



(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) 
1-0019647

(51)⁷ **C07K 16/28, 16/00, 16/46, A61K**
39/395, A61P 35/00

(13) **B**

(21) 1-2011-01717

(22) 02.12.2009

(86) PCT/EP2009/066201 02.12.2009

(87) WO2010/069765 24.06.2010

(30) PCT/IB2008/055663 02.12.2008 IB
61/184,502 05.06.2009 US

(45) 27.08.2018 365

(43) 26.03.2012 288

(73) PIERRE FABRE MEDICAMENT (FR)

45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt, France

(72) GOETSCH Liliane (FR), WURCH Thierry (FR), BES Cédric (FR)

(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) **KHÁNG THỂ KHÁNG C-MET, CÁC SẢN PHẨM VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHÚNG**

(57) Sáng chế đề cập tới kháng thể mới có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể c-Met ở người và/hoặc có khả năng ức chế đặc hiệu hoạt tính tyrosin kinaza của thụ thể này, cùng với hoạt tính đối kháng được cải thiện, trong đó kháng thể này bao gồm vùng bản đã được cải biến. Sáng chế cũng đề cập tới chế phẩm chứa kháng thể như vậy đối kháng với c-Met để sử dụng nó làm thuốc để điều trị ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới kháng thể có hoá trị hai mới có khả năng gắn kết đặc hiệu với thụ thể c-Met ở người và/hoặc có khả năng ức chế đặc hiệu hoạt tính tyrosin kinaza của thụ thể này, cũng như các trình tự axit amin và axit nucleic mã hóa cho kháng thể nêu trên. Cụ thể hơn là, kháng thể theo sáng chế có khả năng ức chế quá trình dimer hóa c-Met. Sáng chế cũng đề cập tới việc kháng thể nêu trên để sử dụng làm thuốc để điều trị phòng bệnh và/hoặc trị liệu các ung thư hoặc bệnh học bất kỳ có liên quan tới sự biểu hiện quá mức của thụ thể này cũng như trong các quy trình hoặc bộ dụng cụ để chẩn đoán các bệnh liên quan tới sự biểu hiện quá mức của c-Met. Sáng chế cũng đề cập tới các sản phẩm và/hoặc các chế phẩm bao gồm kháng thể như vậy kết hợp với các kháng thể khác và/hoặc các hợp chất hóa học kháng các yếu tố phát triển khác liên quan tới sự di căn và tiến triển khối u và/hoặc các hợp chất và/hoặc các tác nhân kháng ung thư hoặc các tác nhân đã tiếp hợp với các độc tố để sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị các ung thư nhất định.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các tác nhân hướng đích thụ thể tyrosin kinaza (RTK: *Receptor Tyrosine Kinase*) như các chất ức chế trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib và gefitinib đã được chứng minh là có tác dụng hướng vào nhóm protein này cho việc điều trị các ung thư được chọn.

c-Met, là thành viên nguyên mẫu thuộc phân họ RTK, phân họ này cũng bao gồm RON và SEA. Họ RTK c-Met có cấu trúc khác với các họ RTK khác và là thụ thể có ái lực cao đã biết duy nhất đối với yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), còn được gọi là yếu tố phân tán (SF) [D.P. Bottaro et al., *Science* 1991, 251: 802-804; L. Naldini et al., *Eur. Mol. Biol. Org. J.* 1991, 10:2867-2878]. c-Met và HGF được biểu hiện ở nhiều mô và chúng thường chỉ biểu hiện lần lượt các tế bào có nguồn gốc biểu mô và trung mô [M.F. Di Renzo et al., *Oncogene* 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., *J. Cell. Biol.* 1993, 123:223-235]. Cả c-

Met lẫn HGF đều cần thiết đối với sự phát triển bình thường ở động vật có vú và được thấy là đặc biệt quan trọng trong quá trình di trú tế bào, phân hoá hình thái, và tổ chức cấu trúc hình ống ba chiều cũng như phát triển và tạo mạch [F. Baldt et al., *Nature* 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al., *Nature*. 1995:373:699-702; Tsarfaty et al., *Science* 1994, 263:98-101]. Trong khi quá trình điều hòa có kiểm soát c-Met và HGF có vai trò quan trọng trong quá trình phát triển, duy trì và sửa chữa mô ở động vật có vú [Nagayama T, Nagayama M, Kohara S, Kamiguchi H, Shibuya M, Katoh Y, Itoh J, Shinohara Y., *Brain Res.* 2004, 5;999(2):155-66; Tahara Y, Ido A, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H., *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307(1):146-51], thì quá trình rối loạn điều hòa của chúng lại kéo theo sự tiến triển các bệnh ung thư.

Việc truyền tín hiệu sai do quá trình hoạt hóa không thích hợp của c-Met là một trong số các thay đổi thường xuyên nhất được quan sát thấy ở người bệnh ung thư và đóng một vai trò rất quan trọng trong việc tạo khối u và di căn [Birchmeier et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:915-925; L. Trusolino and Comoglio P. M., *Nat Rev. Cancer.* 2002, 2(4):289-300].

Quá trình hoạt hóa c-Met không thích hợp có thể phát sinh theo các cơ chế không phụ thuộc và phụ thuộc vào phối tử, chúng bao gồm sự biểu hiện quá mức của c-Met, và/hoặc quá trình hoạt hóa cận tiết hoặc tự tiết, hoặc thông qua sự gia tăng quá trình đột biến chức năng [J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., *Cancer Letters.* 2005, 226:1-26]. Tuy nhiên, quá trình oligome hoá thụ thể c-Met, khi có hoặc không có phối tử, là cần thiết để điều hòa ái lực gắn kết và động học gắn kết của kinaza với cơ chất peptit chứa ATP và tyrosin [Hays JL, Watowich SJ, *Biochemistry*, 2004 Aug 17, 43:10570-8]. c-Met đã được hoạt hóa lôi kéo các chất tác động truyền tín hiệu tới vị trí đa nối của nó trong miền bào chất, dẫn đến quá trình hoạt hóa một số đường truyền tín hiệu chính, bao gồm Ras-MAPK, PI3K, Src và Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, *Cell Res.* 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene.* 2000, 19(49):5582-9]. Các đường này là rất cần thiết cho quá trình tăng sinh, xâm lấn và tạo mạch của tế bào khối u và tránh quá trình chết theo chương trình [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene*, 2000, 19(49):5582-9; Gu H, Neel BG, *Trends Cell Biol.* 2003 Mar, 13(3):122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ,

Goldberg ID, Rosen EM, *Oncogene*. 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]. Ngoài ra, so với RTK khác, nét độc đáo trong việc truyền tín hiệu của c-Met là sự tương tác của nó với các phức hợp bám dính tại tiêu điểm và các thành phần gắn kết không phải kinaza như $\alpha 6 \beta 4$ integrin [Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, *Cell*. 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST, *J Biol Chem*. 1999, 274(10):6499-506], Plexin B1 hoặc semaphorin [Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, Comoglio PM, *Nat Cell Biol*. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P, Valdembri D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S, *Máu*. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P, Corso S, Gamberini S, Comoglio PM, Giordano S, *Oncogene*. 2004, 23:5131-7], chúng có thể còn làm phức tạp thêm cho quá trình điều hòa chức năng tế bào của thụ thể này. Cuối cùng, dữ liệu gần đây đã chứng tỏ rằng c-Met có thể tham gia vào sự đề kháng của khối u đối với gefitinib hoặc erlotinib, điều này gợi ý rằng chế phẩm chứa hợp chất hướng vào cả EGFR lẫn c-Met có thể là rất đáng được quan tâm [Engelman JA et al., *Science*, 2007, 316:1039-43].

Trong vài năm qua, nhiều phương pháp khác nhau đã được phát triển để làm suy giảm việc truyền tín hiệu c-Met trong các dòng tế bào ung thư. Các phương pháp này bao gồm i) các kháng thể trung hòa kháng c-Met hoặc HGF/SF [Cao B, Su Y, Oskarsson M, Zhao P, Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(13):7443-8; Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K, *Clin Cancer Res*. 2006, 12(20):6144-52] hoặc sử dụng chất đối kháng HGF/SF NK4 để ngăn ngừa sự gắn kết của phối tử với c-Met [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, *Cancer Res.*, 2000, 60:6737-43], ii) các chất ức chế vị trí gắn kết ATP nhỏ với c-Met ức chế hoạt tính kinaza [Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, *Cancer Res*. 2003, 63:7345-55], iii) polypeptit miền SH2 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền can thiệp việc tiếp cận với vị trí đa nối và ARN can thiệp hoặc ribozym làm suy giảm mức độ biểu hiện của thụ thể hoặc phối tử. Hầu hết các phương pháp này đều mô tả cách ức chế chọn lọc c-Met, làm ức chế khối u và cho

thấy rằng c-Met có thể được quan tâm để điều trị bệnh ung thư.

Trong số các phân tử được tạo ra để hướng đích c-Met, một số là các kháng thể. Kháng thể được mô tả nhiều nhất là kháng thể kháng c-Met 5D5 do Genentech [WO96/38557] tạo ra, có tác dụng như một chất chủ vận tiềm năng khi dùng một mình trong nhiều mô hình thử nghiệm khác nhau và như là một chất đối kháng khi được sử dụng làm đoạn Fab. Dạng được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có hoá trị một của kháng thể này đã được mô tả như là 5D5 một nhánh (OA5D5) và được tạo ra dưới dạng protein tái tổ hợp trong *E. Coli* cũng là đối tượng của đơn yêu cầu cấp patent [WO2006/015371] của Genentech. Tuy nhiên, phân tử này không thể được coi là kháng thể vì cấu trúc giàn giáo đặc biệt của nó, cũng thể hiện các đột biến có thể sinh miễn dịch ở người. Về mặt hoạt tính, phân tử không glycosyl hoá này không có chức năng tác động và không có dữ liệu rõ ràng nào chứng tỏ rằng OA5D5 ức chế quá trình dime hoá của c-Met. Ngoài ra, khi được thử nghiệm theo mô hình thử nghiệm G55 *in vivo*, dòng tế bào u nguyên bào xẹp lại biểu hiện c-Met mà không biểu hiện ARN thông tin và protein HGF và phát triển độc lập với phổi tử, kháng thể kháng c-Met một nhánh này không có tác dụng đáng kể đến sự phát triển khối u G55, điều này đã gợi ý rằng OA5D5 có tác dụng chủ yếu là ức chế sự gắn kết của HGF và không thể hướng đích là các khối u được hoạt hóa độc lập với HGF [Martens T. et al, Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152].

Kháng thể khác hướng đích là c-Met đã được Pfizer mô tả là kháng thể có tác dụng “chủ yếu như là chất đối kháng c-Met, và theo một số trường hợp, như là chất chủ vận c-Met” [WO 2005/016382]. Không có dữ liệu nào cho thấy tác dụng bất kỳ của các kháng thể của Pfizer đến quá trình dime hoá c-Met được mô tả trong sáng chế của đơn này.

Một trong các khía cạnh sáng tạo của sáng chế này là tạo ra kháng thể đơn dòng khảm và/hoặc được làm giống như ở người không có hoạt tính chủ vận nội tại và ức chế quá trình dime hoá c-Met. Cụ thể hơn là, một khía cạnh sáng tạo của sáng chế này là tạo ra kháng thể đơn dòng khảm và/hoặc được làm giống như ở người có hoạt tính đối kháng và ức chế quá trình dime hoá c-Met.

Ngoài việc hướng vào khối u phụ thuộc phổi tử, phương pháp này còn làm suy yếu quá trình hoạt hóa của c-Met không phụ thuộc vào phổi tử do sự biểu hiện

quá mức của nó hoặc các đột biến của miền nội bào vẫn còn phụ thuộc vào quá trình oligome hoá để truyền tín hiệu. Một khía cạnh khác của hoạt tính của kháng thể này có thể có tác dụng án ngữ không gian đối với sự tương tác c-Met với các thành phần của nó dẫn đến làm suy yếu các chức năng của của c-Met. Tốt hơn nếu các kháng thể này được làm giống như ở người và được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền, mặc dù không nhằm giới hạn, như IgG1 ở người để có được các chức năng tác động như ADCC và CDC ngoài các chức năng liên quan đến việc phong bế đặc hiệu thụ thể c-Met.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Điều ngạc nhiên là, lần đầu tiên các tác giả sáng chế đã tạo ra được kháng thể đối kháng đơn dòng thể khảm và/hoặc được làm giống như ở người không chỉ có khả năng gắn kết với c-Met mà còn có khả năng ức chế quá trình dime hóa c-Met, kháng thể đơn dòng này có hoá trị hai khác hẳn với các kháng thể đối kháng hiện thời hướng đích kháng c-Met. Đúng là trong tình trạng kỹ thuật, đôi khi người ta cũng cho rằng một kháng thể có khả năng ức chế quá trình dime hoá của c-Met với các thành phần của nó có thể là kháng thể đáng quan tâm, nhưng kháng thể có khả năng như vậy chưa từng được bộc lộ, hoặc gợi ý một cách rõ ràng trong lĩnh vực này. Ngoài ra, về tính đặc hiệu của kháng thể, vẫn chưa có một bằng chứng nào cho thấy sự thành công trong việc tạo ra kháng thể có hóa trị hai hoạt tính như vậy.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc trưng và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ được thể hiện trong phân mô tả dưới đây qua các ví dụ và các hình vẽ, trong đó

Fig.1: thể hiện tác dụng của các Mab IgG1 không liên quan có nguồn gốc từ chuột nhắt và người và PBS tới quá trình phosphoryl hóa thụ thể c-Met trong các tế bào A549.

Fig.2A và Fig.2B: thể hiện tác dụng của các Mab 224G11 được làm giống như ở người và ở chuột được sản xuất dưới dạng isotype IgG1/kappa ở người tới quá trình phosphoryl hóa thụ thể c-Met trong các tế bào A549.

Fig.2A: thể hiện tác dụng chủ vận được tính theo phần trăm đối với sự kích thích

tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.2B: thể hiện tác dụng đối kháng được tính theo phần trăm ức chế kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.3A và Fig.3B: thể hiện sự so sánh giữa Mab 224G11 ở chuột và các Mab 224G11 loại khảm chứa các vùng bản lề được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền khác nhau, tối đa quá trình phosphoryl hóa thụ thể c-Met trong các tế bào A549.

Fig.3A: thể hiện tác dụng chủ vận được tính theo phần trăm đối với sự kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.3B: thể hiện tác dụng đối kháng được tính theo phần trăm ức chế kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.4A và Fig.4B: thể hiện sự so sánh giữa Mab 224G11 ở chuột và Mab 224G11 loại khảm và được làm giống như ở người được tạo ra dưới dạng isotype IgG2/kappa ở người, tối đa quá trình phosphoryl hóa thụ thể c-Met trong các tế bào A549.

Fig.4A: thể hiện tác dụng chủ vận được tính theo phần trăm đối với sự kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.4B: thể hiện tác dụng đối kháng được tính theo phần trăm ức chế kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.5A và Fig.5B: thể hiện sự so sánh giữa Mab 224G11 ở chuột và Mab 224G11 loại khảm và được làm giống như ở người được tạo ra dưới dạng TH7IgG1/kappa đột biến bản lề được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền, tối đa quá trình phosphoryl hóa thụ thể c-Met trong các tế bào A549.

Fig.5A: tác dụng chủ vận được tính theo phần trăm đối với sự kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.5B: tác dụng đối kháng được tính theo phần trăm ức chế kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.6A và Fig.6B, Fig.7A và Fig.7B, Fig.8A và Fig.8B, Fig.9A và Fig.9B, Fig.10A và Fig.10B: thể hiện các mô hình BRET trong các hình A: mô hình dime hóa c-Met; và trong các hình B: mô hình hoạt hóa c-Met.

Fig.11: thể hiện sự nhận biết c-Met bằng các dạng 224G11 loại khảm và được làm giống như ở người.

Fig.12: thể hiện tác dụng của các kháng thể khảm và ở chuột tối đa quá trình

tăng sinh gây ra bởi HGF của các tế bào NCI-H441 *in vitro*. Các tế bào NCI-H441 được dàn mỏng trong môi trường không huyết thanh. 24 giờ sau khi dàn mỏng m224G11 và [224G11]chim được bổ sung không có mặt hoặc với sự có mặt của HGF. Các hình mũi tên biểu thị các lỗ được dàn mỏng duy nhất các tế bào không có mặt  hoặc với sự có mặt  của HGF. IgG1 ở chuột (mIgG1) được đưa vào làm đối chứng isotype.

Fig.13: thể hiện sự so sánh *In vivo* giữa các Mab 224G11 loại khảm IgG1 và ở chuột trên mô hình dị ghép NCI-H441.

Fig.14A và Fig.14B: thể hiện tác dụng của Mab 224G11 ở chuột và các phiên bản kháng thể loại khảm và được làm giống như ở người khác nhau tới quá trình tăng sinh gây ra bởi HGF của các tế bào NCI-H441 *in vitro*. Các tế bào NCI-H441 được dàn mỏng trong môi trường không huyết thanh. Hai mươi tư giờ sau khi dàn mỏng, kháng thể cần được thử nghiệm được bổ sung không có mặt hoặc với sự có mặt của HGF. Trong panen (Fig.14A), các phiên bản m224G11 ở chuột, IgG1 [224G11]chim loại khảm, IgG1 được làm giống như ở người [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3] được thể hiện. Trong panen (Fig.14B), m224G11 ở chuột và các dạng IgG1 loại khảm khác nhau ([224G11] chim, [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224G11] [MMCH chim], [224G11] [TH7 chim]) được trình bày. Các hình mũi tên biểu thị các lỗ được dàn mỏng duy nhất các tế bào không có mặt  hoặc với sự có mặt  của HGF. IgG1 ở chuột được đưa vào làm đối chứng âm cho hoạt tính chủ vận. m5D5 được sử dụng làm đối chứng chủ vận đầy đủ phụ thuộc liều dùng.

Fig.15: thể tác dụng của Mab 224G11 ở chuột và các phiên bản của kháng thể này ở chuột và được làm giống như ở người khác nhau tới quá trình tăng sinh gây ra bởi HGF của các tế bào NCI-H441 *in vitro*. Các tế bào NCI-H441 được dàn mỏng trong môi trường không huyết thanh. Hai mươi tư giờ sau khi dàn mỏng, kháng thể cần thử nghiệm được bổ sung không có mặt hoặc với sự có mặt của HGF. Các dạng loại khảm M224G11 ở chuột, [224G11] chim, [224G11] [TH7 chim]) IgG1 và [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3],) được trình bày. Các hình mũi tên biểu thị các lỗ được dàn mỏng duy nhất các tế bào không có mặt  hoặc với sự có mặt  của HGF. IgG1 ở chuột được đưa vào làm đối chứng âm cho hoạt tính chủ vận. m5D5 được sử dụng làm đối chứng chủ vận đầy đủ phụ thuộc

liều dùng.

Fig.16: thể hiện sự so sánh *In vivo* giữa các Mab ở chuột, 224G11 loại khảm và được làm giống như ở người trên mô hình dị ghép NCI-H441.

Fig.17A: thể hiện tác dụng chủ vận được tính theo phần trăm đối với sự kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.17B: thể hiện tác dụng đối kháng được tính theo phần trăm ức chế kích thích tối đa quá trình phosphoryl hóa c-Met bởi HGF [100 ng/ml].

Fig.18: thể hiện các mô hình BRET cùng với mô hình hoạt hóa c-Met.

Fig.19: thể hiện tác dụng của m224G11 và h224G11 tới sự thoái biến c-Met trong các tế bào A549. A) Giá trị trung bình của 4 thử nghiệm độc lập $\pm$ s.e.m. B) Thể hiện ảnh Thẩm Tây của 4 thử nghiệm độc lập được tiến hành.

