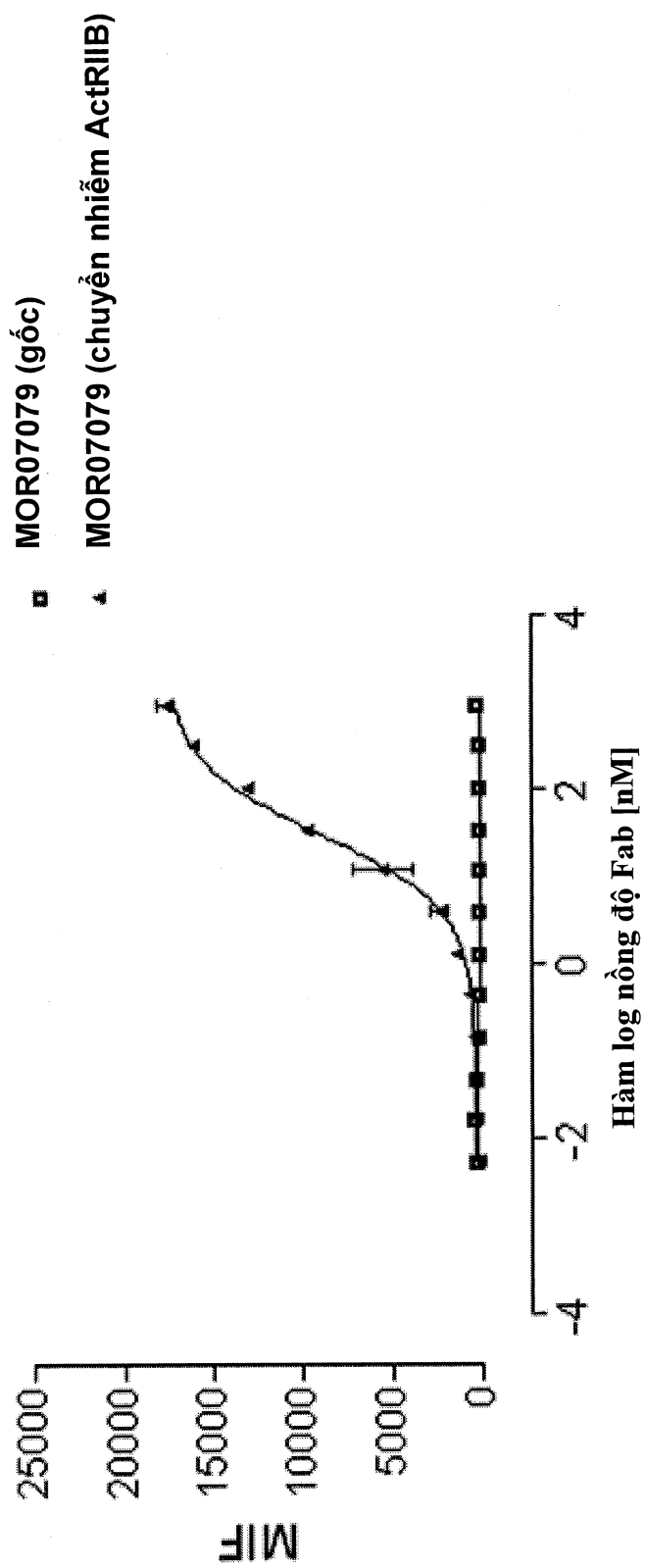


Fig. 2