Fig.20: thể hiện tác dụng của m224G11 và h224G11 tới sự thoái biến c-Met trong các tế bào NCI-H441. A) Giá trị trung bình của 4 thử nghiệm độc lập $\pm$ s.e.m. B) Thể hiện ảnh Thẩm Tây của 4 thử nghiệm độc lập được tiến hành.

Fig.21: thể hiện sự thiết lập ELISA để đánh giá sự tróc c-Met.

Fig.22: thể hiện việc đánh giá *In vitro* sự tróc c-Met trong Các tế bào NCI-H441 được xử lý trong 5 ngày bằng m224G11. mIgG1 là một kháng thể không liên quan được sử dụng làm đối chứng isotype.

Fig.23: thể hiện việc đánh giá *in vitro* sự tróc c-Met trong các dòng tế bào Hs746T, MKN45 và EBC-1 đã được khuếch đại được xử lý trong 5 ngày bằng m224G11. mIgG1 là một kháng thể không liên quan được sử dụng làm đối chứng isotype. PMA là một tác nhân gây tróc được sử dụng làm đối chứng dương.

Fig.24: thể hiện việc đánh giá *in vitro* sự tróc c-Met trong NCI-H441 và các dòng tế bào Hs746T, MKN45 và EBC-1 đã được khuếch đại được xử lý trong 5 ngày bằng m224G11. mIgG1 là một kháng thể không liên quan được sử dụng làm đối chứng isotype. PMA là một tác nhân gây tróc được sử dụng làm đối chứng dương.

Fig.25: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11 trong dòng tế bào Hs746T.

Fig.26: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11 trong dòng tế bào NCI-H441. A) phospho-ELISA và B) Phân tích Tây.

Fig.27: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11

trong dòng tế bào Hs578T. A) phospho-ELISA và B) Phân tích Tây.

Fig.28: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11 trong dòng tế bào NCI-H125. A) phospho-ELISA và B) Phân tích Tây.

Fig.29: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11 trong dòng tế bào T98G. A) phospho-ELISA và B) Phân tích Tây.

Fig.30: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11 trong dòng tế bào MDA-MB-231. A) phospho-ELISA và B) Phân tích Tây.

Fig.31: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11 trong dòng tế bào PC3. A) phospho-ELISA và B) Phân tích Tây.

Fig.32: thể hiện nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa nội tại h224G11 trong các tế bào HUVEC.

Fig.33: thể hiện sự so sánh in vivo giữa kháng thể 224G11 ở chuột kiểu hoang với các Mab 224G11[C2D5-7] có bản lề được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền loại khảm trên mô hình dị ghép NCI-H441.

Fig.34: thể hiện sự gây ra ADCC bởi h224G11 trên cả các tế bào Hs746T lẫn các tế bào NCI-H441. Các tế bào Hs746T (A) hoặc NCI-H441 (B) đã được gắn nhãn ^{51}Cr được nạp (ô vuông màu đen) hoặc không được nạp (ô vuông rỗng) h224G11 được trộn cùng với các tỷ lệ khác nhau của các NK ở người và được ủ trong 4 giờ. Các tế bào được thu hoạch và cpm của ^{51}Cr được giải phóng bởi sự phân giải được đếm. Các kết quả được vẽ đồ thị dưới dạng phần trăm sự phân giải theo tỷ lệ chất tác động/tế bào đích. NL thể hiện cho các tế bào không được nạp.

Fig.35: thể hiện sự nhuộm h224G11 trong mô hình dị ghép khối u biểu hiện giá trị thay đổi của c-Met (A: dòng tế bào đã được khuyếch đại Hs746T cho c-Met, B: mức cao NCI-H441 của sự biểu hiện c-Met và C: mức thấp MCF-7 của c-Met).

Mô tả chi tiết sáng chế

Như đã được giải thích trên đây, việc ức chế quá trình dime hoá c-Met là khía cạnh chính của sáng chế vì các kháng thể như vậy sẽ được thực sự quan tâm đối với nhóm bệnh nhân lớn. Theo sáng chế, không những ung thư c-Met hoạt hóa phụ thuộc phối tử, mà còn ung thư c-Met hoạt hóa không phụ thuộc vào phối tử có thể được điều trị bằng các kháng thể được tạo ra bằng quy trình theo sáng chế.

Các kháng thể được đánh giá bằng phép phân tích BRET đối với các tế bào biểu hiện cả hai loại c-Met-RLuc/c-Met-YFP và chọn lọc các kháng thể có khả năng ức chế tín hiệu BRET ít nhất là 40%, tốt hơn là 45%, 50%, 55% và tốt nhất là 60%.

Kỹ thuật BRET là một kỹ thuật đã biết để mô tả sự dimer hoá protein [Angers et al, PNAS, 2000, 97:3684-89].

Kỹ thuật BRET là đã biết rõ bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và sẽ được mô tả một cách chi tiết trong các ví dụ ở dưới. Cụ thể hơn, BRET (Bio luminescence Resonance Energy Transfer) là sự truyền không phát xạ xuất hiện giữa thể cho phát huỳnh quang sinh học (Renilla Luciferase (Rluc)) và thể nhận huỳnh quang, thể đột biến của GFP (Green Fluorescent Protein: protein huỳnh quang xanh) hoặc YFP (Yellow fluorescent protein: protein huỳnh quang vàng). Trong trường hợp này, EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein: protein huỳnh quang vàng tăng cường) được sử dụng. Hiệu suất truyền phụ thuộc vào sự định hướng và khoảng cách giữa thể cho và thể nhận. Tiếp đó, sự truyền năng lượng có thể xảy ra chỉ khi hai phân tử gần sát nhau (1-10 nm). Đặc tính này được sử dụng để tạo ra thử nghiệm tương tác protein-protein. Quả thực, để nghiên cứu sự tương tác giữa hai thành viên, thành viên thứ nhất được dung hợp di truyền học với Renilla Luciferase và thành viên thứ hai với thể đột biến vàng của GFP. Các protein dung hợp nói chung, nhưng không bắt buộc, được biểu hiện trong tế bào động vật có vú. Với sự có mặt của cơ chất có thể thấm qua màng của nó (coelenterazin), Rluc phát xạ ánh sáng xanh da trời. Nếu thể đột biến GFP sát Rluc khoảng 10nm, sự truyền năng lượng có thể xuất hiện và tín hiệu vàng bổ sung có thể được phát hiện. Tín hiệu BRET được xác định là tỷ số giữa ánh sáng được phát xạ bởi thể nhận và ánh sáng được phát xạ bởi thể cho. Theo đó, tín hiệu BRET sẽ tăng khi hai protein dung hợp tiến gần sát nhau hoặc khi thay đổi cấu hình làm cho Rluc và thể đột biến GFP sát nhau hơn.

Nếu phép phân tích BRET bao gồm theo một phương án được ưu tiên, thì phương pháp bất kỳ đã biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để xác định sự dimer hóa c-Met. Mặc dù không nhằm giới hạn ở, song các kỹ thuật dưới đây có thể được kể đến: FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer: truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang), HTRF (Homogenous

Time resolved Fluorescence: huỳnh quang phân giải theo thời gian đồng nhất), FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy: ảnh chụp dưới kính hiển vi chu kỳ bán rã phát huỳnh quang) hoặc SW-FCCS (Single Wavelength Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy: quang phổ tương quan chéo huỳnh quang bước sóng đơn).

Các kỹ thuật kinh điển khác cũng có thể được sử dụng, như đồng kết tủa miễn dịch, sàng lọc anpha, liên kết ngang hóa học, Double-Hybrid, Sắc ký ái lực, ELISA hoặc Thẩm Tây rộng.

Các thuật ngữ “kháng thể”, “các kháng thể” hoặc “globulin miễn dịch” được sử dụng thay thế lẫn nhau với nghĩa rộng nhất và bao gồm các kháng thể đơn dòng (ví dụ, các kháng thể đơn dòng nguyên vẹn hoặc có độ dài đầy đủ), các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa hóa trị hoặc các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể hai đặc hiệu miễn là chúng biểu hiện hoạt tính sinh học được mong muốn).

Cụ thể hơn là, phân tử như vậy có trong glycoprotein bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) nối kết với nhau bởi các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng gồm một vùng (hoặc miền) thay đổi của chuỗi nặng (trong này được viết tắt là HCVR hoặc VH) và một vùng ổn định của chuỗi nặng. Vùng ổn định của chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ gồm một vùng thay đổi của chuỗi nhẹ (trong này được viết tắt là LCVR hoặc VL) và một vùng ổn định của chuỗi nhẹ. Vùng ổn định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền, CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng quyết định tính bổ trợ (CDR), nằm rải rác cùng với các vùng được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp tính từ đầu tận amino tới đầu tận carboxy theo trình tự: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng thay đổi của các chuỗi nặng và nhẹ chứa vùng gắn kết tương tác với kháng nguyên. Các vùng ổn định của các kháng thể có thể thông qua trung gian gắn kết của globulin miễn dịch với các mô hoặc các yếu tố của vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào tác động) và thành phần đầu tiên (Clq) của hệ thống bổ thể kinh điển.

Các chuỗi nặng của globulin miễn dịch có thể được chia thành ba vùng

chức năng: vùng Fd, vùng bản lề, và vùng Fc (phần có thể kết tinh được). Vùng Fd bao gồm các vùng VH và CH1 và, kết hợp với chuỗi nhẹ, tạo ra Fab là phần gắn kết kháng nguyên. Phần Fc quyết định các chức năng tác động của globulin miễn dịch, chúng bao gồm, ví dụ, quy định tính bổ trợ và gắn kết vào các thụ thể cognat Fc của các tế bào tác động. Vùng bản lề, được tìm thấy trong các nhóm globulin miễn dịch IgG, IgA, và IgD, có tác dụng làm đoạn chêm mềm dẻo cho phép phân Fab dịch chuyển tự do trong không gian xung quanh vùng Fc. Các vùng bản lề khác nhau về mặt cấu trúc, khác về cả trình tự lẫn độ dài giữa các nhóm và các phân nhóm globulin miễn dịch.

Theo các nghiên cứu tinh thể học, vùng bản lề của globulin miễn dịch có thể được chi nhỏ tiếp về mặt cấu trúc và theo chức năng thành ba vùng: bản lề trên, lõi, và bản lề dưới (Shin et al., Immunological Reviews 130:87, 1992). Bản lề trên bao gồm các axit amin từ đầu carboxyl của CH1 tới gốc đầu tiên trong bản lề giới hạn sự chuyển động, nói chung gốc cystein đầu tiên tạo ra liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng. Độ dài của vùng bản lề trên tương quan với tính mềm dẻo của mạch của kháng thể. Vùng bản lề lõi chứa các cầu disulfua giữa các chuỗi nặng. Vùng bản lề dưới liên kết đầu cuối amino của, và bao gồm các gốc trong vùng CH2. Vùng lõi bản lề của IgG1 ở người chứa chuỗi Cys-Pro-Pro-Cys mà nó khi được dime hóa bởi liên kết disulfua tạo nên octapeptit vòng được xem là đóng vai trò làm một trục quay, nhờ vậy tạo nên tính mềm dẻo. Các thay đổi cấu dạng được quyết định bởi cấu trúc và tính mềm dẻo của vùng bản lề của trình tự polypeptit của globulin miễn dịch có thể ảnh hưởng tới các chức năng tác động của phần Fc của kháng thể.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc được sử dụng theo nghĩa thông thường của nó để chỉ kháng thể thu được từ nhóm các kháng thể gần như là đồng nhất, tức là các kháng thể riêng lẻ có trong nhóm là giống nhau, trừ các đột biến xuất hiện trong tự nhiên có thể mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Nói cách khác, kháng thể đơn dòng là kháng thể đồng nhất thu được từ quá trình tăng sinh của một dòng tế bào (ví dụ các tế bào lai, các tế bào chủ có nhân điển hình được chuyển nhiễm với ADN mã hóa kháng thể đồng nhất, các tế bào chủ không có nhân điển hình được biến nạp với ADN mã hóa kháng thể đồng nhất, v.v.), và nói chung khác biệt ở chuỗi nặng của một nhóm và phân nhóm, và chuỗi nhẹ của một

loại. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao chống lại một kháng nguyên. Hơn thế nữa, trái với chế phẩm chứa các kháng thể đa dòng thường bao gồm các kháng thể khác nhau chống lại yếu tố quyết định khác nhau, hoặc epitop, thì mỗi kháng thể đơn dòng được định hướng chống lại một yếu tố quyết định trên kháng nguyên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ polypeptit, trình tự polypeptit, trình tự axit amin, peptit và các protein được gắn vào các hợp chất kháng thể hoặc vào trình tự của chúng có thể được dùng hoán đổi cho nhau.

Sáng chế đề cập tới kháng thể đơn dòng, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, có khả năng ức chế quá trình dime hóa c-Met và bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 1, 2 và 3 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với các trình tự SEQ ID No. 1, 2 và 3; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 5, 6 và 7 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với các trình tự SEQ ID No. 5, 6 hoặc 7, kháng thể này còn được đặc tả ở chỗ, nó còn bao gồm vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 56.

Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập tới kháng thể đơn dòng, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, như nêu trên được đặc tả ở chỗ, nó còn bao gồm vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 57.

Nói cách khác, sáng chế đề cập tới kháng thể đơn dòng, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, có khả năng ức chế quá trình dime hóa c-Met và bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 1, 2 và 3 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với các trình tự SEQ ID No. 1, 2 và 3; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 5, 6 và 7 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với các trình tự SEQ ID No. 5, 6 hoặc 7, kháng thể này còn được đặc tả ở chỗ, nó còn bao gồm vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 57.

Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập tới kháng thể đơn dòng, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, như nêu trên được đặc tả ở chỗ, nó còn bao gồm vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 21.

Nói cách khác, sáng chế cũng đề cập tới kháng thể đơn dòng, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, có khả năng ức chế quá trình dime hóa c-Met và bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 1, 2 và 3 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với các trình tự SEQ ID No. 1, 2 và 3; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 5, 6 và 7 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với các trình tự SEQ ID No. 5, 6 hoặc 7, kháng thể này còn được đặc tả ở chỗ, nó còn bao gồm vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 21.

Điều rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này là, các trình tự đồng thuận SEQ ID No. 57 và 21 là bao gồm trong trình tự đồng thuận SEQ ID No. 56.

Bảng 1

	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10	#11	#12	#13	#14
SEQ ID NO 56	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	X11	X12	C	X14
SEQ ID NO 57	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	P	P	C	P
SEQ ID NO 21	X1	X2	X3	C	X5	-	C	X8	X9	C	X11	X12	C	X14

Đối với SEQ ID No. 56:

X1: P, R, C, -	X5: D, C, G, -	X8: H, V, K, -	X12: P, -
X2: K, C, R, -	X6: K, C, -	X9: T, C, E, P, -	X14: P, T
X3: S, C, D, -	X7: T, C, -	X11: P, I	

Các thuật ngữ "các đoạn chức năng" và "các dẫn xuất" sẽ được xác định chi tiết hơn trong phần mô tả ở dưới.

Thuật ngữ các vùng CDR hoặc (các) CDR, được dùng để chỉ vùng siêu biến của các chuỗi nặng và nhẹ của các globulin miễn dịch như được định nghĩa bởi IMGT.

Hệ thống đánh số đơn nhất IMGT được định nghĩa để so sánh các vùng thay đổi cho mọi kháng nguyên thụ thể, kiểu chuỗi, hoặc mọi loài [Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, *Dev. Comp. Immunol*, 27, 55-77 (2003)]. Theo hệ thống đánh số đơn nhất IMGT, các axit amin được bảo toàn thường có cùng vị trí, ví dụ, xystein 23 (1st-CYS), tryptophan 41 (CONSERVED-TRP), axit amin kỵ nước 89, xystein 104 (2nd-CYS), phenylalanin hoặc tryptophan 118 (J-PHE hoặc J-TRP). Hệ thống đánh số đơn nhất IMGT đưa ra sự phân định ranh giới đã quy chuẩn của vùng khung (FR1-IMGT: các vị trí từ 1 tới 26, FR2-IMGT: 39 tới 55, FR3-IMGT: 66 tới 104 và FR4-IMGT: 118 tới 128) và của vùng quyết định tính bổ trợ: CDR1-IMGT: 27 tới 38, CDR2-IMGT: 56 tới 65 và CDR3-IMGT: 105 tới 117. Do các khe hở thể hiện các vị trí bỏ trống, nên các độ dài CDR-IMGT (được thể hiện trong các dấu ngoặc và được cách bởi các dấu chấm, ví dụ như [8.8.13]) trở thành thông tin quan trọng. Hệ thống đánh số đơn nhất IMGT được sử dụng dưới dạng biểu thị đồ họa hai chiều, được ký hiệu là IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. và Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], và dưới dạng biểu thị cấu trúc 3 chiều trong IMGT/3Dstructures-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. và Lefranc, M.-P., *T cell receptor and MHC structural data. Nucl. acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Tồn tại ba CDR của chuỗi nặng và 3 CDR của chuỗi nhẹ. Thuật ngữ CDR hoặc các CDR được dùng ở đây để chỉ, tùy từng trường hợp, một trong các vùng này hoặc một vài, hoặc thậm chí toàn bộ các vùng chứa phần chủ yếu của các gốc axit amin có thể đáp ứng cho ái lực gắn kết của kháng thể đối với kháng nguyên hoặc epitop mà nó nhận diện.

Trong nội dung của sáng chế, thuật ngữ "phần trăm tính tương đồng" giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin để chỉ tỷ lệ phần trăm của các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống hệt nhau giữa hai trình tự cần được so sánh, được tạo ra sau khi sắp thẳng hàng tối ưu, tỷ lệ phần trăm này hoàn toàn chỉ là số thống kê và sự khác nhau giữa hai trình tự được phân bố một cách ngẫu nhiên dọc theo chiều dài của chúng. Sự so sánh giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được

tiến hành thông thường bằng cách so sánh các trình tự sau khi sắp thẳng hàng một cách tối ưu chúng, sự so sánh này có thể được thực hiện theo kiểu từng đoạn hoặc bằng cách sử dụng "cửa sổ sắp thẳng hàng". Ngoài ra việc so sánh thủ công, sự sắp thẳng hàng tối ưu các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, bằng thuật toán thuật toán thấu xạ cục bộ của Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], bằng thuật toán thấu xạ cục bộ của Neddleman and Wunsch (1970) [J. MoI. Biol. 48:443], bằng phương pháp tra cứu tính đồng dạng của Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] hoặc bằng phần mềm máy tính bằng cách sử dụng các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA trong the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, hoặc bằng phần mềm so sánh BLAST NR hoặc BLAST P).

Phần trăm tính tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin được xác định bằng cách so sánh hai trình tự đã sắp thẳng hàng tối ưu trong đó trình tự axit nucleic hoặc axit amin để so sánh có thể có các đoạn bổ sung hoặc các khuyết đoạn so với trình tự đối chứng để sắp thẳng hàng tối ưu giữa hai trình tự. Phần trăm tính tương đồng được tính toán bằng cách xác định số lượng các vị trí mà ở đó nucleotit hoặc gốc axit amin là giống hệt nhau giữa hai trình tự, tốt hơn là giữa hai trình tự đầy đủ, chia số lượng các vị trí giống hệt nhau cho tổng số các vị trí trong cửa sổ sắp thẳng hàng và nhân kết quả với 100 để thu được phần trăm tính tương đồng giữa hai trình tự.

Ví dụ, chương trình BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein và nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) có bán trên trang web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, có thể được sử dụng cùng với các thông số mặc định (đặc biệt là đối với các thông số "open gap penalty": 5, và "extension gap penalty": 2; nên được chọn ví dụ là nền "BLOSUM 62" được đề xuất bởi chương trình này); phần trăm tính tương đồng giữa hai trình tự để so sánh được tính toán trực tiếp bởi chương trình này.

Đối với trình tự axit amin biểu hiện tính tương đồng ít nhất là 80%, tốt hơn là 85%, 90%, 95% và 98% với trình tự axit amin đối chứng, các ví dụ được ưu tiên bao gồm các trình tự chứa trình tự đối chứng, một vài cải biến, đặc biệt là đoạn

khuyết, đoạn bổ sung hoặc đoạn thay thế của ít nhất một axit amin, phân cắt hoặc nhô ra. Trong trường hợp thay thế một hoặc nhiều axit amin liên tiếp hoặc không liên tiếp, các phần tử thay thế được ưu tiên trong đó các axit amin được thế được thay thế bởi các axit amin "tương đương". Trong này, thuật ngữ "axit amin tương đương" để chỉ các axit amin bất kỳ kiểu như được thế cho một trong số các axit amin cấu trúc nhưng không làm cải biến các hoạt tính sinh học của các kháng thể tương ứng và của các ví dụ tính đặc hiệu được xác định ở dưới. Các axit amin tương đương có thể được xác định hoặc là dựa theo tính tương đồng cấu trúc với các axit amin mà chúng được thế hoặc là dựa theo các kết quả của các thử nghiệm so sánh hoạt tính sinh học giữa các kháng thể khác nhau có thể được tiến hành.

Để ví dụ, có thể kể đến khả năng thay thế có thể được tiến hành mà không làm thay đổi nhiều về hoạt tính sinh học của kháng thể được cải biến tương ứng.

Để làm ví dụ minh họa, bảng dưới đây 2 đưa ra các khả năng thay thế có thể có được sự bảo toàn về hoạt tính sinh học của kháng thể cải biến. Tất nhiên, cũng có thể có thay thế ngược trong cùng một điều kiện.

Bảng 2

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

Cần phải hiểu rằng sáng chế không đề cập tới các kháng thể ở dạng tự nhiên, điều đó có nghĩa là chúng không có trong môi trường tự nhiên của chúng mà chúng có thể được phân lập hoặc thu được bằng cách tinh chế từ các nguồn tự nhiên, hoặc thu được bằng cách tái tổ hợp di truyền, hoặc bằng cách tổng hợp hoá học, và sau đó chúng có thể chứa các axit amin không có trong tự nhiên như sẽ được mô tả tiếp dưới đây.

Cũng cần phải hiểu là, như đã nêu trên, cụ thể hơn sáng chế đề cập tới kháng thể đơn dòng có hóa trị hai khả năng và/hoặc được làm giống như ở người, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai bất kỳ, có hoạt tính đối kháng. Các kháng thể có hóa trị hai theo các giải pháp kỹ thuật đã biết là các chất chủ vận hoặc các chất chủ vận không hoàn toàn. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế, bao gồm bản lề đã được cải biến như nêu trên, tức là bao gồm vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 56, 57 hoặc 21, là mới và đặc biệt là thể hiện hoạt tính đối kháng được cải thiện so với kháng thể khả năng hoặc được làm giống như ở người 224G11 không có bản lề đã được cải biến như vậy như được làm rõ trong các ví dụ dưới đây.

Khác hẳn với tình trạng kỹ thuật, các tác giả sáng chế đã tạo ra được hoạt tính đối kháng được cải thiện mà không cần cải biến formate của kháng thể. Thực tế là, tình trạng kỹ thuật gần nhất của sáng chế được đại diện bởi kháng thể 5D5, điều tất yếu là phải phát triển phần có hóa trị một của kháng thể để tạo ra hoạt tính đối kháng. Theo sáng chế này, nhờ việc sử dụng bản lề theo sáng chế, lần đầu tiên có thể tạo ra được kháng thể có hóa trị hai đầy đủ có hoạt tính đối kháng cao, và điều này là hoàn toàn trái ngược với các kỹ thuật chung.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế bao gồm vùng bản lề chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID No. từ 22 tới 28 và từ 58 tới 72, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với các trình tự SEQ ID No. từ 22 tới 28 và từ 58 tới 72.

Để cho rõ ràng hơn, các Bảng 3 và 4 dưới đây nhóm lại các trình tự axit amin và nucleotit có các bản vẽ được ưu tiên khác nhau theo sáng chế.

Bảng 3

SEQ ID No.	Các axit amin	SEQ ID No.	Nucleotit
22	RKCCVECPCP	29	AGGAAGTGCTGTGTGGAGTGCCCCCCTGCCCA

23	PRDCGCKPCICT	30	CCCCGGGACTGTGGGTGCAAGCCTTGCATTTGTACC
24	PKSCGCKPCICT	31	CCCAAGAGCTGTGGGTGCAAGCCTTGCATTTGTACC
25	PKSCGCKPCICP	32	CCAAAGAGCTGCGGTGCAAGCCTTGTATCTGTCCC
26	PRDCGCKPCPPC P	33	CCACGGGACTGTGGGTGCAAGCCCTGCCCTCCGTGT CCA
27	PRDCGCHTCPPC P	34	CCCAGAGACTGTGGGTGTCACACCTGCCCTCCTTGTC CT
28	PKSCDCHCPPCP	35	CCCAAAAGCTGCGATTGCCACTGTCCTCCATGTCCA

Bảng 4

SEQ ID No.	Các axit amin	SEQ ID No.	Nucleotit
58	CKSCDKTHTCPPCP	73	TGCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
59	PCSCDKTHTCPPCP	74	CCCTGCAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
60	PKCCDKTHTCPPCP	75	CCCAAGTGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
61	PKSCCKTHTCPPCP	76	CCTAAGAGCTGTTGCAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
62	PKSCDKTHTCPPCP	77	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
63	PKSCDKCHTCPPCP	78	CCCAAGAGCTGCGACAAGTGCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
64	PKSCDKTHCCPPCP	79	CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACTGCTGTCCCCCTGCCCT
65	KCDKTHTCPPCP	80	AAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
66	PKSCDCHTCPPCP	81	CCCAAGAGCTGCGACTGCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
67	PKSCDCHTCPPCP	82	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACTGCCCCCTGCCCT
68	PCSKHTTCPPCP	83	CCCTGCAGCTGCAAGCACACCTGTCCCCCTGCCCT
69	PSCCTHTTCPPCP	84	CCTAGCTGCTGCACCCACACCTGTCCCCCTGCCCT
70	PSCDKHCCPPCP	85	CCCAGCTGCGACAAGCACTGCTGCCCCCTGCCCT
71	PKSCTCPPCP	86	CCCAAGAGCTGCACCTGTCCCCCTGTCTCT
72	PKSCDKCVCPPCP	87	CCCAAGAGCTGCGATAAGTGCGTGGAGTGCCCCCTGTCTCT

Theo phương án thứ nhất, kháng thể sẽ được xác định bởi trình tự chuỗi nặng của nó. Cụ thể hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc các đoạn chức năng của nó, được đặc tả ở chỗ, nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDR được chọn trong số các CDR bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. từ 1 tới 3.

Các trình tự này bao gồm các trình tự dưới đây:

SEQ ID No. 1: GYIFTAYT

SEQ ID No. 2: IKPNNGLA

SEQ ID No. 3: ARSEITTEFDY

Theo một khía cạnh được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc các đoạn chức năng của nó, bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một, tốt hơn là hai, và tốt nhất là ba CDR được chọn trong số CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3, trong đó:

- CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 1,
- CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 2,

- CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 3.

Theo phương án thứ hai, kháng thể sẽ được xác định bởi trình tự chuỗi nhẹ của nó. Cụ thể hơn là, theo khía cạnh cụ thể thứ hai của sáng chế, kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc các đoạn chức năng của nó, được đặc tả ở chỗ, nó bao gồm chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDR được chọn trong số các CDR bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. từ 5 tới 7.

Các trình tự này bao gồm các trình tự dưới đây:

SEQ ID No. 5: ESVDSYANSF

SEQ ID No. 6: RAS

SEQ ID No. 7: QQSKEDPLT

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, kháng thể theo sáng chế, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc các đoạn chức năng của nó, bao gồm chuỗi nhẹ chứa ít nhất một, tốt hơn là hai, và tốt nhất là ba CDR được chọn trong số CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3, trong đó:

- CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 5,
- CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 6,
- CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 7.

Dòng tế bào lai ở chuột có khả năng tiết các kháng thể đơn dòng theo sáng chế, đặc biệt là các tế bào lai có nguồn gốc từ chuột, đã được nộp lưu ở CNCM (Institut Pasteur, Paris, France) ngày 03/14/2007 với số hiệu CNCM I-3731.

Trong Phân mô tả này, IgG1 là được ưu tiên để có được chức năng tác động, và tốt nhất là ADCC và CDC.

Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ thừa nhận rằng chức năng tác động bao gồm, ví dụ, gắn kết C1q; độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); gắn kết thụ thể Fc; độc tính tế bào do tế bào phụ thuộc kháng thể gây ra (ADCC); quá trình thực bào; và quá trình điều hòa giảm của thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B; BCR).

Các kháng thể theo sáng chế, tốt hơn là các kháng thể đơn dòng đặc hiệu, đặc biệt là các kháng thể có nguồn gốc từ chuột, khảm hoặc được làm giống như ở người, có thể thu được theo các phương pháp chuẩn mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Nói chung, để điều chế các kháng thể đơn dòng hoặc các dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của chúng, đặc biệt là có nguồn gốc từ chuột, có thể sử dụng kỹ

thuật được mô tả một cách cụ thể trong ấn phẩm the manual “Antibodies” (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) hoặc kỹ thuật điều chế từ tế bào lai được mô tả trong ấn phẩm Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể thu được, ví dụ, từ tế bào động vật được gây miễn dịch kháng c-Met, hoặc một trong số các đoạn của nó chứa epitop được nhận biết một cách đặc hiệu bằng các kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Tốt hơn, nếu c-Met này, hoặc một trong số các đoạn của nó, có thể được tạo ra theo các phương pháp thông thường, bằng cách tái tổ hợp di truyền đi từ trình tự axit nucleic có trong trình tự ADN bổ trợ mã hoá c-Met hoặc bằng cách tổng hợp peptit đi từ trình tự axit amin có trong trình tự peptit của c-Met.

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể, ví dụ, được tinh chế trên cột ái lực, trên đó c-Met hoặc một trong số các đoạn của nó chứa epitop được nhận biết một cách đặc hiệu bởi các kháng thể đơn dòng theo sáng chế đã được cố định trước đó. Cụ thể hơn, các kháng thể đơn dòng này có thể được tinh chế bằng sắc ký trên protein A và/hoặc G, sau đó có hoặc không có bước sắc ký trao đổi ion nhằm mục đích khử bỏ tạp chất protein còn lại cũng như ADN và LPS, bản thân nó sau đó cần hoặc không cần có bước sắc ký loại trừ trên gel Sepharosa™ để khử bỏ các kết tụ tiềm năng do sự có mặt của các dime hoặc multime khác. Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, tất cả các kỹ thuật này có thể được sử dụng một cách đồng thời hoặc lần lượt.

Tốt hơn nếu kháng thể theo sáng chế, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, là kháng thể khảm.

Thuật ngữ kháng thể khảm được dự định để chỉ kháng thể chứa vùng (chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) thay đổi tự nhiên thu được từ kháng thể của các loài đã nêu kết hợp với các vùng ổn định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể của các loài khác so với loài các loài đã nêu này (ví dụ chuột nhắt, ngựa, thỏ, chó, bò, gà, v.v.).

Các kháng thể hoặc các đoạn của chúng thuộc loại khảm theo sáng chế có thể được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Ví dụ, kháng thể khảm có thể được tạo ra bằng cách tạo dòng ADN tái tổ hợp chứa gen khởi đầu và trình tự mã hoá vùng thay đổi của kháng thể đơn dòng không phải người, đặc

biệt là chuột, theo sáng chế và trình tự mã hoá vùng ổn định của kháng thể người. Kháng thể khảm theo sáng chế được mã hoá bởi gen tái tổ hợp như vậy sẽ là, ví dụ, thể khảm chuột nhất-người, tính đặc hiệu của kháng thể này được xác định bởi vùng thay đổi thu được từ ADN chuột và isotyp của nó được xác định bởi vùng ổn định thu được từ ADN người. Đối với các phương pháp điều chế các kháng thể khảm, có thể tham khảo các ấn phẩm Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) hoặc US 4,816,567 chẳng hạn.

Cụ thể hơn là, kháng thể nêu trên, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng loại khảm có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 46.

SEQ ID No. 46: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSL
GESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSA
VYYCARSEITTEFDYWGQGTALTIVSS

Cụ thể hơn là, kháng thể nêu trên, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, chứa vùng thay đổi của chuỗi nhẹ loại khảm có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 47.

SEQ ID No. 47: DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQ
QKPGQPPKLLIYRASNLGSGIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQ
QSKEDPLTFGSGTKLEMKR

Cụ thể hơn là, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [IgG2chim], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 22.

Trong Phần mô tả này, việc sử dụng các dấu ngoặc vuông là không bắt buộc và, xem như một ví dụ, sự viện dẫn đến [224G11] [IgG2chim] phải được xem là tương tự như 224G11IgG2chim. Theo cách hiểu như vậy, để biểu thị rằng kháng thể là kháng thể ở chuột, thuật ngữ chuột hoặc chữ cái m có thể được thêm vào; để biểu thị kháng thể là kháng thể khảm, thuật ngữ khảm hoặc chữ cái c có thể được thêm

vào và; để biểu thị rằng kháng thể là kháng thể được làm giống như ở người, thuật ngữ người, các chữ viết tắt hz, Hz hoặc chữ cái h có thể được thêm vào. Như một ví dụ, kháng thể khảm 224G1IgG2 có thể được viết là c224G11IgG2, c224G11[IgG2], c[224G11]IgG2, c[224G11][IgG2], 224G11IgG2chim, 224G11[IgG2chim], [224G11]IgG2chim hoặc [224G11][IgG2chim].

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [TH7chim], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 28.

Trong Phần mô tả này, sự viện dẫn tới TH7 phải được xem là tương tự như C7Δ6-9 hoặc TH7C7Δ6-9. Ký hiệu Δ để chỉ sự mất đoạn.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [MHchim], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 23.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [MUP9Hchim], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 26.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [MMCHchim], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 24.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C1], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 58.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C2], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 59.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C3], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 60.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C5], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 61.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C6], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 62.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C7], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 63.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C9], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 64.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [

$\Delta 1-3$], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 65.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C7 Δ 6], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 66.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C6 Δ 9], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 67.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C2 Δ 5-7], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 68.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C5 Δ 2-6], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 69.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [C9 Δ 2-7], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 70.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [Δ 5-6-7-8], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID

No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 71.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [IgG1/IgG2], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 46, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 47, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 72.

Tốt hơn nếu kháng thể theo sáng chế, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, là kháng thể ở người.

Thuật ngữ “kháng thể ở người” bao gồm tất cả các kháng thể có một hoặc nhiều vùng thay đổi và vùng ổn định có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch ở người. Theo một phương án được ưu tiên, tất cả các miền (hoặc vùng) thay đổi và ổn định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch ở người (kháng thể ở người có độ đầy đủ). Nói cách khác, nó bao gồm kháng thể bất kỳ các các vùng thay đổi và ổn định (nếu có mặt) có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch của dòng tế bào gốc mầm ở người, tức là có trình tự axit amin tương ứng với trình tự của kháng thể được tạo ra bởi người và/hoặc được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ để tạo ra các kháng thể ở người đã biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng ở người được tạo ra bởi dòng tế bào lai bao gồm tế bào B được tạo ra từ động vật không phải người chuyển gen, ví dụ, chuột chuyển gen, có hệ gen bao gồm a gen chuyển chuỗi nặng ở người và gen chuyển chuỗi nhẹ ở người đã dung hợp với tế bào đã làm bất tử.

Một ví dụ về chuột chuyển gen như vậy, là có thể kể đến XENOMOUSE™ dòng chuột nhất được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền bao gồm các đoạn lớn của các locus globulin miễn dịch ở người và sự thiết hụt về sự sản xuất kháng thể ở chuột nhất (Green et al., 1994, Nature Genetics, 7:13-21). XENOMOUSE™ sản xuất kho các kháng thể đầy đủ ở người giống như người trưởng thành, và tạo ra các kháng thể đơn dòng ở người kháng nguyên đặc hiệu. Sự sản xuất thứ hai của XENOMOUSE™ chứa khoảng 80% kho kháng thể ở người (Green & Jakobovits, 1998, J. Exp. Med., 188:483-495).

Kỹ thuật khác bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, như kỹ thuật phage display, cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể ở người theo sáng chế.

Tốt hơn nếu kháng thể theo sáng chế, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, là kháng thể được làm giống như ở người.

Thuật ngữ "kháng thể được làm giống như ở người" được dự định để chỉ kháng thể chứa các vùng CDR thu được từ kháng thể có nguồn gốc không phải người, các phần khác của phân tử kháng thể thu được từ một (hoặc từ một số) kháng thể người. Ngoài ra, một số gốc của các đoạn khung (được gọi là FR) có thể được cải biến để bảo toàn ái lực gắn kết (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327, 1988).

Kháng thể được làm giống như ở người theo sáng chế hoặc các đoạn của chúng có thể được điều chế bằng các kỹ thuật mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết (ví dụ như các kỹ thuật được mô tả trong ấn phẩm Singer et al., *J. Immun.* 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10: 1-142, 1992; hoặc Bebbington et al., *Bio/Technology*, 10:169-175, 1992).

Một phương pháp làm giống như ở người khác là đã được chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến, ví dụ, phương pháp "ghép CDR" được Protein Design Lab (PDL) mô tả trong các đơn yêu cầu cấp patent số EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 hoặc US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 và US 5,693,761. Cũng có thể kể đến các đơn yêu cầu cấp patent sau : US 5,639,641; US 6,054,297; US 5,886,152 và US 5,877,293.

Cụ thể hơn là, kháng thể nêu trên, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng được làm giống như ở người có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 4.

SEQ ID No. 4: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWVRQA
PGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD
DTAVYYCARSEITTEFDYWGQGTLVTVSS

Cụ thể hơn là, kháng thể nêu trên, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, chứa vùng thay đổi của chuỗi nhẹ được làm giống như ở người được chọn từ

nhóm gồm các trình tự bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 8, 9 hoặc 10 hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 8, 9 hoặc 10.

SEQ ID No. 8: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYANSFMHWYQQ
KPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQS
KEDPLTFGGGTKVEIKR

SEQ ID No. 9: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYANSFMHWYQ
QKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QSKEDPLTFGGGTKVEIKR

SEQ ID No. 10: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYANSFLHWYQ
QKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QSKEDPLTFGGGTKVEIKR

Cụ thể hơn là, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [IgG2Hz1], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 8, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 22.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [IgG2Hz2], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 9, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 22.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [IgG2Hz3], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 10, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 22.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [TH7Hz1], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 8, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 28.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [TH7z2], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 9, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 28.

Theo một khía cạnh khác, một kháng thể được ưu tiên, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hóa trị hai của nó, theo sáng chế và được đặt tên là [224G11] [TH7Hz3], chứa vùng thay đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4, vùng thay đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 10, và vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 28.

Theo một khía cạnh khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được mô tả bởi toàn bộ các chuỗi nặng và nhẹ của chúng, một cách tương ứng.

Ví dụ, kháng thể [224G11] [IgG2chim] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 50, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 50, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [TH7chim] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 51, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 51, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C1] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 88, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 88, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C2] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 89, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 89, và

chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C3] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 90, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 90, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C5] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 91, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 91, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C6] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 92, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 92, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C7] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 93, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 93, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C9] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 94, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 94, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính

tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [Δ 1-3] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 95, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 95, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C7 Δ 6] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 96, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 96, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C6 Δ 9] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 97, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 97, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C2 Δ 5-7] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 98, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 98, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C5 Δ 2-6] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 99, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 99, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [C9Δ2-7] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 100, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 100, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [Δ5-6-7-8] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 101, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 101, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [IgG1/IgG2] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 102, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 102, và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 52, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 52.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [IgG2Hz1] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 36, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 36 và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 38, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 38.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [IgG2Hz2] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 36, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 36 và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 39, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 39.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [IgG2Hz3] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 36, hoặc trình tự có tính

tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 36 và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 40, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 40.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [TH7Hz1] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 37, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 37 và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 38, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 38.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [TH7Hz2] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 37, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 37 và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 39, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 39.