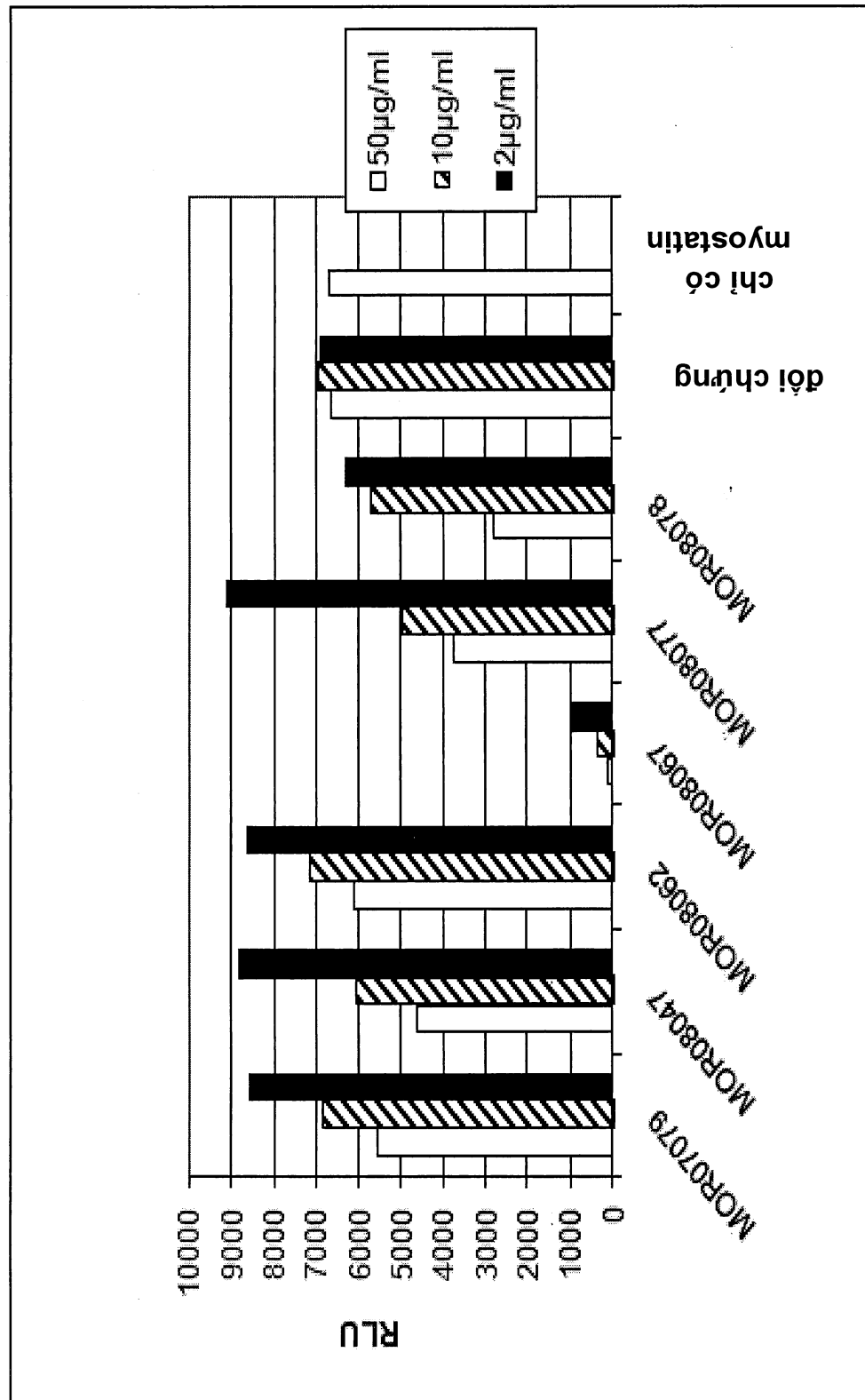


Fig. 3