Một ví dụ khác, kháng thể [224G11] [TH7Hz3] theo sáng chế chứa chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 37, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 37 và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 40, hoặc trình tự có tính tương đồng ít nhất là 80% sau khi sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự SEQ ID No. 40.

Các ví dụ khác về các kháng thể, hoặc các dẫn xuất của chúng, theo sáng chế chứa các chuỗi đầy đủ bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID No. từ 88 tới 102 (tương ứng với các trình tự nucleotit SEQ ID No. từ 103 tới 117).

Thuật ngữ “đoạn chức năng” của kháng thể theo sáng chế được dự định để chỉ cụ thể đoạn kháng thể, như các đoạn Fv, scFv (sc đối với chuỗi đơn), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc hoặc các diabody, hoặc phân đoạn bất kỳ của nó, thời gian bán tồn sẽ được tăng lên bằng cách cải biến hoá học, như poly(alkylen) glycol bổ sung như poly(etylen) glycol (“PEG hoá”) (các đoạn được peg hóa được gọi là Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG hoặc Fab'-PEG) (“PEG” đối với

Poly(Etylen) Glycol), hoặc bằng cách kết hợp trong liposom, các đoạn này có ít nhất một CDR đặc thù có trình tự SEQ ID No. từ 1 tới và từ 5 tới 7 theo sáng chế, và, đặc biệt là, ở chỗ nó có khả năng tác động theo cách chung, hoạt tính cục bộ ngang bằng của kháng thể từ đó nó được sinh ra, cụ thể như khả năng nhận biết và gắn kết với c-Met, và, nếu cần, ức chế hoạt tính của c-Met.

Tốt hơn, nếu các đoạn chức năng này sẽ được tạo thành hoặc sẽ bao gồm trình tự không đầy đủ của chuỗi thay đổi nặng hoặc nhẹ của kháng thể mà từ đó chúng được tạo ra, trình tự không đầy đủ này là đủ để giữ được cùng một tính đặc hiệu gắn kết như kháng thể đó nó được sinh ra và có ái lực đủ, tốt hơn nếu ít nhất bằng 1/100, theo cách được ưu tiên hơn, ít nhất là 1/10 so với kháng thể từ đó nó được sinh ra, đối với c-Met. Đoạn chức năng như vậy sẽ chứa tối thiểu 5 axit amin, tốt hơn là 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 và 100 axit amin liên tiếp trên trình tự của kháng thể từ đó nó được sinh ra.

Tốt hơn, nếu các đoạn chức năng này sẽ là các đoạn Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc type hoặc các diabody, nói chung chúng có cùng một tính đặc hiệu gắn kết như kháng thể từ đó chúng được sinh ra. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các đoạn này được chọn từ các đoạn có hoá trị hai như đoạn F(ab')₂. Theo sáng chế, đoạn kháng thể theo sáng chế có thể thu được bắt đầu từ các kháng thể như được mô tả trên đây bằng các phương pháp như phân huỷ bằng enzym, như pepsin hoặc papain và/hoặc bằng cách phân giải các liên kết cầu disulfua bằng cách khử hoá học. Theo cách khác, các đoạn kháng thể được bao gồm trong sáng chế có thể thu được bằng các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền như chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết hoặc bằng cách tổng hợp peptit, ví dụ, thiết bị tổng hợp peptit tự động như các thiết bị do công ty Applied Biosystems cung cấp, v.v..

Cần phải hiểu rằng thuật ngữ “đoạn có hoá trị hai” là đoạn kháng thể bất kỳ chứa hai nhánh và, cụ thể hơn, các đoạn F(ab')₂.

Thuật ngữ “dẫn xuất” của kháng thể theo sáng chế được dùng để chỉ protein gắn kết có cấu trúc giàn giáo protein và ít nhất một trong số các CDR được chọn từ kháng thể ban đầu để duy trì khả năng gắn kết. Các hợp chất như vậy là đã được chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết và sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn trong phần mô tả dưới đây.

Cụ thể hơn, kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của nó theo sáng chế khác biệt ở chỗ dẫn xuất chứa protein gắn kết có cấu trúc giàn giáo trên đó ít nhất một CDR được ghép để bảo toàn về đặc tính nhận biết paratopic của kháng thể ban đầu.

Một hoặc một số trình tự trong 6 trình tự CDR được mô tả trong sáng chế có thể được thể hiện trên cấu trúc giàn giáo protein. Trong trường hợp này, cấu trúc giàn giáo protein tái tạo mạch chính protein có cấu trúc cuộn gấp thích hợp của CDR được ghép, do đó cho phép nó (hoặc chúng) duy trì được đặc tính nhận biết paratopic kháng nguyên của chúng.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này biết cách chọn lọc cấu trúc giàn giáo protein trên đó ít nhất một CDR được chọn từ kháng thể ban đầu có thể được ghép. Cụ thể hơn, đã biết rằng để chọn được, cấu trúc giàn giáo như vậy phải biểu hiện một số dấu hiệu như sau (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187):

- sự bảo toàn tốt về mặt di truyền hình thể
- kiến trúc mạnh với tổ chức phân tử ba chiều đã biết (ví dụ như tinh thể học hoặc NMR),
- kích thước nhỏ,
- các cải biến sau dịch mã là không có hoặc chỉ ở mức thấp,

để tạo ra, biểu hiện và tinh chế.

Cấu trúc giàn giáo protein như vậy có thể là, nhưng không nhằm mục đích giới hạn, cấu trúc được chọn từ nhóm bao gồm fibronectin và tốt hơn là miền fibronectin thứ mười loại III (FNfn10), lipocalin, anticalin (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), dẫn xuất protein Z từ miền B của staphylococcal protein A, thioredoxin A hoặc protein bất kỳ có miền lặp lại như “miền lặp ankyrin” (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), “miền lặp armadillo”, “miền lặp giàu leuxin” hoặc “miền lặp tetratricopeptit”.

Cũng có thể kể đến cấu trúc giàn giáo thu được từ các độc tố (ví dụ như độc tố bọ cạp, côn trùng, thực vật hoặc động vật thân mềm) hoặc chất ức chế protein loại nơron nitric oxyt syntaza (PIN).

Để làm ví dụ minh họa các cấu trúc lai, có thể kể đến cài xen CDR-H1 (chuỗi nặng) của kháng thể kháng CD4, tức là kháng thể 13B8.2, vào một trong vòng PIN. Đặc tính gắn kết của protein gắn kết thu được vẫn tương tự với kháng thể ban đầu (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344). Cũng có thể kể đến việc ghép CDR-H3 (chuỗi nặng) kháng thể VHH kháng lysozym trên vòng neocarzinostatin (Nicaise et al., 2004).

Như nêu trên, cấu trúc giàn giáo protein như vậy có thể bao gồm từ 1 tới 6 CDR từ kháng thể ban đầu. Theo phương án ưu tiên, nhưng không kèm theo giới hạn bất kỳ, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ lựa chọn ít nhất một CDR từ chuỗi nặng, chuỗi nặng này là được biết là có liên quan đặc biệt đến tính đặc hiệu của kháng thể. Việc chọn lọc CDR quan tâm sẽ là dễ dàng đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này với phương pháp đã biết (BES et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Để chứng minh, các ví dụ này là không mang tính giới hạn và cấu trúc giàn giáo khác bất kỳ đã biết hoặc được mô tả phải được bao gồm trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh mới, sáng chế đề cập tới axit nucleic đã được phân lập, khác biệt ở chỗ, nó được chọn trong số các axit nucleic sau:

- a) axit nucleic, ADN hoặc ARN, mã hóa cho kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc các đoạn chức năng của nó, theo sáng chế;
- b) trình tự axit nucleic bao gồm các trình tự SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13 và các trình tự SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16 và SEQ ID No. 17;
- c) trình tự axit nucleic bao gồm các trình tự SEQ ID No. 14 và SEQ ID No. 18, 19 hoặc 20;
- d) các axit nucleic ARN tương ứng của các axit nucleic như được xác định ở mục b) hoặc c);
- e) các axit nucleic bổ trợ của các axit nucleic như được xác định ở các mục a), b) và c); và
- f) axit nucleic có ít nhất 18 nucleotit có khả năng lai hoá trong các điều kiện rất nghiêm ngặt với ít nhất một trong số các CDR có các trình tự SEQ ID No. từ 11 tới 13 và từ 15 tới 17.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập tới axit nucleic đã được phân lập, khác biệt ở chỗ, nó được chọn trong số các axit nucleic sau:

- axit nucleic, ADN hoặc ARN, mã hóa cho kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc các đoạn chức năng của nó, theo sáng chế và trong đó trình tự nucleic mã hóa cho vùng bản lề của kháng thể nêu trên bao gồm hoặc có trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID No. từ 29 tới 35 và SEQ ID No. từ 73 tới 87.

Các thuật ngữ "axit nucleic", "trình tự nucleic", "trình tự axit nucleic", "polynucleotit", "oligonucleotit", "trình tự polynucleotit" và "trình tự nucleotit", được sử dụng hoán đổi cho nhau trong phần mô tả này, để chỉ trình tự chính xác của các nucleotit, đã được cải biến hoặc không được cải biến, xác định một đoạn hoặc một vùng axit nucleic, chứa các nucleotit không có trong tự nhiên hoặc không chứa, và là ADN sợi kép, hoặc là ADN sợi đơn hoặc là các sản phẩm phiên mã của các ADN này.

Cũng sẽ bao gồm trong này là sáng chế không chỉ đề cập tới các trình tự nucleotit trong môi trường chất nhiễm sắc tự nhiên của chúng, tức là, ở trạng thái tự nhiên. Các trình tự theo sáng chế đã được phân lập và/hoặc được tinh chế, tức là, chúng đã được lấy mẫu một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, ví dụ bằng cách sao chép, môi trường của chúng có đã cải biến ít nhất một phần. Các axit nucleic đã phân lập được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp, nhờ các tế bào chủ chẳng hạn, hoặc được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học cũng có thể được kể đến trong này.

Quá trình lai hóa dưới các điều kiện rất nghiêm ngặt để chỉ rằng các điều kiện liên quan tới nhiệt độ và cường độ ion được chọn lọc để sao cho chúng cho phép sự lai hóa được duy trì giữa hai đoạn ADN bổ trợ. Chỉ nhằm mục đích minh họa, các điều kiện rất nghiêm ngặt của bước lai hóa nhằm mục đích xác định các đoạn polynucleotit nêu trên là có lợi như dưới đây.

Sự lai hóa ADN-ADN hoặc ADN-ARN được tiến hành trong hai bước: (1) tiền lai hóa ở 42°C trong ba giờ trong chất đệm phosphat (20mM, độ pH = 7,5) chứa 5 x SSC (1x SSC tương ứng với dung dịch gồm 0,15M NaCl + 0,015M natri xitrat), 50% formamit, 7% natri dodecyl sulfat (SDS), 10X Denhardt, 5% dextran sulfat và 1% ADN tinh cá hồi; (2) lai hóa thực tế trong 20 giờ ở nhiệt độ tùy thuộc vào độ dài của đoạn dò (tức là: 42°C đối với đoạn dò có độ dài >100 nucleotit) được tiếp sau bởi hai lần rửa 20 phút ở 20°C trong 2X SSC + 2% SDS, một lần rửa 20 phút ở 20°C trong 0,1X SSC + 0,1% SDS. Lần rửa cuối được tiến hành trong 0,1X SSC + 0,1% SDS trong 30 phút ở 60°C đối với đoạn dò có độ dài >100 nucleotit. Các điều kiện lai hóa rất nghiêm ngặt nêu trên đối với một polynucleotit có kích cỡ đã xác định có thể được làm thích ứng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cho các oligonucleotit dài hơn hoặc ngắn hơn, theo các phương pháp

được mô tả trong ấn phẩm: Sambrook, et al (1989, Molecular cloning: a laboratory manual, a laboratory manual; 3rd Ed. Cold Spring Harbor).

Sáng chế cũng đề cập tới vật truyền chứa axit nucleic theo sáng chế.

Sáng chế đặc biệt đề cập tới các vật truyền tạo dòng vô tính và/hoặc biểu hiện chứa trình tự nucleotit theo sáng chế.

Tốt hơn nếu các vật truyền theo sáng chế chứa các dấu hiệu mà nó cho phép biểu hiện và/hoặc tiết các trình tự nucleotit trong một tế bào chủ nhất định. Do vậy, vật truyền này phải chứa gen khởi đầu, các tín hiệu khởi đầu và kết thúc dịch mã, cũng như các vùng điều hòa phiên mã thích hợp. Nó có thể phải được duy trì một cách thích hợp trong tế bào chủ và tùy ý có thể có các tín hiệu đặc hiệu đặc tả sự tiết của protein dịch mã. Các dấu hiệu khác nhau này được chọn lọc và được tối ưu hóa bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy thuộc vào tế bào chủ được sử dụng. Nhằm mục đích này, các trình tự nucleotit có thể được xen chính trong các vật chủ được chọn hoặc là các vật chủ tích hợp của các vật chủ được chọn.

Các vật truyền như vậy được điều chế bằng các phương pháp thường được sử dụng bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và các dòng vô tính thu được có thể được đưa vào vật chủ thích hợp bằng các phương pháp tiêu chuẩn như phương pháp lipofection (bọc vật liệu trong màng liposom), phương pháp đục lỗ bằng xung điện, các phương pháp sốc nhiệt hoặc các phương pháp hóa học.

Các vật truyền theo sáng chế gồm, ví dụ, các vật truyền có nguồn gốc plasmid hoặc virus. Chúng thường được dùng để biến nạp các tế bào chủ để tạo dòng vô tính hoặc biểu hiện các trình tự nucleotit theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất các tế bào chủ được biến nạp bởi hoặc chứa vật truyền theo sáng chế.

Tế bào chủ có thể được chọn trong số các hệ nhân rải rác hoặc nhân điển hình như các tế bào vi khuẩn, ví dụ, và cả các tế bào nấm men hoặc tế bào động vật, đặc biệt là tế bào động vật có vú. Tế bào côn trùng hoặc tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập tới động vật, không phải người, có ít nhất một tế bào đã được biến nạp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế là đề cập tới phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, đặc trưng ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước dưới đây:

a) nuôi cấy trong môi trường có các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho tế bào chủ theo sáng chế; và

b) thu hồi kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, đã được tạo ra như vậy từ môi trường nuôi cấy hoặc từ các tế bào đã được nuôi cấy.

Các tế bào đã biến nạp theo sáng chế được dùng trong các phương pháp để điều chế các polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Các phương pháp điều chế polypeptit theo sáng chế ở dạng tái tổ hợp, đặc trưng ở chỗ, các phương pháp này sử dụng vật truyền và/hoặc tế bào được biến nạp bởi vật truyền theo sáng chế, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Tốt hơn là, tế bào được biến nạp bởi vật truyền theo sáng chế được nuôi cấy dưới các điều kiện cho phép sự biểu hiện của các polypeptit nêu trên và thu hồi peptit tái tổ hợp nêu trên.

Như nêu ở trên, tế bào chủ có thể được chọn trong số các hệ nhân rải rác hoặc nhân điển hình. Cụ thể là, có thể nhận diện các trình tự nucleotit theo sáng chế tạo điều kiện thuận lợi cho sự tiết trong một hệ nhân rải rác hoặc nhân điển hình như vậy. Vật truyền theo sáng chế mang một trình tự như vậy có thể được sử dụng theo cách có lợi để sản xuất các protein tái tổ hợp cần được tiết. Quả thực, việc tinh chế các protein tái tổ hợp được quan tâm này sẽ được tạo thuận lợi nhờ việc chúng có mặt trong dịch nổi bên trên của môi trường nuôi cấy tế bào thay vì nằm bên trong các tế bào chủ.

Các polypeptit theo sáng chế cũng có thể được điều chế bằng cách tổng hợp hóa học. Một phương pháp điều chế như vậy cũng là một mục đích của sáng chế. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết các phương pháp để tổng hợp hóa học, như các kỹ thuật pha rắn [Steward et al, 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed. (1984)] hoặc các kỹ thuật pha rắn một phần, bằng cách trung ngưng các đoạn hoặc bằng phương pháp tổng hợp thông thường trong dung dịch. Các polypeptit được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học và có khả năng chứa các axit amin không có trong tự nhiên tương ứng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, có thể được tạo ra bằng quy trình theo sáng chế cũng được bao gồm trong sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập tới kháng thể theo sáng chế để dùng làm thuốc.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa hoạt chất là hợp chất bao gồm kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó theo sáng chế, tốt hơn là được trộn với tá dược và/hoặc chất dẫn thuốc được dụng.

Phương án bổ sung khác theo sáng chế bao gồm chế phẩm như được mô tả trên đây còn chứa sản phẩm phối hợp để dùng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt là kháng thể kháng khối u.

Tốt nhất là, kháng thể kháng khối u thứ hai có thể được chọn từ các kháng thể kháng IGF-IR, kháng EGFR, kháng HER2/neu, kháng VEGFR, kháng VEGF, v.v., hoặc các kháng thể kháng khối u khác bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Rõ ràng là kháng thể thứ hai, dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của các kháng thể nêu trên cũng là một phần của sáng chế.

Để làm kháng thể được ưu tiên nhất, các kháng thể kháng EGFR được chọn ví dụ như kháng thể C225 (Erbix).

Thuật ngữ “sử dụng đồng thời” được dùng để chỉ việc dùng hai hợp chất của chế phẩm theo sáng chế ở dạng một dược phẩm và dược phẩm giống nhau.

Thuật ngữ “sử dụng riêng rẽ” được dùng để chỉ việc cho dùng đồng thời hai hợp chất của chế phẩm theo sáng chế dưới các dạng dược phẩm riêng biệt.

Thuật ngữ “sử dụng lần lượt” được dùng để chỉ việc dùng liên tiếp hai hợp chất của chế phẩm theo sáng chế, mỗi hợp chất dưới các dạng dược phẩm riêng biệt.

Theo cách chung, chế phẩm theo sáng chế làm tăng một cách đáng kể hiệu quả điều trị ung thư. Nói cách khác, tác dụng điều trị của kháng thể kháng c-Met theo sáng chế có hiệu lực theo cách bất ngờ bằng cách dùng tác nhân gây độc tế bào. Ưu điểm chính tiếp theo khác được tạo ra bởi chế phẩm theo sáng chế liên quan đến khả năng sử dụng liều hoạt chất thấp hơn có hiệu quả, cho phép tránh được hoặc giảm được các rủi ro về sự xuất hiện các tác dụng phụ, cụ thể các tác dụng của tác nhân gây độc tế bào.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế sẽ cho phép đạt được tác dụng điều trị mong đợi nhanh hơn.

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được đặc tả ở chỗ nó còn bao gồm sản phẩm phối hợp để dùng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt, là tác nhân gây độc tế bào/kìm hãm tế bào.

Thuật ngữ "tác nhân điều trị kháng ung thư" hoặc "tác nhân gây độc tế bào/kìm hãm tế bào" được dùng để chỉ chất khi được cho đối tượng sử dụng, có tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa sự phát triển ung thư trong cơ thể của đối tượng. Để làm ví dụ minh họa về các tác nhân như vậy, có thể kể đến các tác nhân alkyl hóa, các chất kháng chuyển hoá, chất kháng sinh kháng khối u, chất ức chế giảm phân, chất ức chế chức năng của chất nhuộm sắc, tác nhân chống tạo mạch, kháng estrogen, kháng androgen hoặc các chất điều biến miễn dịch.