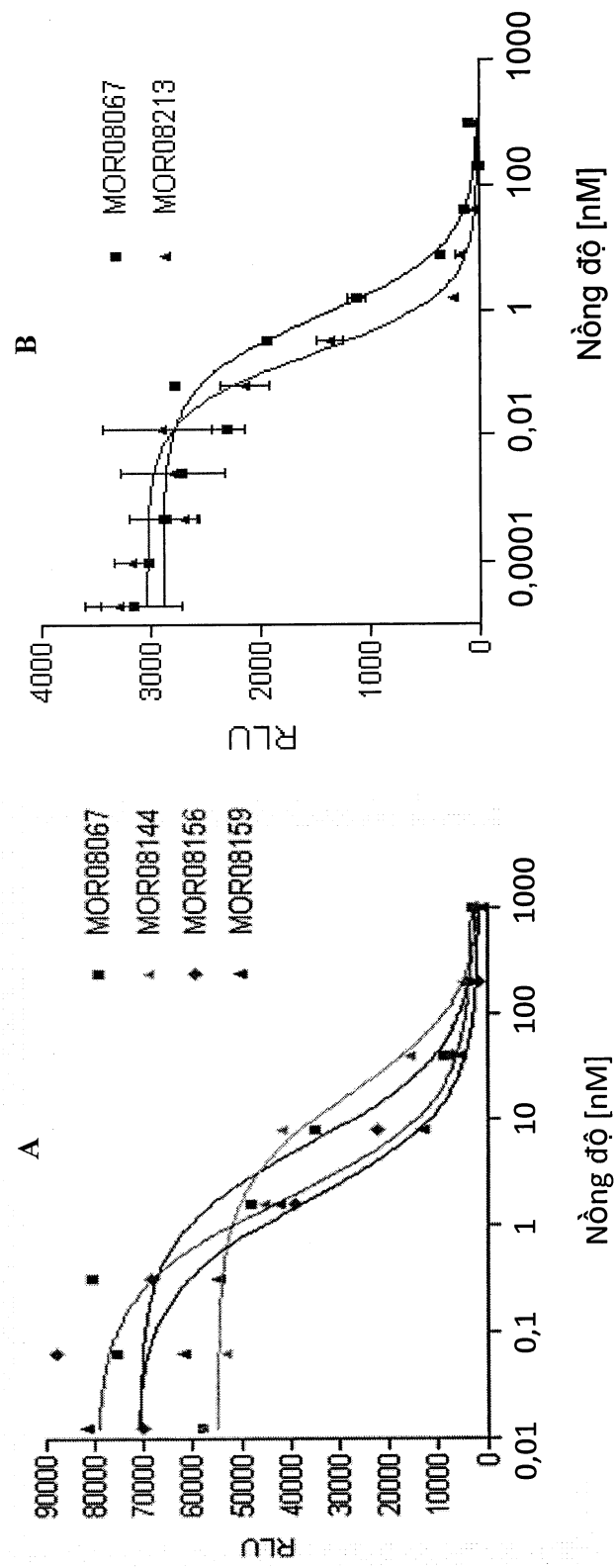


Fig. 4

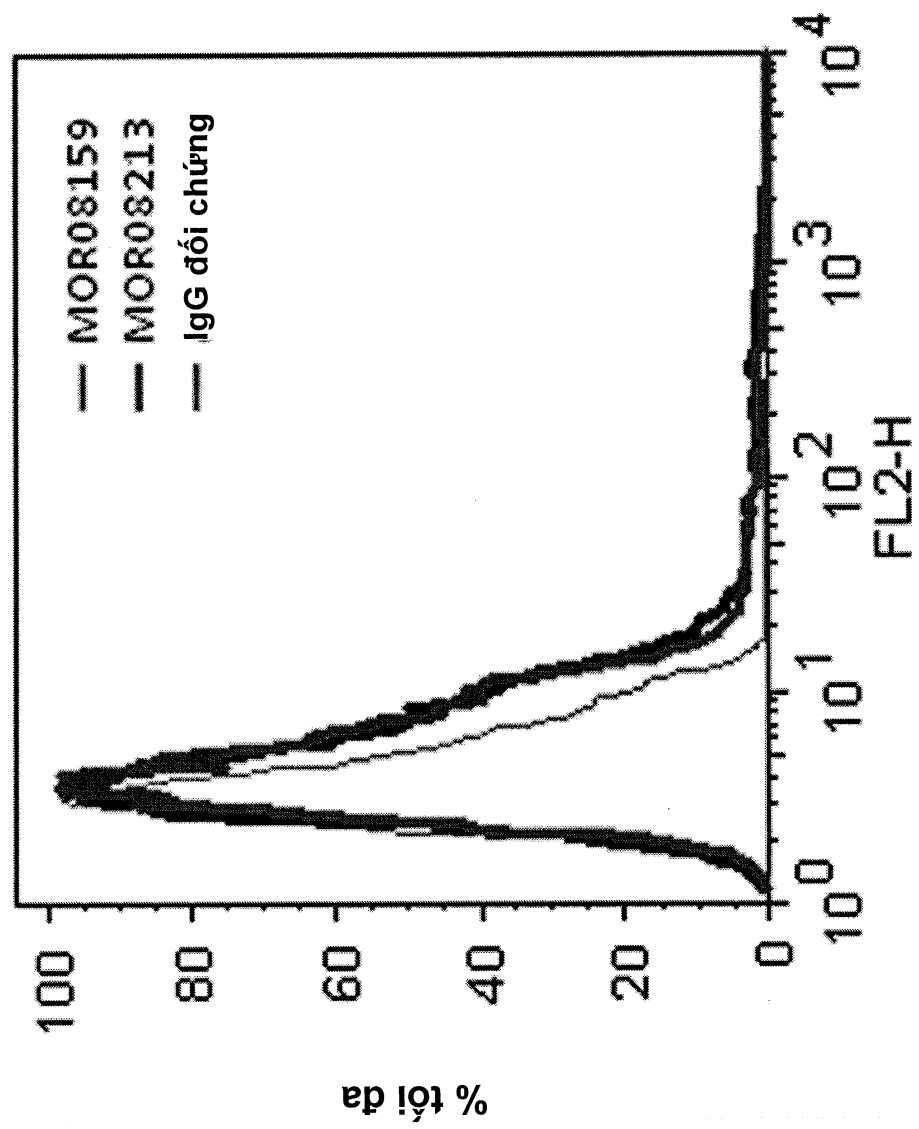


Fig. 5

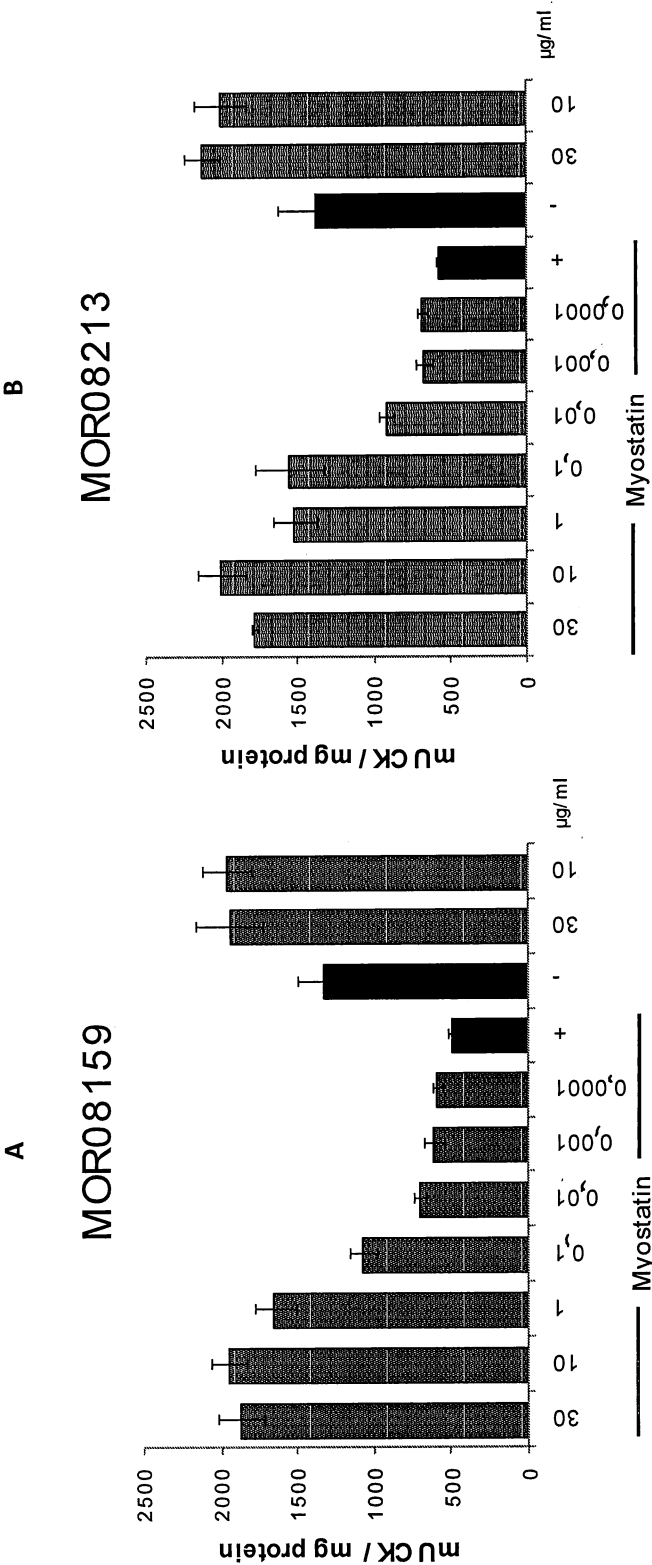