Các tác nhân như vậy, ví dụ, đã liệt kê trong ấn phẩm 2001 của VIDAL, ở trang liệt kê tới các hợp chất liên quan tới ung thư học và huyết học dưới tiêu đề "độc tế bào"; các hợp chất gây độc tế bào được liệt kê bằng cách viện dẫn tới tài liệu này được trích dẫn ở đây dưới dạng các chất gây độc tế bào được ưu tiên.

Cụ thể hơn là, các tác nhân dưới đây là được ưu tiên theo sáng chế.

Thuật ngữ "tác nhân alkyl hoá" dùng để chỉ chất bất kỳ có thể liên kết đồng hóa trị cùng với hoặc có thể alkyl hóa phân tử bất kỳ, tốt hơn là một axit nucleic (ví dụ như, ADN), nằm trong tế bào. Ví dụ về các tác nhân alkyl hoá như vậy bao gồm các mù tạc nitơ như mechlorethamin, chlorambucil, melphalan, chlorhydrate, pipobroman, prednimustin, đinatri phosphat hoặc estramustin; các oxazaphosphorin như xyclophosphamit, altretamin, trofosfamide, sulfofosfamide hoặc ifosfamide; các aziridin hoặc các etylen-imin như thiotepa, trietylenamin hoặc altetramin; các nitrosoure như carmustin, streptozocin, fotemustin hoặc lomustin; alkyl sulfonat như busulfan, treosulfan hoặc improsulfan; các triazen như đacarbazin; hoặc các phức chất platin như cisplatin, oxaliplatin hoặc carboplatin.

Thuật ngữ "chất kháng chuyển hóa" dùng để chỉ chất mà nó phong bế sự phát triển và/hoặc sự chuyển hóa bởi việc gây cản trở các hoạt tính nhất định, nói chung là sự tổng hợp ADN. Ví dụ về các chất kháng chuyển hoá bao gồm methotrexat, 5-florouraxil, floxuridin, 5-flodeoxyuridin, capecitabin, cytarabin, fludarabin, xytosin arabinosit, 6-mercaptopurin (6-MP), 6-thioguanin (6-TG),

clorodesoxyadenosin, 5-azaxytidin, gemxitabin, cladribin, deoxycoformyxin và pentostatin.

Thuật ngữ "kháng sinh kháng u" dùng để chỉ hợp chất mà nó có thể ngăn ngừa hoặc ức chế sự tổng hợp ADN, ARN và/hoặc các protein. Ví dụ về các kháng sinh kháng u như vậy bao gồm doxorubixin, daunorubixin, idarubixin valrubixin, mitoxantron, dactinomycin, mithramycin, plicamycin, mitomycin C, bleomycin và procarbazine.

Thuật ngữ "chất ức chế giảm phân" để chỉ việc ngăn ngừa sự tiến triển bình thường của chu trình tế bào và sự giảm phân. Nhìn chung, các tác nhân ức chế vi quản hoặc "taxoid" như paclitaxel và docetaxel có khả năng ức chế sự giảm phân. Các vinca alkaloid, như vinblastin, vincristin, vindesin và vinorelbin, cũng có khả năng ức chế sự giảm phân.

Thuật ngữ "chất ức chế chất nhuộm sắc" hoặc "chất ức chế topoisomeraza" là các chất mà chúng ức chế việc tạo chức năng bình thường của các protein tạo hình cho chất nhuộm sắc, như topoisomeraza I và II. Ví dụ về các chất ức chế như vậy bao gồm, đối với topoisomeraza I là camptothecin và các dẫn xuất của nó, như irinotecan hoặc topotecan; đối với topoisomeraza II là etoposid, etoposid phosphat và teniposid.

Thuật ngữ "chất chống hình thành mạch" để chỉ thuốc, hợp chất, chất hoặc tác nhân bất kỳ mà nó ức chế sự phát triển của mạch máu. Ví dụ về các chất chống hình thành mạch bao gồm, nhưng không nhằm giới hạn, razoxin, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS- 27023A, halofuginone, COL-3, neovastat, BMS-275291, thalidomide, CDC 501, DMXAA, L-651582, squalamine, endostatine, SU5416, SU6668, interferon-alpha, EMD 121974, interleukin-12, IM862, angiostatin và vitaxin.

Thuật ngữ "tác nhân kháng estrogen" hoặc "chất đối kháng estrogen" dùng để chỉ chất bất kỳ mà nó làm giảm, đối kháng hoặc ức chế tác động estrogen. Ví dụ về các tác nhân như vậy gồm tamoxifen, toremifen, raloxifen, droloxifen, iodoxifen, anastrozol, letrozol và exemestan.

Thuật ngữ "tác nhân kháng androgen" hoặc "chất đối kháng androgen" dùng để chỉ mà nó làm giảm, đối kháng hoặc ức chế tác động androgen. Ví dụ về các tác nhân kháng androgen bao gồm flutamid, nilutamit, bicalutamit, spiriono

lacton, xyproteron axetat, finasterit và ximitidin.

Thuật ngữ "chất điều biến miễn dịch" chỉ các chất mà chúng kích thích hệ miễn dịch.

Ví dụ về các chất điều biến miễn dịch bao gồm interferon, các interleukin như aldesleukin, OCT-43, denileukin diftitox hoặc interleukine-2, các yếu tố hoại tử khối u như tasonermin, hoặc các dạng khác của các chất điều biến miễn dịch như lentinan, sizofiran, roquinimex, pidotimod, pegademase, thymopentine, poly I:C hoặc levamisol cùng với 5-fluorouraxil.

Nhằm chi tiết hơn, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể nhắc tới ấn phẩm được công bố bởi "Association Francaise des Enseignants de Chimie Therapeutique" với tiêu đề: "Traite de chimie therapeutique", vol. 6, Medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003.

Cũng có thể được kể đến là các tác nhân hóa học hoặc các tác nhân gây độc tế bào, tất cả các chất ức chế kinaza như, ví dụ, gefitinib hoặc erlotinib.

Theo một phương án được ưu tiên cụ thể, hỗn hợp theo sáng chế dưới dạng sản phẩm kết hợp, đặc trưng ở chỗ, tác nhân gây độc tế bào được gắn kết hóa học với kháng thể để sử dụng một cách đồng thời.

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc liên hợp giữa tác nhân gây độc tế bào và kháng thể theo sáng chế, đặc biệt là có thể đưa vào các phân tử chêm giữa hai hợp chất cần được liên hợp, như poly(alkylen) glycol như polyetylen glycol, hoặc axit amin, hoặc theo phương án khác, sử dụng các dẫn xuất có hoạt tính của tác nhân gây độc tế bào đã được đưa vào các chức năng có khả năng phản ứng với kháng thể theo sáng chế. Các kỹ thuật liên hợp này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và sẽ không được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập tới chế phẩm được đặc tả ở chỗ ít nhất một trong số các kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của chúng, được tiếp hợp với độc tố tế bào và/hoặc nguyên tố phóng xạ.

Tốt hơn, nếu độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ này có khả năng ức chế ít nhất một hoạt tính tế bào của các tế bào biểu hiện c-Met, theo cách được ưu tiên hơn có khả năng ngăn ngừa sự phát triển hoặc tăng sinh của tế bào này, đặc biệt là làm bất hoạt hoàn toàn của tế bào này.

Tốt hơn, nếu độc tố này còn là độc tố vi khuẩn đường ruột, đặc biệt là *Pseudomonas exotoxin A*.

Tốt hơn, nếu các nguyên tố phóng xạ (hoặc đồng vị phóng xạ) được tiếp hợp với các kháng thể được sử dụng để điều trị là các đồng vị phóng xạ phát ra tia gamma và tốt hơn là iot¹³¹, ytri⁹⁰, vàng¹⁹⁹, paladi¹⁰⁰, đồng⁶⁷, bismut²¹⁷ và antimon²¹¹. Các đồng vị phóng xạ phát ra các tia beta và alpha có thể cũng được sử dụng để điều trị.

Thuật ngữ “độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ được tiếp hợp với ít nhất một kháng thể, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó”, theo sáng chế, được dự định để chỉ phương pháp bất kỳ cho phép độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ này gắn kết với ít nhất một kháng thể nêu trên, đặc biệt là bằng cách liên hợp cộng hóa trị giữa hai hợp chất, có hoặc không bổ sung phân tử liên kết.

Trong số các tác nhân cho phép liên kết theo cách hoá học (cộng hóa trị), tĩnh điện hoặc không cộng hóa trị của tất cả hoặc một phần trong số các hợp phân của thể tiếp hợp, cụ thể có thể kể đến benzoquinon, carbodiimide và cụ thể hơn EDC (1-ethyl-3-[3-dimethyl-aminopropyl]-carbodiimide hydrochlorua), dimaleimide, axit dithiobis-nitro benzoic (DTNB), N-succinimidyl S-axetyl thio-axetat (SATA), các tác nhân liên kết cầu có một hoặc nhiều nhóm phenylazit phản ứng với tia cực tím (U.V.) và tốt hơn là N-[4-(azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide (APDP), N-succinimid-yl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), 6-hydrazino-nicotinamide (HYNIC).

Dạng liên hợp khác, đặc biệt là đối với các nguyên tố phóng xạ, có thể bao gồm việc sử dụng chất chelat dạng ion có hai nhóm chức.

Trong số các chất chelat này, có thể kể đến các chelat thu được từ EDTA (axit etylenđiamintetraaxetic) hoặc từ DTPA (axit dietylenetriaminpentaaxetic) được phát triển để liên kết kim loại, đặc biệt là kim loại phóng xạ, và globulin miễn dịch. Do vậy, DTPA và các dẫn xuất của nó có thể được thể bằng cách các nhóm khác nhau trên mạch cacbon để làm tăng độ ổn định và độ bền của phức chất phối tử-kim loại (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); US patent 4,831,175).

Ví dụ, axit dietylenetriaminpentaaxetic (DTPA) và các dẫn xuất của nó, được sử dụng một cách rộng rãi trong y học và trong sinh học trong thời gian dài

dưới dạng tự do của chúng, hoặc dưới dạng phức hợp với ion kim loại, có đặc tính đáng chú ý làm tạo ra các chelat ổn định với ion kim loại và được liên hợp với các protein mong muốn dùng để điều trị hoặc chẩn đoán như các kháng thể để phát triển thể tiếp hợp miễn dịch phóng xạ trong điều trị ung thư (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).

Cũng tốt hơn, nếu ít nhất một kháng thể tạo ra thể tiếp hợp theo sáng chế được chọn từ các đoạn chức năng của nó, đặc biệt là các đoạn bị cắt ra khỏi hợp phần Fc của chúng như các đoạn scFv.

Như đã nêu, theo phương án ưu tiên của sáng chế, tác nhân gây độc tế bào/kìm hãm tế bào nêu trên hoặc độc tố tế bào và/hoặc nguyên tố phóng xạ được liên hợp hoá học với ít nhất một trong số các nguyên tố của chế phẩm này để dùng đồng thời.

Sáng chế bao gồm chế phẩm nêu trên để dùng làm thuốc.

Ngoài ra, sáng chế mô tả việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế để bào chế thuốc.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của nó, và/hoặc chế phẩm như được mô tả trên đây để bào chế thuốc dùng để ức chế quá trình phát triển và/hoặc quá trình tăng sinh của các tế bào khối u.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của nó và/hoặc chế phẩm được mô tả trên đây hoặc sử dụng nêu trên để bào chế thuốc dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế quá trình phát triển và/hoặc quá trình tăng sinh của các tế bào khối u ở người bệnh bao gồm bước cho người bệnh cần điều trị dùng kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của nó theo sáng chế, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị ung thư ở người bệnh cần điều trị, bao gồm bước cho người bệnh dùng kháng thể, hoặc một trong số các dẫn xuất hoặc đoạn chức năng của nó theo sáng chế, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai theo sáng chế hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Theo khía cạnh được đặc biệt ưu tiên, ung thư là ung thư được chọn từ ung thư tuyến tiền liệt, bệnh sacôm xương, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư màng trong tử cung, u nguyên bào xộp hoặc ung thư ruột kết.

Như được giải thích trên đây, sáng chế có ưu điểm là cho phép điều trị bệnh ung thư liên quan đến sự hoạt hoá Met phụ thuộc và không phụ thuộc vào HGF.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bao gồm phương pháp chẩn đoán *in vitro* các bệnh do sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới mức bình thường thụ thể c-Met bằng cách sử dụng mẫu sinh học bị nghi ngờ có sự có mặt không bình thường của thụ thể c-Met, phương pháp này được đặc tả ở chỗ nó bao gồm bước, trong đó mẫu sinh học được tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế, kháng thể này có thể được đánh dấu, nếu cần.

Tốt hơn, nếu các bệnh liên quan đến sự có mặt không bình thường của thụ thể c-Met trong phương pháp chẩn đoán này sẽ là ung thư.

Kháng thể nêu trên, hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó, có thể có mặt dưới dạng thể tiếp hợp miễn dịch hoặc kháng thể được đánh dấu để thu được tín hiệu có thể phát hiện và/hoặc có thể xác định.

Các kháng thể được đánh dấu theo sáng chế hoặc đoạn chức năng của chúng bao gồm, ví dụ, các kháng thể được gọi là thể tiếp hợp miễn dịch có thể được tiếp hợp, ví dụ, với enzym như peroxidaza, kiềm phosphataza, beta-D-galactosidaza, glucoza oxydaza, glucoza amylaza, cacbonic anhydrazaza, axetylcholinsteraza, lysozym, malat dehydroaza hoặc glucoza 6-phosphat dehydroaza hoặc với phân tử như biotin, digoxin hoặc 5-bromdeoxyuridin. Nhãn huỳnh quang có thể cũng được tiếp hợp với các kháng thể hoặc đoạn chức năng của chúng theo sáng chế và đặc biệt là bao gồm fluorescein và các dẫn xuất của nó, flocrom, rhodamin và các dẫn xuất của nó, GFP (GFP là Protein phát huỳnh quang xanh lá cây "Green Fluorescent Protein"), dansyl, umbelliferon v.v.. Trong các thể tiếp hợp như vậy, các kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn chức năng của chúng có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng có thể được liên hợp với enzym hoặc nhãn huỳnh quang một cách trực tiếp hoặc qua trung gian là nhóm đệm hoặc nhóm liên kết như polyaldehyt, như glutaraldehyt, axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), axit dietylen-triaminpentaaxetic (DPTA), hoặc với sự có mặt của chất liên hợp như các

chất đã được đề cập trên đây đối với thể tiếp hợp điều trị. Thể tiếp hợp chứa nhân phát huỳnh quang có thể được điều chế bằng phản ứng với isothioxyanat.

Các thể tiếp hợp khác có thể cũng bao gồm các nhân phát quang hoá học như luminol và dioctetan, nhân phát quang sinh học như luxiferaza và luxiferin, hoặc nhân phóng xạ như iot^{123} , iot^{125} , iot^{126} , iot^{133} , brom^{77} , tecneti^{99m} , indi^{111} , indi^{113m} , gali^{67} , gali^{68} , ruteni^{95} , ruteni^{97} , ruteni^{103} , ruteni^{105} , thủy ngân^{107} , thủy ngân^{203} , reni^{99m} , reni^{101} , reni^{105} , scandi^{47} , telu^{121m} , telu^{122m} , telu^{125m} , thulium^{165} , thulium^{167} , thulium^{168} , flo^{18} , ytri^{199} , iot^{131} . Phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này hiện có để liên hợp đồng vị phóng xạ điều trị với các kháng thể một cách trực tiếp hoặc thông qua tác nhân càng hóa như EDTA, DTPA đã được đề cập trên đây có thể được sử dụng đối với các nguyên tố phóng xạ có thể được sử dụng trong chẩn đoán. Cũng có thể kể đến việc đánh dấu bằng $\text{Na}[\text{I}^{125}]$ theo phương pháp cloramin T [Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) *Nature* 194:495] hoặc bằng tecneti^{99m} theo phương pháp của Crockford các đồng tác giả (US patent 4,424,200) hoặc được gắn vào qua DTPA như được Hnatowich (US patent 4,479,930) mô tả.

Do vậy, kháng thể, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế có thể được sử dụng trong quy trình phát hiện và/hoặc xác định sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới mức bình thường, tốt hơn là biểu hiện quá mức của thụ thể c-Met trong mẫu sinh học, được đặc tả ở chỗ quy trình này bao gồm các bước sau:

a) cho tiếp xúc mẫu sinh học với kháng thể, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế; và

b) để cho phức chất c-Met/kháng thể có thể được tạo thành.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế, có thể được sử dụng trong quy trình phát hiện và/hoặc xác định thụ thể c-Met trong mẫu sinh học, để theo dõi hiệu quả của việc điều trị phòng và/hoặc chữa bệnh ung thư phụ thuộc c-Met.

Một cách tổng quát hơn, kháng thể hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế có thể được sử dụng trong tình huống bất kỳ, trong đó sự biểu hiện của thụ thể c-Met phải được quan sát thấy theo cách định tính và/hoặc định lượng.

Tốt hơn, nếu mẫu sinh học được tạo ra bởi chất lỏng sinh học, như huyết thanh, máu tổng, các tế bào, mô mẫu hoặc mẫu sinh thiết có nguồn gốc từ người.

Phương pháp bất kỳ hoặc thử nghiệm thông thường có thể được sử dụng để tiến hành việc phát hiện và/hoặc liều lượng như vậy. Thử nghiệm này có thể là thử nghiệm cạnh tranh hoặc thử nghiệm sandwich, hoặc thử nghiệm bất kỳ đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này phụ thuộc vào sự tạo thành phức hợp miễn dịch của loại kháng thể-kháng nguyên. Sau khi ứng dụng theo sáng chế, kháng thể hoặc một trong số các đoạn chức năng của nó có thể được cố định hoặc được đánh dấu. Việc cố định này có thể được tiến hành trên nhiều chất mang đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đặc biệt là, các chất mang này có thể bao gồm kính, polystyren, poly-propylen, polyetylen, dextran, nylon, hoặc các tế bào tự nhiên hoặc được cải biến. Các chất mang này có thể là tan hoặc không tan.

Để làm ví dụ, phương pháp được ưu tiên trong các quy trình enzyme miễn dịch theo kỹ thuật ELISA, là kỹ thuật huỳnh quang miễn dịch, hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc kỹ thuật tương đương.

Do vậy, sáng chế cũng bao gồm kit hoặc bộ dụng cụ cần thiết để tiến hành phương pháp chẩn đoán các bệnh do sự biểu hiện quá mức hoặc biểu hiện dưới mức bình thường của thụ thể c-Met hoặc để tiến hành quy trình phát hiện và/hoặc xác định sự biểu hiện quá mức hoặc sự biểu hiện dưới mức bình thường của thụ thể c-Met trong mẫu sinh học, tốt hơn là sự biểu hiện quá mức của thụ thể này, khác biệt ở chỗ kit hoặc bộ dụng cụ này bao gồm các thành phần sau:

- a) kháng thể, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, theo sáng chế;
- b) tùy ý, chất phản ứng để tạo ra môi trường thuận lợi cho phản ứng miễn dịch;
- c) tùy ý, chất phản ứng cho phép biểu hiện phức hợp c-Met/kháng thể được tạo ra bởi phản ứng miễn dịch.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể hoặc chế phẩm theo sáng chế để bào chế thuốc được dự định để hướng đích đặc hiệu hoạt chất sinh học tới các tế bào biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức thụ thể c-Met.

Thuật ngữ “hoạt chất sinh học” được dự định dùng để chỉ hợp chất bất kỳ có khả năng điều biến, đặc biệt là ức chế, hoạt tính tế bào, cụ thể quá trình phát triển của chúng, quá trình tăng sinh của chúng, quá trình phiên mã hoặc dịch mã gen.