Fig. 6

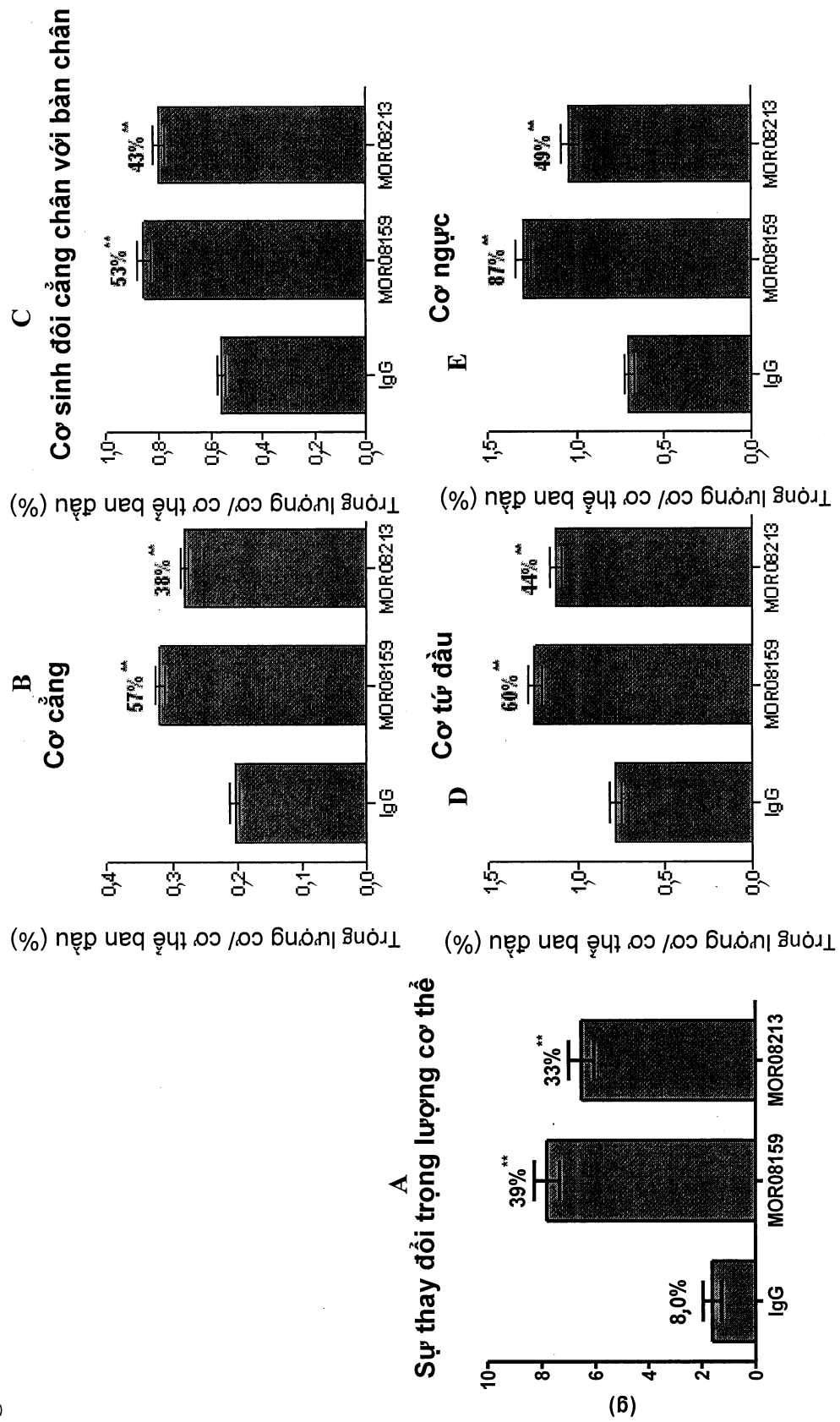
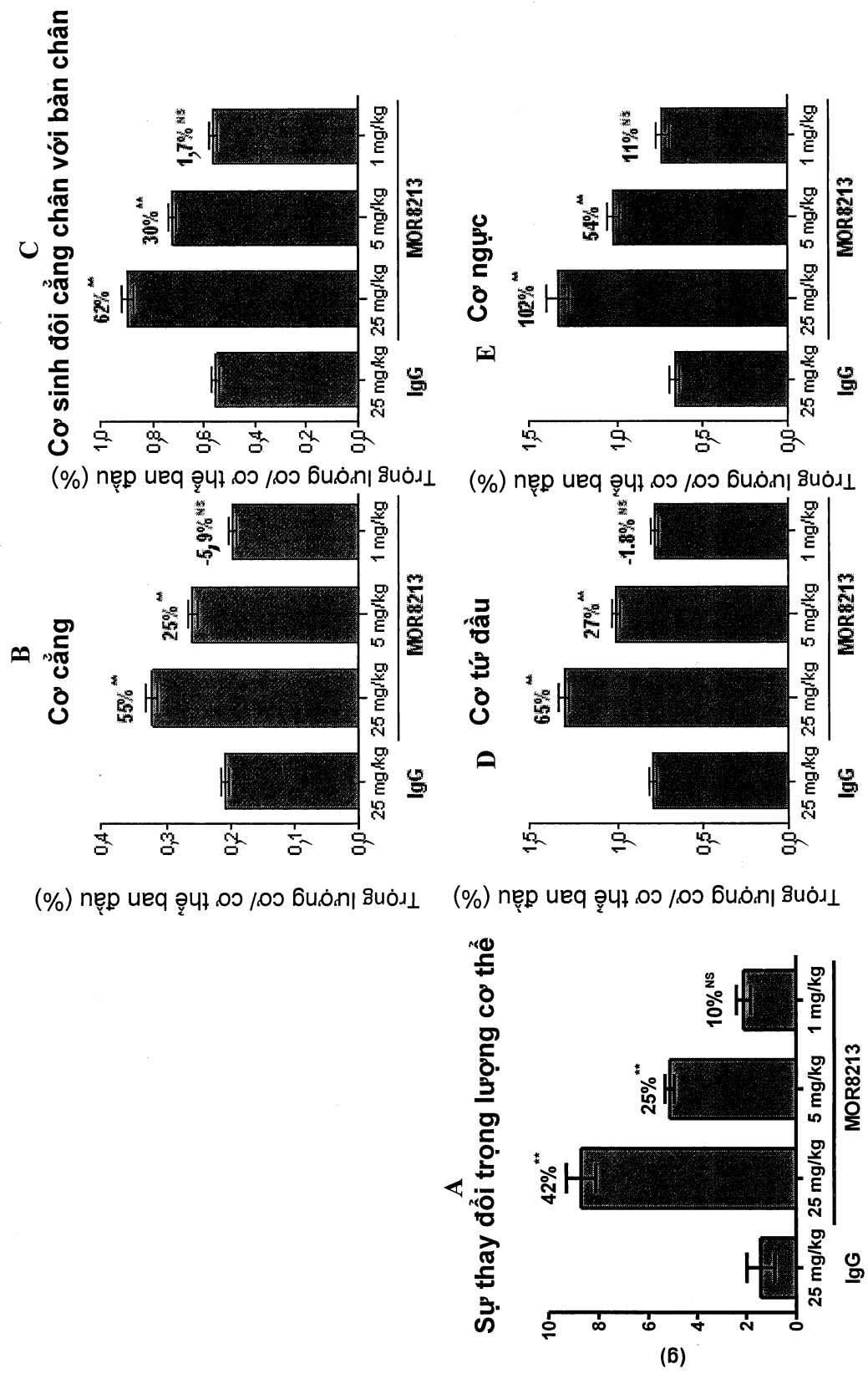