Mục đích của của sáng chế cũng nhằm đề xuất chất phản ứng chẩn đoán *in vivo* bao gồm kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn chức năng hoặc dẫn xuất của nó, tốt hơn là được đánh dấu, đặc biệt là được đánh dấu phóng xạ, và sử dụng nó trong chuẩn đoán hình ảnh, cụ thể để phát hiện ung thư liên quan đến sự biểu hiện hoặc sự biểu hiện quá mức bởi tế bào của thụ thể c-Met.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm dưới dạng sản phẩm phối hợp hoặc tới thể tiếp hợp kháng c-Met/độc tố hoặc nguyên tố phóng xạ, theo sáng chế, được dùng làm thuốc.

Tốt hơn, nếu chế phẩm này dưới dạng sản phẩm phối hợp hoặc thể tiếp hợp theo sáng chế sẽ được trộn với tá dược và/hoặc chất dẫn thuốc được dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất dẫn thuốc được dụng” được dự định để chỉ hợp chất hoặc hỗn hợp chứa các hợp chất khi đưa vào được phẩm không gây ra các phản ứng thứ cấp và cho phép, ví dụ, tạo điều kiện thuận lợi cho việc dùng hoạt chất, sự tăng thời gian tồn tại của nó và/hoặc hiệu quả của nó trong cơ thể, sự tăng độ tan của nó trong dung dịch hoặc cải thiện mức độ bảo toàn của nó. Các chất dẫn thuốc được dụng này là đã biết và sẽ được điều chỉnh bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này theo bản chất và kiểu dùng hoạt chất được chọn.

Tốt hơn, nếu các hợp chất này sẽ được cấp theo đường toàn thân, cụ thể theo đường tĩnh mạch, trong cơ, trong da, trong màng bụng hoặc dưới da, hoặc dùng qua đường miệng. Theo cách được ưu tiên hơn, chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế sẽ được cho dùng vài lần, theo cách tuần tự.

Kiểu dùng, liều lượng và dạng được phẩm tối ưu của chúng có thể được xác định theo các tiêu chuẩn nói chung có tính đến trong khi tiến hành điều trị được làm thích ứng với người bệnh, ví dụ như độ tuổi hoặc thể trọng của người bệnh, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý chung của người bệnh, sự dung nạp trong điều trị và các tác dụng phụ cần chú ý.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo kháng thể kháng c-Met

Để tạo ra các kháng thể kháng c-Met, chuột nhắt BALB/c 8 tuần tuổi được gây miễn dịch được tiêm dưới da từ 3 đến 5 lần dòng tế bào được chuyển nhiễm

CHO biểu hiện c-Met trên màng sinh chất của nó (20×10^6 tế bào/liều/con) hoặc từ 2 đến 3 lần protein dung hợp miễn ngoại bào c-Met ($10-15 \mu\text{g}/\text{liều}/\text{con}$) (R&D Systems, Catalog # 358MT) hoặc các phân đoạn của protein tái tổ hợp này được trộn với thuốc phù trợ Freund đầy đủ để gây miễn dịch lần thứ nhất và thuốc phù trợ Freund không đầy đủ cho các con chuột sau. Các quy trình phối hợp trong đó chuột nhất được nhận cả các tế bào CHO-cMet và các protein tái tổ hợp cũng được tiến hành. Ba ngày trước khi dung hợp tế bào, chuột nhất được tiêm trong màng bụng hoặc i.v. protein tái tổ hợp hoặc các phân đoạn của chúng. Sau đó, các lá lách của chuột được thu gom và được dung hợp với các tế bào u tuỷ SP2/0-Ag14 (ATCC) và được tiến hành chọn lọc HAT. 4 lần dung hợp được tiến hành. Nói chung, để điều chế các kháng thể đơn dòng hoặc đoạn chức năng của chúng, đặc biệt là có nguồn gốc từ chuột, có thể sử dụng kỹ thuật được mô tả cụ thể trong ấn phẩm "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) hoặc kỹ thuật điều chế tế bào lai được Kohler và Milstein mô tả (Nature, 256:495-497, 1975).

Các tế bào lai thu được ban đầu được sàng lọc bằng ELISA trên protein tái tổ hợp c-Met và sau đó bằng Phân tích FACS trên các dòng tế bào tủy A549 NSCLC, BxPC3, và u nguyên bào xẹp U87-MG (các protein đại diện được thể hiện trên Fig.1) để đảm bảo rằng các kháng thể được tạo ra sẽ cũng có khả năng nhận biết thụ thể tự nhiên trên các tế bào khối u. Các thiết bị phản ứng dương trên 2 thử nghiệm này được khuếch đại, được tạo dòng vô tính và tập hợp các tế bào lai được thu hồi, được tinh chế và được sàng lọc về khả năng của nó trong việc ức chế *in vitro* quá trình tăng sinh của tế bào trong mô hình BxPC3.

Nhằm mục đích đó, 50 000 tế bào BxPC3 được cho vào trong các đĩa có 96 lỗ trong môi trường RPMI, 2 mM L. Glutamin, không có SVF. 24 giờ sau khi cho vào đĩa, các kháng thể cần được thử nghiệm được bổ sung ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 0,0097 tới $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 60 phút trước bổ sung $100 \text{ ng}/\text{ml}$ hHGF. Sau 3 ngày, các tế bào được tạo xung với $0,5 \mu\text{Ci}$ [^3H]thymidin trong thời gian 16 giờ. [^3H]thymidin được đưa vào ADN không tan trong axit tricloaxetic được định lượng bằng cách đếm nhấp nháy chất lỏng. Các kết quả được thể hiện dưới dạng dữ liệu chưa xử lý để đánh giá một cách thực sự tác dụng chủ vận nội tại của mỗi Mab.

Sau đó, các kháng thể ức chế quá trình tăng sinh của tế bào ít nhất là 50% được đánh giá dưới dạng dịch nổi bề mặt bằng phân tích BRET trên các tế bào được chuyển nhiễm c-Met. Nhằm mục đích đó, các dòng tế bào ổn định CHO biểu hiện C-Met-Rluc hoặc C-Met-Rluc và C-Met-K1100A-YFP để đime hóa c-Met hoặc C-Met-Rluc và dạng đột biến của Gab1 [Maroun et al., Mol. Cell. Biol., 1999, 19:1784-1799] đã dung hợp với YFP để hoạt hóa c-Met được tạo ra. Các tế bào được phân bố trong các vi đĩa có 96 lỗ trắng trong môi trường nuôi cấy DMEM-F12/FBS 5% một hoặc hai ngày trước khi tiến hành các thử nghiệm BRET. Các tế bào trước tiên được nuôi cấy ở 37°C với 5% CO₂ để cho phép sự gắn kết tế bào vào đĩa. Sau đó, các tế bào được bỏ đối với 200µl DMEM/lỗ qua đêm. Ngay trước khi thử nghiệm, DMEM được loại bỏ và các tế bào được rửa qua bằng PBS. Các tế bào được ủ trong PBS với sự có mặt hoặc không có mặt của các kháng thể cần được thử nghiệm hoặc các hợp chất tham chiếu, 10 phút ở 37°C trước khi bổ sung coelenterazin có hoặc không có HGF với thể tích cuối bằng 50µl. Sau khi ủ thêm 10 phút ở nhiệt độ 37°C, sự thu nhận phát sáng ở 485 nm và 530 nm được bắt đầu bằng cách sử dụng phát quang kế Mithras (Berthold) (1giây/bước sóng/lỗ được lặp lại 15 lần).

Tỷ lệ BRET được xác định trước đó [Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689] là: [(mức độ phát sáng ở 530 nm)-(mức độ phát sáng ở 485 nm) X Cf]/(mức độ phát sáng ở 485 nm), trong đó Cf tương ứng với (mức độ phát sáng ở 530 nm) / (mức độ phát sáng ở 485 nm) đối với các tế bào biểu hiện protein dung hợp Rluc một mình trong cùng một điều kiện thử nghiệm. Rút gọn phương trình này thấy rằng tỷ lệ BRET tương ứng với tỷ lệ 530/485 nm thu được khi hai thành phần có mặt, được hiệu chỉnh bằng tỷ lệ 530/485 nm thu được trong cùng một điều kiện thử nghiệm, chỉ khi thành phần này được dung hợp với R. reniformis luxiferaza có mặt trong thử nghiệm. Để có thể đọc được, các kết quả được biểu hiện bằng đơn vị miliBRET (mBU); mBU tương ứng với tỷ lệ BRET được nhân với 1000.

Sau thử nghiệm *in vitro* thứ hai này, kháng thể 224G11 i) không có hoạt tính nội tại như là phân tử nguyên vẹn trong thử nghiệm chức năng tăng sinh, ii) ức chế một cách đáng kể quá trình tăng sinh BxPC3 và iii) ức chế quá trình đime hóa c-Met (Fig.3) được chọn. Trong các thử nghiệm, Mab 5D5, do Genentech tạo

ra, và có ở ATCC, được bổ sung làm kháng thể đối chứng đối với hoạt tính chủ vận nội tại.

Ví dụ 2: Quy trình làm giống như ở người Mab 224G11 ở chuột nhất bằng cách ghép CDR

1) Làm giống như ở người vùng thay đổi của chuỗi nhẹ (VL)

Trong bước đầu tiên, trình tự nucleotit chuỗi của 224G11 VL được so sánh với trình tự gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT (<http://imgt.cines.fr>). Các gen dòng tế bào mầm IGKV3-5*01 và IGKJ4*01 chuột thể hiện độ tương đồng trình tự lần lượt là 99,31% đối với vùng V và 94,28% đối với vùng J, được nhận diện. Liên quan tới tính tương đồng cao, trình tự nucleotit 224G11VL đã được sử dụng trực tiếp để xác định tính tương đồng với người, thay cho các mầm gen chuột nhất tương ứng.

Trong bước thứ hai, gen mầm ở người trình bày tính tương đồng cao nhất với 224G11VL đã được nghiên cứu để nhận diện đối tượng người tốt nhất để ghép CDR. Nhằm tối ưu hóa việc lựa chọn, sự sắp thẳng hàng giữa các trình tự axit amin đã được tiến hành. Gen mầm IGKV4-1*01 ở người tạo ra độ tương đồng trình tự là 67,30%, nhưng thể hiện độ dài khác nhau đối với CDR1 (10 axit amin trong 224G11 VL và 12 axit amin trong IGKV4-1*01). Đối với vùng J, gen mầm IGKJ4*02 ở người (độ tương đồng trình tự là 77,14%) là được chọn.

Trong bước tiếp theo, các vùng CDR của 224G11 VL ở chuột được ghép vào các trình tự khung ở người được chọn. Mỗi vị trí axit amin được phân tích cho một vài tiêu chí như sự tham gia vào trong bề mặt chung VH/VL, trong gắn kết kháng nguyên hoặc trong cấu trúc CDR, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của vùng thay đổi, các móc neo CDR, các gốc thuộc vùng Vernier. Ba phiên bản được làm giống như ở người, tương ứng với SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9 và SEQ ID No. 10 được xây dựng, và lần lượt chứa bốn gốc ở chuột (4, 39, 40, 84), hai (39, 40) hoặc một (40) trong các vùng FR của chúng và các CDR tương ứng 224G11 VL ở chuột nhất.

2) Làm giống như ở người vùng thay đổi của chuỗi nặng (VH)

Trong bước đầu tiên, trình tự nucleotit của 224G11 VH được so sánh với trình tự gen dòng tế bào mầm chuột của dữ liệu IMGT

(<http://imgt.cines.fr>).

Các gen mầm IGHV1-18*01, IGHD2-4*01 và IGHJ2*01 ở chuột lần lượt có độ tương đồng trình tự là 92,70% đối với vùng V, 75,00% đối với vùng và 89,36% đối với vùng J, được nhận diện. Liên quan tới tính tương đồng cao, để quyết định việc sử dụng trực tiếp các trình tự nucleotit 224G11VH để xác định tính tương đồng với người, thay cho các mầm gen chuột nhất tương ứng.

Trong bước thứ hai, gen mầm ở người trình bày tính tương đồng cao nhất với 224G11 VH đã được nghiên cứu để nhận diện đối tượng người tốt nhất để ghép CDR. Nhằm mục đích này, trình tự nucleotit của 224G11 VH đã được sắp thẳng hàng cùng với các trình tự của gen mầm ở người có trong dữ liệu IMGT. Trình tự IGHV1-2*02 V ở người có độ tương đồng trình tự là 75,00% ở cấp độ nucleotit và 64,30% ở cấp độ axit amin. Khi xem xét đối với các độ tương đồng đối với vùng J đã nhận diện gen mầm IGHJ4*04 ở người có độ tương đồng trình tự là 78,72%.

Trong bước tiếp theo, các vùng CDR của 224G11 VH ở chuột nhất được ghép vào các trình tự khung ở người được chọn. Mỗi vị trí axit amin được phân tích cho một vài tiêu chí như sự tham gia vào trong bề mặt chung VH/VL, trong gắn kết kháng nguyên hoặc trong cấu trúc CDR, sự định vị của gốc trong cấu trúc 3D của vùng thay đổi, các móc neo CDR, các gốc thuộc vùng Vernier. Một dạng đã được làm giống như ở người đầy đủ, tương ứng với SEQ ID 4 được xây dựng; nó chứa các gốc chỉ có ở người trong các vùng FR của nó và các CDR tương ứng với 224G11 VH ở chuột nhất.

Ví dụ 3: xây dựng các đột biến vùng bản lề được cải thiện

Điều đã biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này là vùng bản lề góp phần chủ yếu về tính mềm dẻo của vùng thay đổi của globulin miễn dịch (xem ấn phẩm: Brekke et al., 1995; Roux et al., 1997). Trong quy trình tạo loại khảm của 224G11 Mab, vùng cố định ở chuột nhất IGHG1 được thay thế bằng phần IGHG1 tương đương có nguồn gốc từ người. Do trình tự axit amin của vùng bản lề rất phân hướng, nên sự “tạo rìa” cho vùng bản lề được thực hiện để duy trì độ dài và tính cứng của nó. Do vùng bản lề IGHG2 ở người cấu thành có tính đồng nhất gần nhất với vùng bản lề IGHG1 ở chuột nhất, nên trình tự này rất đáng được xem xét. Dãy gồm 7 trình tự bản lề khác nhau được xây dựng (các SEQ ID No. từ 22 tới 28)

bằng cách đưa các phần của các bản lề IGHG1 ở chuột nhắt và IGHG2 ở người vào các phần bản lề IGHG1 ở người.

Một dãy khác của các đột biến bản lề được thiết kế và được xây dựng (các SEQ ID No. từ 58 tới 72) để đánh giá sự ảnh hưởng của xystein bổ sung và vị trí của nó dọc theo vùng bản lề, đoạn khuyết có 1, 2, 3 hoặc 4 axit amin dọc theo vùng bản lề và tổ hợp của hai thông số này (bổ sung xystein và khuyết axit amin).

Ví dụ 4: Sản xuất Mab 224G11 được làm giống như ở người và các format Mab bản lề được làm giống như ở người

Tất cả các dạng Mab đã nêu trên hoặc là chứa các vùng bản lề loại khảm, được làm giống như ở người và/hoặc được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền được tạo ra sau khi chuyển nhiễm tạm thời và bằng cách sử dụng hệ HEK293/EBNA cùng với vật truyền biểu hiện pCEP4 (InVitrogen, US).

Các trình tự nucleotit toàn vẹn tương ứng các phiên bản được làm giống như ở người của vùng thay đổi của các chuỗi nhẹ (SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19 và SEQ ID No. 20) và các chuỗi nặng (SEQ ID No. 14) của Mab 224G11 được tổng hợp bởi kỹ thuật tổng hợp gen toàn cục (Genecust, Luxembourg). Chúng tạo dòng phụ vào vật truyền pCEP4 (InVitrogen, US) mang toàn bộ trình tự mã hóa của vùng cố định [CH1-Bản lề-CH2-CH3] của globulin miễn dịch IgG1 hoặc IgG2 ở người. Sự cải biến vùng bản lề được thực hiện bằng cách trao đổi đoạn giới hạn {*NheII-BclI*} bằng phần tương đương mang các cải biến được mong muốn, mỗi đoạn {*NheI-BclI*} tương ứng được tổng hợp bởi kỹ thuật tổng hợp gen toàn cục (Genecust, LU). Tất cả các bước tạo dòng vô tính được tiến hành theo các kỹ thuật sinh học phân tử thông thường như được mô tả trong ấn phẩm: Laboratory manual (Sambrook and Russel, 2001) hoặc theo các chỉ dẫn của nhà cung cấp. Mỗi cấu trúc gen được hợp thức đầy đủ bằng cách tạo trình tự nucleotit nhờ sử dụng bộ kit tạo trình tự chu kỳ đầu tiên Big Dye (Applied Biosystems, US) và được phân tích nhờ sử dụng thiết bị 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US).

Các tế bào HEK293 EBNA đã được làm thích ứng trong hỗn dịch (InVitrogen, US) được phát triển thông thường trong các bình cầu 250ml trong 50ml môi trường không huyết thanh Excell 293 (SAFC Biosciences) có bổ sung

6mM glutamin trong máy lắc kiểu hành tinh (tốc độ quay 110vòng/phút). Sự chuyển nhiễm tạm thời được thực hiện với 2.10^6 tế bào/ml sử dụng 25 kDa polyetylenimin mạch thẳng (PEI) (Polysciences) được điều chế trong nước với nồng độ cuối là 1mg/ml đã trộn và plasmit ADN (nồng độ cuối là $1,25\mu\text{g/ml}$ cho tỷ lệ plasmit giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là 1:1). 4 giờ sau khi chuyển nhiễm, dịch nuôi cấy được pha loãng bằng một phần thể tích của môi trường nuôi cấy mới để đạt được mật độ tế bào cuối là 10^6 tế bào/ml. Quy trình nuôi cấy được giám sát trên cơ sở khả năng sống của tế bào và sự sản xuất Mab. Thông thường, các dịch nuôi cấy được duy trì trong 4 đến 5 ngày. Các Mab được tinh chế bằng cách áp dụng phương pháp sắc ký thông thường trên nhựa Protein A (GE Healthcare, US).

Tất cả các dạng khác nhau của các Mab được sản xuất với các mức phù hợp với việc đánh giá chức năng. Các mức sản xuất thường là nằm trong khoảng từ 15 tới 30mg/l của Mab đã tinh chế.

Ví dụ 5: Đánh giá tình trạng phosphoryl hóa c-Met bằng thử nghiệm ELISA Phospho-c-Met-đặc hiệu

Thử nghiệm chức năng này cho phép kiểm tra sự điều biến tình trạng phosphoryl hóa c-Met bởi một mình các Mab hoặc với sự có mặt đồng thời của HGF.

Các tế bào A549 được gieo trong đĩa 12MW trong môi trường phát triển hoàn toàn [F12K + 10% FCS]. Các tế bào được bỏ đói trong 16 giờ trước khi kích thích bằng HGF [100ng/ml], và mỗi Mab để thử nghiệm được bổ sung với nồng độ cuối của nó là $30\mu\text{g/ml}$ 15 phút trước khi kích thích phối tử. Chất đệm phân giải làm lạnh bằng đá được bổ sung 15 phút sau khi bổ sung HGF để dừng phản ứng phosphoryl hóa. Các tế bào được tách ra bằng cơ học và các sản phẩm phân giải tế bào được thu gom bằng cách quay ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và cấu thành pha nổi trên bề mặt. Hàm lượng protein được định lượng bằng cách sử dụng bộ kit BCA (Pierce) và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Tình trạng phosphoryl hóa của c-Met được định lượng bằng ELISA. Mab kháng-c-Met ở dê (R&D, ref AF276) được sử dụng làm kháng thể bất giữ (phủ qua đêm ở 4°C) và sau bước làm bão hòa bằng chất đệm TBS-BSA 5% (1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT)), $25\mu\text{g}$ sản phẩm phân giải protein được bổ sung vào từng lỗ của đĩa

96MW đã được phủ. Sau 90 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, các đĩa được rửa bốn lần và kháng thể dò được bổ sung (Mab kháng-phospho-c-Met, hướng tới các gốc Tyr đã phosphoryl hóa ở vị trí 1230, 1234 và 1235). Sau khi 1 giờ ủ bổ sung và 4 lần rửa, kháng thể kháng thể đã ghép hợp với HRP (Biosource) được bổ sung trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và phép dò phát huỳnh quang được thực hiện bằng cách bổ sung Luminol. Các số đọc phát quang được thực hiện trên thiết bị đọc đĩa Mithras LB920 multimode plate reader (Berthold).

Mức phosphoryl hóa thụ thể c-Met cả cơ sở lẫn gây ra bởi gây ra bởi HGF [100 ng/ml] đều không bị ảnh hưởng bởi việc xử lý lý PBS, hay việc bổ sung các Mab ở người hoặc chuột không hướng đích thụ thể c-Met ở người (Fig.1). Mặt khác, Mab (m) 224G11 ở chuột nhất đã ức chế mạnh quá trình phosphoryl hóa c-Met gây ra bởi HGF [100ng/ml] (Fig.2B) mà không làm thay đổi bản thân quá trình phosphoryl thụ thể (Fig.2A). Điều ngạc nhiên là, dạng khảm của Mab 224G11 (224G11chim/IgG1), chỉ việc vùng thay đổi (VH+VL) từ m224G11 kết hợp với vùng cố định ở người IgG1/kappa tạo ra hoạt tính chủ vận mạnh (17% của tác dụng HGF tối đa, Fig.2A) đi kèm với hiệu quả đối kháng giảm (mức ức chế 54% của tác dụng tối đa HGF so với m224G11 tạo ra sự ức chế 75% của tác dụng tối đa HGF, Fig.2B). Ba dạng được làm giống như ở người của Mab 224G11, [224G11]Hz1/IgG1, [224G11]Hz2/IgG1 và [224G11]Hz3/IgG1, cũng được xây dựng trên khung xương IgG1/kappa ở người, cùng tạo ra hiệu quả đối kháng thấp và hoạt tính chủ vận đáng kể (từ 11 tới 24% giá trị HGF tối đa) so với 224G11 ở chuột nhất (Fig.2A và Fig.2B). Dãy phiên bản được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền của vùng bản lề của chuỗi nặng được xây dựng và được thử nghiệm trong thử nghiệm phosphoryl hóa thụ thể c-Met. Như được thể hiện trong Fig.3A, sự làm giảm trọng yếu tác dụng chủ vận đi kèm với isotype hIgG1/kappa được quan sát đối với cả cấu trúc trên cơ sở IgG2 lẫn các cấu trúc IgG1/kappa được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền [MH, MUP9H và TH7]. Sự gia tăng đồng thời về hiệu quả đối kháng cũng được tạo ra. Đột biến vùng bản lề TH7 trên cơ sở hIgG1/kappa, với hầu hết trình tự ở người, đã được chọn để hoàn tất quy trình làm giống như ở người. Trong bước tiếp theo, ba phiên bản được làm giống như ở người của vùng thay đổi Mab 224G11 được tạo ra bởi sự kết hợp tới IgG2/kappa ở người hoặc vùng cố định bản lề TH7 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền trên cơ sở

IgG1/kappa. Đối với các cấu trúc được làm giống như ở người hIgG2/kappa, phiên bản được làm giống như ở người Hz3 tạo ra khả năng chủ vận mạnh (Fig.4A), và đối với cả ba phiên bản được làm giống như ở người, hiệu quả đối kháng là nằm dưới mức quan sát được đối với Mab 224G11 ở chuột và tương đương với Mab trên cơ sở hIgG1 loại khảm (mức ức chế 56-57% của tác dụng HGF, Fig.4B). Mặt khác, sự kết hợp của ba phiên bản được làm giống như ở người Hz1, Hz2 hoặc Hz3 với đột biến IgG1/TH7 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền đã hoàn trả gần như đầy đủ các đặc tính Mab 224G11 ở chuột nhất liên quan tới hoạt tính chủ vận yếu (5-6% của tác dụng HGF) và hiệu quả đối kháng mạnh (mức chế từ 68 tới 72% của tác dụng HGF) của quá trình phosphoryl hóa thụ thể c-Met (Fig.5A và Fig.5B). Các thể biến dị này được cải thiện nhiều không những so với Mab 224G11 trên cơ sở IgG1 loại khảm mà cả với các dạng đã được làm giống như ở người trên cơ sở IgG2.

Dãy thứ hai của các phiên bản được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền của vùng bản lề của chuỗi nặng được xây dựng và được thử nghiệm trong thử nghiệm phosphoryl hóa thụ thể the c-Met. Như được thể hiện trong Fig.17A, tất cả các phiên bản mới này (c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6], c224G11[C9Δ2-7] và c224G11[Δ5-6-7-8]) đều biểu hiện tác dụng chủ vận kém hơn so với c224G11 do hoạt độ chủ vận của chúng nằm trong khoảng từ 6 tới 14% của tác dụng HGF khi được so sánh với 23% đối với c224G11. Đối với c224G11[TH7], tất cả các phiên bản mới này đều biểu hiện sự gia tăng đồng thời về hiệu quả đối kháng [Fig.17B]. Các kết quả này cho thấy rằng việc xây dựng vùng của chuỗi nặng bằng cách đột biến và/hoặc khuyết điểm sẽ có thể cải biến các đặc tính chủ vận/đối kháng của một kháng thể.

Ví dụ 6: Phân tích BRET

Trong bước đầu tiên của các thử nghiệm, được đưa ra làm đối chứng là IgG1 ở chuột nhất không liên quan, IgG1 ở người và IgG2 ở người không có tác dụng của tín hiệu BRET gây ra bởi HGF trong cả hai mô hình BRET (thử nghiệm đại diện trên 12 thử nghiệm độc lập; Fig.6). Các Mab này được dùng luôn làm các đối chứng.

Mức độ ảnh hưởng của dạng khảm IgG1 của Mab 224G11 ở chuột nhắt ([224G11]chim) trên mô hình BRET cả đime hóa c-Met lẫn hoạt hóa c-met được đánh giá. Trong khi Mab 224G11 ở chuột nhắt ức chế 59,4% tín hiệu BRET gây ra bởi HGF trên mô hình đime hóa c-Met, thì Mab [224G11]chim chỉ ức chế 28,9% (Fig.7A). Kháng thể [224G11]chim cũng có hiệu quả kém hơn về khả năng ức chế quá trình hoạt hóa c-Met gây ra bởi HGF do các kháng thể [224G11]chim và m224G11 đã lần lượt ức chế 34,5% và 56,4% tín hiệu BRET gây ra bởi HGF (Fig.7B). Ngoài ra, một mình m224G11 không có tác dụng tới quá trình hoạt hóa c-Met trong khi [224G11]chim có tác dụng chủ vận không hoàn toàn tới quá trình hoạt hóa c-Met tương ứng với 32,9% tín hiệu gây ra bởi HGF. Tác dụng chủ vận không hoàn toàn của [224G11]chim cũng thấy được trên mô hình BRET đime hóa do một mình [224G11]chim gây ra sự gia tăng BRET tương ứng với 46,6% tín hiệu gây ra bởi HGF so với 21,3% đối với m224G11 (Fig.7A).

Trong các Fig.8A và Fig.8B, các dạng khảm đã đột biến bản lề của kháng thể 224G11 thể hiện tác dụng ức chế tín hiệu BRET gây ra bởi HGF lớn hơn so với [224G11]chim do chúng thể hiện sự ức chế 59,7%, 64,4%, 53,2% và 73,8% tới tín hiệu BRET của quá trình hoạt hóa gây ra bởi HGF (Fig.8B) và sự ức chế 61,8%, 64,4% 52,5% và 64,4% tới tín hiệu BRET của quá trình đime hóa gây ra bởi HGF (Fig.8A) lần lượt đối với [224G11][MH chim], [224G11][MUP9H chim], [224G11][MMCH chim] và [224G11][TH7 chim]. Khác hẳn với [224G11]chim, có tác dụng chủ vận không hoàn toàn tới quá trình hoạt hóa c-Met, các dạng khảm đã đột biến bản lề của kháng thể 224G11 thể hiện tác dụng không đáng kể tới duy nhất quá trình hoạt hóa c-Met (lần lượt là 5,1%, 7,6%, -2,0% và -6,9%) như thấy được đối với m224G11.

Trong Fig.9B, tương tự như [224G11] [TH7 chim], 3 phiên bản được làm giống như ở người của kháng thể 224G11 IgG1 cùng với bản lề TH7 gây ra sự gia tăng không đáng kể của tín hiệu BRET trong mô hình hoạt hóa khi được thử nghiệm một mình và thể hiện khả năng ức chế mạnh tín hiệu BRET gây ra bởi HGF: 59,9%, 41,8% và 57,9% lần lượt cho các dạng Hz1, Hz2 và Hz3. Ngoài ra, [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz2] và [224G11] [TH7 Hz3] ức chế tín hiệu BRET gây ra bởi HFG trên mô hình đime hóa lần lượt là 52,2%, 35,8% và 49,4% (Fig.9A).

Khác hẳn với [224G11]chim, dạng khảm của kháng thể 224G11 IgG2 ([224G11] [IgG2 chim]) không thể hiện tác dụng chủ vận không hoàn toàn một mình và ức chế 66,3% tác dụng HGF effect trên mô hình hoạt hóa c-Met (Fig.10B). Trên mô hình dimer hóa c-Met, [224G11] [IgG2 chim] ức chế 62,4% tín hiệu BRET gây ra bởi HFG (Fig.10A).

Hiệu quả chủ vận của dãy thứ hai của các phiên bản được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền của vùng bản lề của chuỗi nặng được đánh giá trên mô hình BRET hoạt hóa c-Met (Fig.18). Khác hẳn với c224G11, có tác dụng chủ vận không hoàn toàn tới quá trình hoạt hóa c-Met, các dạng khảm đã đột biến bản lề c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6], c224G11[C9Δ2-7] và c224G11[Δ5-6-7-8] thể hiện tác dụng không đáng kể tới một mình quá trình hoạt hóa c-Met.

Ví dụ 7: Nhận diện c-Met bởi các dạng 224G11 loại khảm và được làm giống như ở người

ELISA trực tiếp đã được thiết lập để xác định khả năng gắn kết của các dạng khảm và được làm giống như ở người khác nhau trên c-Met tái tổ hợp. Nói một cách ngắn gọn, c-Met dimer tái tổ hợp từ R&D Systems được phủ 1,25μg/ml trên các đĩa Immunlon II 96 lỗ. Sau khi ủ qua đêm ở 4°C, các lỗ được làm bão hòa bằng dung dịch 0,5% gelatin/PBS. Sau đó, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở 37°C trước khi bổ sung gấp hai lần chất pha loãng của các kháng thể cần được thử nghiệm. Các đĩa được ủ một giờ nữa trước khi bổ sung IgG HRP kháng chuột nhất ở dê để phát hiện kháng thể ở chuột và HRP của chuỗi nhẹ kháng người Kappa ở dê để nhận diện kháng thể khảm và được làm giống như ở người. Các đĩa được ủ trong một giờ và cơ chất peroxydaza TMB Uptima được bổ sung cho 5mn trước khi trung hòa bằng H₂SO₄ 1M. Các kết quả được thể hiện trong Fig.11 cho thấy rằng tất cả các dạng được thử nghiệm đều tương đương cho việc nhận diện c-Met.

Ví dụ 8: Tác dụng của 224G11 loại khảm và ở chuột tới quá trình tăng sinh gây ra bởi HGF của các tế bào NCI-H441 in vitro

Các tế bào NCI-H441 từ ATCC được nuôi cấy theo cách thông thường

trong môi trường RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% FCS (Invitrogen Corporation), 1% L-Glutamin (Invitrogen corporation). Đối với các thử nghiệm quá trình tăng sinh, các tế bào được phân chia 3 ngày trước khi sử dụng sao cho chúng ở pha phát triển hợp lưu trước khi dần mỏng. Các tế bào NCI-H441 được dần mỏng trong các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ với mật độ $3,75 \times 10^4$ tế bào/lỗ trong 200 μ l môi trường không huyết thanh (môi trường RPMI 1640 bổ sung 1% L-Glutamin). Hai mươi tư giờ sau khi dần mỏng, các kháng thể cần thử nghiệm được bổ sung vào NCI-H441 và được ủ ở 37°C trong ba mươi phút trước khi bổ sung HGF với nồng độ cuối là 400ng/ml (5nm) trong 142 giờ nữa. Khoảng liều dùng được thử nghiệm cho mỗi kháng thể là nằm trong khoảng từ 10 tới 0,0097 μ g/ml (nồng độ cuối trong mỗi lỗ). Trong thử nghiệm này, Mab IgG1 ở chuột được bổ sung làm đối chứng isotype ở chuột và các kháng thể được thử nghiệm gồm các kháng thể sau đây: m224G11 và dạng khảm IgG1 ở người của nó được nhận diện là [224G11]chim. Các lỗ được giàn mỏng bằng một mình tế bào +/- HGF cũng được bao gồm. Sau đó, các tế bào được tạo xung cùng với 0,25 μ Ci của [3 H]Thymidine (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) trong 7giờ và 30phút. Độ lớn của [3 H]Thymidine đã hợp nhất trong ADN không tan trong axit tricloaxetic được định lượng bởi phép đếm nhấp nháy lỏng. Các kết quả được biểu thị dưới dạng dữ liệu cpm không biến đổi để đánh giá chính xác hơn hoạt tính chủ vận nội tại tiềm năng có thể xuất hiện cùng với các Mab kháng c-Met khi được bổ sung một mình vào tế bào khối u.

Các kết quả được mô tả trong Fig.12 đã chứng tỏ rằng, như được mong đợi, kháng thể ở chuột m224G11 không thể hiện tác dụng chủ vận khi được bổ sung một mình vào ung thư các tế bào bất kể liều dùng được thử nghiệm. Sự ức chế không đáng kể quá trình tăng sinh gây ra bởi HGF được quan sát với đối chứng isotype liên quan tới các biến thể cpm được quan sát cho hợp chất này trong thử nghiệm này. Khi được bổ sung một mình, kháng thể m224G11 không thể hiện tác dụng chủ vận bất kỳ khi được so sánh với Mab đối chứng isotype mIgG1 hoặc một mình tế bào. Các hoạt độ kháng tăng sinh phụ thuộc liều dùng đạt 78% được quan sát đối với m224G11 (tính toán % sự ức chế: $100 - [(cpm \text{ tế bào} + Mab \text{ cần thử nghiệm} - cpm \text{ trung bình trên nền mIgG1}) \times 100 / (cpm \text{ tế bào trung bình} + HGF - cpm \text{ trung bình một mình tế bào})]$). Điều ngạc nhiên là, dạng khảm của các Mab

224G11 gây ra tác dụng chủ vận phụ thuộc liều dùng đáng kể khi được bổ sung một mình. Tác dụng chủ vận này có tác động tới sự ức chế *in vitro* quá trình tăng sinh gây ra bởi HGF thay đổi từ 78% đối với 224G11 ở chuột thành 50% đối với dạng khảm. Để xác định xem liệu rằng mức “thấp” như vậy về hoạt tính chủ vận nội tại *in vitro* có tương thích với tác dụng *in vivo* không đổi hay không, thì cả m224G11 lẫn [224G11]chim được tạo ra cho thử nghiệm *in vivo*. Theo các nghiên cứu từ trước, liều dùng 30µg/chuột nhất đã chứng tỏ hoạt tính *in vivo* đáng kể, liều dùng này được chọn để đánh giá *in vivo*.

Ví dụ 9: So sánh *In vivo* giữa các Mab 224G11 loại khảm và ở chuột trên mô hình dị ghép NCI-H441

NCI-H441 có nguồn gốc từ adenocarcinom phổi nhú, biểu hiện các mức cao của c-Met, và chứng tỏ quá trình phosphoryl hóa cơ định của c-Met RTK.

Để đánh giá tác dụng *in vivo* của các kháng thể trên mô hình dị ghép NCI-H441, chuột nhất không có tuyến ức từ sáu tới tám tuần tuổi được nhốt trong các lồng được phủ bằng dàn lọc hút vô trùng, được duy trì trong các điều kiện vô trùng và được thao tác bằng tay theo các hướng dẫn French và European. Chuột nhất được tiêm dưới da 9×10^6 tế bào. Tiếp đó, sáu ngày sau khi cấy tế bào dưới da, các khối u được đo (khoảng 100 mm^3), các con vật này được chia thành nhiều nhóm mỗi nhóm gồm 6 chuột nhất có cùng kích cỡ khối u và đầu tiên được xử lý bằng liều dùng 60µg kháng thể/chuột nhất và sau đó hai lần mỗi tuần bằng 30µg/liều dùng của mỗi kháng thể cần thử nghiệm. Chuột nhất tiếp đó được quan sát về tốc độ phát triển dị ghép. Khối u thể tích được tính toán theo công thức: $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{độ dài} \times \text{độ rộng} \times \text{chiều cao}$. Các kết quả được mô tả trong Fig.13 chứng tỏ rằng Mab ở chuột không có hành vi hoạt tính chủ vận *in vivo*, như được mong đợi, làm chất đối kháng có hiệu lực ngay cả liều dùng được thử nghiệm thấp. Khác hẳn với điều quan sát được với Mab ở chuột, Mab loại khảm thể hiện hoạt tính *in vivo* rất ngắn và khối u hoàn toàn biến mất khi xử lý bằng việc tiêm tế bào sau D20. Thử nghiệm này chứng tỏ điều rõ ràng là sự gia tăng tác dụng chủ vận *in vitro* dẫn đến sự giảm hoạt tính đối kháng cũng góp phần làm mất đáng kể *in vivo* hoạt tính đối kháng.

Ví dụ 10: Effect of the Mab 224G11 ở chuột và of khác nhau chimeric và ngườiized versions of this antibody tới quá trình tăng sinh gây ra bởi HGF của các tế bào NCI-H441 *in vitro*

Các tế bào NCI-H441 from ATCC được nuôi cấy theo cách thông thường trong môi trường RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% FCS (Invitrogen Corporation), 1% L-Glutamin (Invitrogen Corporation). Đối với các thử nghiệm quá trình tăng sinh, các tế bào được phân chia 3 ngày trước khi sử dụng sao cho chúng ở pha phát triển hợp lưu trước khi dần mỏng. Các tế bào NCI-H441 được dần mỏng trong các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ với mật độ $3,75 \times 10^4$ tế bào/lỗ trong 200 μ l môi trường không huyết thanh (môi trường RPMI 1640 bổ sung 1% L-Glutamin). Hai mươi tư giờ sau khi dần mỏng, các kháng thể cần thử nghiệm được bổ sung vào NCI-H441 và được ủ ở 37°C trong ba mươi phút trước khi bổ sung HGF với nồng độ cuối là 400ng/ml (5nm) trong 142 giờ nữa. Khoảng liều dùng được thử nghiệm cho mỗi kháng thể là nằm trong khoảng từ 10 tới 0,0097 μ g/ml (nồng độ cuối trong mỗi lỗ). Trong thử nghiệm này, Mab IgG1 ở chuột được bổ sung làm đối chứng isotype ở chuột và làm đối chứng âm chủ vận. Các kháng thể được thử nghiệm gồm các kháng thể sau đây: i) m224G11, ii) dạng khảm IgG1 ở người của nó một cách tương ứng được nhận diện là [224G11] chim, [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224G11] [MMCH chim], [224G11] [TH7 chim] iii) các dạng được làm giống như ở người của nó lần lượt được mô tả là [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3]. Các lỗ được giàn mỏng bằng một mình tế bào +/- HGF cũng được bao gồm. Kháng thể nguyên vẹn 5D5 từ Genentech thương phẩm có bán ở ATCC dưới dạng dòng tế bào lai được đưa vào dưới dạng đối chứng dương chủ vận đầy đủ sau này được gọi là m5D5. Sau đó, các tế bào được tạo xung cùng với 0,25 μ Ci của [3 H]Thymidine (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) trong 7giờ và 30phút. Độ lớn của [3 H]Thymidine đã hợp nhất trong ADN không tan trong axit tricloaxetic được định lượng bởi phép đếm nhấp nháy lỏng. Các kết quả được biểu thị dưới dạng dữ liệu cpm không biến đổi để đánh giá chính xác hơn hoạt tính chủ vận nội tại tiềm năng có thể xuất hiện cùng với các Mab kháng c-Met khi được bổ sung một mình vào tế bào khối u.