Fig. 7



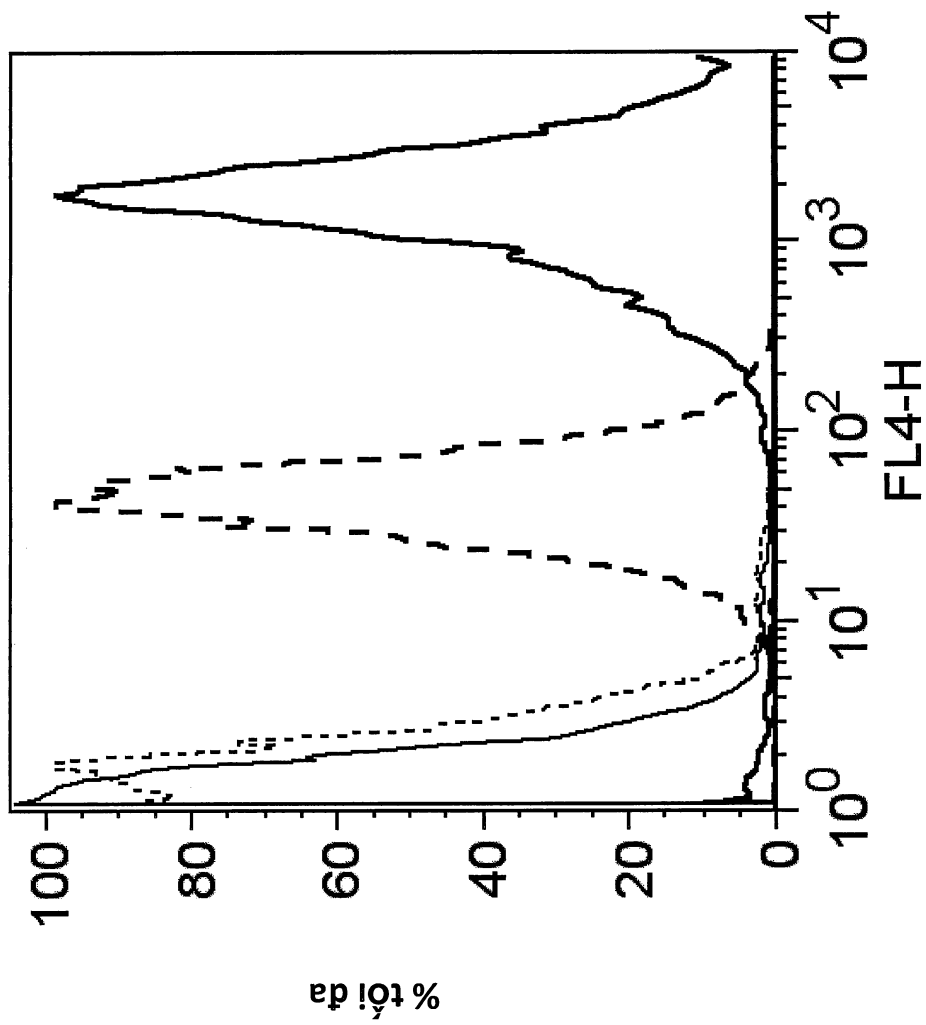


Fig. 8

Fig. 9