Các kết quả được mô tả trong Fig.14A đã chứng tỏ rằng như được mong

đội cả đối chứng isotype lẫn m224G11 đều không thể hiện hoạt tính chủ vận bất kỳ tới quá trình tăng sinh NCI-H441. Đối chứng isotype không có tác dụng tới quá trình tăng sinh tế bào gây ra bởi HGF trong khi m224G11 thể hiện sự ức chế 66% khi được bổ sung với nồng độ cuối là 10µg/ml. m5D5 được sử dụng làm đối chứng chủ vận thể hiện, như được mong đợi, tác dụng chủ vận phụ thuộc liều dùng đầy đủ khi được bổ sung một mình vào các tế bào. Như đã quan sát được, Mab [224G11] chim thể hiện tác dụng chủ vận phụ thuộc liều dùng đáng kể và, hoạt tính ức chế giảm của dạng khảm được quan sát: 19% thay vì 66% đối với dạng ở chuột. Khi được bổ sung một mình, 3 Mab đã được làm giống như ở người IgG1 đã chứng tỏ các tác dụng chủ vận phụ thuộc liều dùng tương đương với dạng m224G11. [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2] và [224G11] [Hz3] có hoạt độ đối kháng tương đương khoảng 46, 30 và 35%. Các hoạt độ này là thấp hơn đáng kể so với hoạt độ quan sát được đối với m224G11. Trong Fig.14B, các dạng khảm IgG1 khác nhau được thử nghiệm. So với dạng khảm [224G11] thể hiện tác dụng chủ vận phụ thuộc liều dùng khi được bổ sung một mình vào các tế bào NCI-H441, thì các dạng [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224G11] [MMCH chim], [224G11] [TH7 chim] đều không có tác dụng chủ vận nội tại đáng kể. Hoạt tính đối kháng của chúng là cao hơn hoạt tính quan sát được đối với Mab m224G11 (57%) cùng với sự ức chế đạt 79, 78, 84 và 93% lần lượt đối với [224G11] [MH chim], [224G11] [MUP9H chim], [224G11] [MMCH chim] và [224G11] [TH7 chim].

Ví dụ 11: Tác dụng *In vitro* của dạng Mab 224G11 đã được làm giống như ở người IgG1 khác nhau

Các tế bào NCI-H441 từ ATCC được nuôi cấy theo cách thông thường trong môi trường RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% FCS (Invitrogen Corporation), 1% L-Glutamin (Invitrogen Corporation). Đối với các thử nghiệm quá trình tăng sinh, các tế bào được phân chia 3 ngày trước khi sử dụng sao cho chúng ở pha phát triển hợp lưu trước khi dần mỏng. Các tế bào NCI-H441 được dần mỏng trong các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ với mật độ $3,75 \times 10^4$ tế bào/lỗ trong 200µl môi trường không huyết thanh (môi trường RPMI 1640 bổ sung 1% L-Glutamin). Hai mươi tư giờ sau khi giờ sau khi dần mỏng, các kháng

thể cần thử nghiệm được bổ sung vào NCI-H441 và được ủ ở 37°C trong ba mươi phút trước khi bổ sung HGF với nồng độ cuối là 400 ng/ml (5nm) trong 142 giờ nữa. Khoảng liều dùng được thử nghiệm cho mỗi kháng thể là nằm trong khoảng từ 10 tới 0,0097 $\mu\text{g/ml}$ (nồng độ cuối trong mỗi lỗ). Trong thử nghiệm này, Mab IgG1 ở chuột được bổ sung làm đối chứng âm nền cho hoạt tính chủ vận và các kháng thể được thử nghiệm gồm các kháng thể sau đây: i) m224G11, ii) các dạng khảm IgG1 ở người của nó lần lượt được nhận diện là [224G11] chim, [224G11] [TH7 chim] iii) các dạng được làm giống như ở người của nó lần lượt được mô tả là [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]. Các lỗ được giàn mỏng bằng một mảnh tế bào +/- HGF cũng được bao gồm. Kháng thể nguyên vẹn 5D5 từ Genentech thương phẩm có bán ở ATCC dưới dạng dòng tế bào lai được đưa vào dưới dạng đối chứng dương chủ vận đầy đủ sau này được gọi là m5D5. Sau đó, các tế bào được tạo xung cùng với 0,25 μCi [^3H]Thymidine (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) trong 7 giờ và 30 phút. Độ lớn của [^3H]Thymidine đã hợp nhất trong ADN không tan trong axit tricloaxetic được định lượng bởi phép đếm nhấp nháy lỏng. Các kết quả được biểu thị dưới dạng dữ liệu cpm không biến đổi để đánh giá chính xác hơn hoạt tính chủ vận nội tại tiềm năng có thể xuất hiện cùng với các Mab kháng c-Met khi được bổ sung một mình vào tế bào khối u.

Fig.15 cho thấy rằng Mab m224G11 thể hiện tác dụng ức chế thông thường (sự ức chế 74%). Dạng IgG1 loại khảm [224G11] chim như được mong đợi có tác dụng chủ vận nội tại phụ thuộc liều dùng và tác dụng đối kháng thấp so với dạng ở chuột: sự ức chế 33% so với 74%. [224G11] [TH7 chim] có hoạt tính chủ vận rất yếu trong thử nghiệm này. Tuy nhiên, nó thể hiện tác dụng ức chế cao (81%) gần giống như tác dụng ức chế đã dự báo cho Mab ở chuột. 2 dạng được làm giống như ở người không có tác dụng chủ vận nội tại và có hoạt tính đối kháng gần giống hoạt tính quan sát được đối với Mab ở chuột hoặc [224G11] [TH7 chim] tương ứng với sự ức chế 67 và 76% đối với [224G11] [TH7 Hz1] và [224G11] [TH7 Hz3].

Ví dụ 12: So sánh *In vivo* giữa các Mab Mab 224G11 ở chuột, loại khảm và được làm giống như ở người mang bản lè TH7 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền hoặc là kiểu hoang (mô hình dị ghép NCI-H441).

NCI-H441 có nguồn gốc từ adenocarcinom phổi hình nhú, biểu hiện mức cao của c-Met, và thể hiện quá trình phosphoryl hóa cấu thành của c-Met RTK.

Để đánh giá tính tất yếu của tạo bản lề bằng kỹ thuật di truyền để giữ lại hoạt tính *in vivo* kháng thể ở chuột 224G11, chuột nhất không có tuyến ức từ sáu tới tám tuần tuổi được nhốt trong các lồng được phủ bằng dàn lọc hút vô trùng, được duy trì trong các điều kiện vô trùng và được thao tác bằng tay theo các hướng dẫn French và European. Chuột nhất được tiêm dưới da 9×10^6 tế bào NCI-H441. Tiếp đó, sáu ngày sau khi cấy tế bào dưới da, các khối u được đo (khoảng 100mm^3), các con vật này được chia thành nhiều nhóm mỗi nhóm gồm 6 chuột nhất có cùng kích cỡ khối u và đầu tiên được xử lý bằng liều dùng 2mg kháng thể/chuột nhất và sau đó hai lần mỗi tuần bằng 1mg/liều dùng của mỗi kháng thể cần thử nghiệm. Mười kháng thể được đánh giá trong thử nghiệm này bao gồm m224G11, dạng khảm thể hiện bản lề kiểu hoang (c224G11), dạng khảm TH7 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền (224G11[TH7 chim]), ba dạng được làm giống như ở người mang bản lề kiểu hoang (224G11[IgG1 Hz1], 224G11[IgG1 Hz2] và 224G11[IgG1 Hz3]) và ba dạng di truyền TH7 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền tương ứng (224G11[TH7 Hz1], 224G11[TH7 Hz2] và 224G11[TH7 Hz3]). sau đó chuột nhất được quan sát về tốc độ phát triển dị ghép.

Thể tích khối u được tính toán theo công thức: $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{độ dài} \times \text{độ rộng} \times \text{độ cao}$.

Các kết quả được mô tả trong Fig.16 chứng tỏ rằng Mab ở chuột không có hành vi hoạt tính chủ vận bất kỳ *in vitro*, như được mong đợi, làm chất đối kháng hiệu lực *in vivo*. Khác hẳn với điều quan sát được đối với Mab ở chuột, cả dạng khảm lẫn dạng được làm giống như ở người mang bản lề kiểu hoang đều thể hiện hoạt tính nhất thời *in vivo*. Trong trường hợp bất kỳ, việc thay thế bản lề kiểu hoang bằng bản lề TH7 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có được sự hoàn trả hoàn toàn hoạt tính *in vivo* được quan sát với các kháng thể ở chuột. Thử nghiệm này chứng tỏ một cách rõ ràng là sự gia tăng tác dụng chủ vận *in vitro* dẫn đến sự giảm hoạt tính đối kháng cũng góp phần đáng kể về sự mất hoạt tính đối kháng *in vivo*. Nó cũng chứng tỏ là việc sử dụng vùng TH7 được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền thay cho kiểu hoang là cần thiết để duy trì các đặc tính *in vivo* của Mab ở chuột.

Ví dụ 13: Tác dụng của m224G11 và dạng được làm giống như ở người của nó h224G11 tới quá trình điều hòa giảm c-Met *in vitro*

Trong các ví dụ dưới đây, để tránh nhầm lẫn, thuật ngữ "h224G11" dùng để chỉ dạng đã được làm giống như ở người 224G11 [TH7 Hz3] của kháng thể theo sáng chế.

Hai các dòng tế bào đã được chọn để đánh giá hoạt tính của các kháng thể kháng c-Met tới sự thoái biến thụ thể c-Met. A549 (#HTB-174) và NCI-H441 (#CCL-185) là hai dòng tế bào NSCLC từ bộ sưu tập ATCC. Các tế bào NCI-H441 được gieo trong RPMI 1640 + 1% L-glutamin + 10% FBS đã làm bất hoạt bằng nhiệt, với mật độ 3×10^4 tế bào/cm² trong các đĩa sáu lỗ trong 24 giờ ở 37°C trong môi trường 5%CO₂. Các tế bào A549 được gieo trong F12K + 10% FBS đã làm bất hoạt bằng nhiệt, với mật độ 2×10^4 tế bào/cm² trong các đĩa sáu lỗ trong 24 giờ ở 37°C trong môi trường 5%CO₂.

Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng nước muối đệm phosphat (PBS) trước khi bỏ đối huyết thanh trong 24 giờ nữa. Các kháng thể kháng c-Met (10µg/ml), mIgG1 không liên quan (10µg/ml), hoặc HGF (400 ng/mL) được bổ sung trong môi trường DMEM không huyết thanh ở 37°C. Sau 4 giờ hoặc 24 giờ ủ, môi trường được loại bỏ một cách êm dịu và các tế bào rửa hai lần bằng PBS lạnh. Các tế bào được phân giải bằng 500µL chất đệm phân giải đã làm lạnh bằng đá [50mM Tris-HCl (độ pH = 7,5); 150mM NaCl; 1% Nonidet P40; 0,5% deoxycolat; và 1 viên cốc tai chất ức chế proteaza hoàn toàn bổ sung 1% antiphosphataza]. Các sản phẩm phân giải tế bào được lắc trong 90 phút ở 4°C và được làm trong ở 15000 vòng/phút trong 10 phút. Ở giai đoạn này, các sản phẩm phân giải tế bào có thể được cất giữ ở -20°C cho đến khi cần phân tích Thẩm Tây. Nồng độ protein được định lượng bằng cách sử dụng BCA. Toàn bộ các sản phẩm phân giải tế (5µg trong 20µl) được phân tách bằng SDS-PAGE và được chuyển vào màng nitroxenluloza. Các màng này được làm bão hòa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng TBS-Tween 20 0,1%(TBST); 5% sữa khô không chất béo và được dò bằng kháng thể kháng c-Met (pha loãng 1/1000) qua đêm ở 4°C trong TBST-5% sữa khô không chất béo. Các kháng thể được pha loãng trong nước muối đệm tris-0,1% tween 20 (thể tích/thể tích) (TBST) có 1% sữa khô

không chất béo. Sau đó, các màng được rửa bằng TBST và được ủ cùng với kháng thể thứ cấp đã tiếp hợp peroxydaza (pha loãng 1:1000) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các protein có hoạt tính miễn dịch được hiển thị hóa bằng ECL (Pierce # 32209). Sau khi hiển thị hóa c-Met, các màng được rửa một lần nữa bằng TBST và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng cùng với kháng thể kháng GAPDH ở chuột nhất (pha loãng 1/200 000) trong TBST-5% sữa khô không chất béo. Sau đó, các màng được rửa trong TBST và được ủ cùng với các kháng thể thứ cấp đã tiếp hợp peroxydaza, trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các màng được rửa và GAPDH được hiện hình bằng cách sử dụng ECL. Cường độ dải được định lượng bằng phép đo tỷ trọng.

Các kết quả được thể hiện trong các Fig.19A và Fig.20A đã chứng tỏ rằng cả m224G11 lẫn h224G11 đều có khả năng điều hòa giảm một cách đáng kể c-Met, theo cách phụ thuộc liều dùng, trong các dòng tế bào cả A549 lẫn NCI-H441. Quá trình điều hòa giảm là đáng kể sau khoảng thời gian ủ 4 giờ và vẫn tăng lên ở thời điểm 24 giờ. Biểu đồ được trình bày trong Fig.19A và Fig.20A cấu thành các giá trị trung bình hoặc lần lượt là tương ứng với 4 và 3 thử nghiệm độc lập. Các ảnh Thăm Tây tương ứng với một thử nghiệm đáng kể được bao gồm trong các Fig.19B và Fig.20B.

Ví dụ 14: Tác dụng của m224G11 và dạng được làm giống như ở người của nó h224G11 tới sự tróc c-Met *in vitro*

Các dạng đã tróc có thể tan được của thụ thể c-Met xuất hiện tự nhiên trong huyết thanh của chuột nhất đã dị ghép với khối u ở người hoặc trong huyết thanh của người bệnh mang các khối u biểu hiện c-Met. Ngoài ra, các kháng thể kháng c-Met như Mab DN30, được mô tả là tác nhân cảm ứng tróc của c-Met trong các thử nghiệm *in vitro*. Để xác định liệu rằng m224G11 có đặc tính như vậy hay không, các tế bào được gieo trong các đĩa sáu lỗ trong môi trường 10% FCS. Khi chúng đạt sự hợp lưu khoảng 80%, môi trường được loại bỏ và môi trường nuôi cấy hoàn tất mới +/- các hợp chất cần thử nghiệm được bổ sung. Các tế bào được ủ trong 72 giờ nữa cùng với m224G11 là đối chứng isotype mIgG1 hoặc cùng với PBS. PMA (phorbol meristat axetat) được đưa vào dưới dạng tác nhân cảm ứng tróc. HGF cũng được thử nghiệm trên các tế bào để xác định tác động của phối tử

c-Met tới sự tróc xuất hiện tự nhiên. Sau đó, các dịch nổi trên bề mặt được thu gom và được lọc trên 0,2 μ m trước khi áp dụng trong thử nghiệm ELISA mà các dạng có thể hòa tan được của c-Met được bắt giữ bằng kháng thể kháng c-Met không thừa nhận epitop tương tự dưới dạng m224G11 hoặc dưới dạng c11E1 (Fig.21). Ngoài ra, các tế bào từ mỗi lỗ được rửa một lần bằng PBS và được phân giải để xác định nồng độ protein. Dùng cho ELISA, 224D10 được sử dụng làm kháng thể bắt giữ và sau khi làm bão hòa đĩa, các dịch nổi trên bề mặt đã lọc từ các đĩa sáu lỗ được bổ sung trong thử nghiệm ELISA. Dạng c-Met monome được sử dụng làm đối chứng dương. Sau khi ủ dịch nổi trên bề mặt, các đĩa được rửa để loại bỏ c-Met chưa được gắn kết và c11E1 được sử dụng để phát hiện c-Met đã bị bắt giữ bởi Mab 224G11. Việc phát hiện của thử nghiệm này cuối cùng được tiến hành bằng cách bổ sung kháng thể đa dòng kháng hFc đã tiếp hợp HRP.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.22 biểu thị rằng sự tróc tự nhiên c-Met đã xuất hiện khi các tế bào được nuôi cấy trong 72 giờ in vitro. Không quan sát được tác dụng của mIgG1. Tuy nhiên, việc bổ sung m224G11 dường như ức chế sự tróc c-Met. Những kết quả này được xác nhận đối với 3 dòng tế bào khác (Hs746T, EBC1 và MKN45) trong Fig.23. Trong thử nghiệm thứ hai này, PMA, được bổ sung làm tác nhân gây cảm ứng tróc dương tính, đã làm tăng lên một cách đáng kể, như được mong đợi, sự tróc c-Met ít nhất là trong 2 dòng tế bào (Hs746T và MKN45). Sau cùng, trong thử nghiệm thứ ba (Fig.24), HGF được đưa vào dưới dạng đối chứng. Không thấy có sự tróc bổ sung bị gây ra bởi HGF giống như một mình tế bào hoặc các tế bào + mIgG1. Một lần nữa, sự ức chế đáng kể sự tróc c-Met đã được quan sát đối với m224G11.

Ví dụ 15: Tác dụng nội tại của h224G11 Ab tới các dòng tế bào khác nhau

Trong các thử nghiệm trước đã được mô tả trong sáng chế này, điều đã chứng tỏ là khác hẳn với điều quan sát đối với các kháng thể khác như 5D5, m224G11 và dạng được làm giống như ở người của nó h224G11 không thể hiện hoạt tính nội tại đáng kể của các dòng tế bào khối u. Để mở rộng đặc tính này cho các dòng tế bào khác, các thử nghiệm thấm tây và phospho-ELISA được tiến hành với một mình kháng thể, được bổ sung trong nhiều lần khác nhau, trên tập hợp các dòng tế bào ung thư, với các mức khác nhau của sự biểu hiện c-Met, bao

gồm Hs746T, NCI-H441, Hs578T, NCI-H125, T98G, MDA-MB-231, PC3. Thử nghiệm tương tự cũng được tiến hành trong một tế bào bình thường: HUVEC.

Phương pháp để thử nghiệm phospho cMet ELISA đã được mô tả trong Ví dụ 5 của patent này. Dùng cho phân tích Tây, các sản phẩm phân giải protein được làm từ các tế bào đã tạo viên bằng cách ủ trong chất đệm phân giải cùng với các chất ức chế proteaza và phosphatasa [10nM Tris (độ pH = 7,4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5% Nonidet P40, 100mM natri florua, 10mM natri pyrophosphat, 2mM natri orthovanadat, 2mM PMSF, 10mg/ml leupeptin, 10mg/ml aprotinin] ở 4°C. Các sản phẩm phân giải protein được làm trong các mảnh vụn tế bào bằng cách ly tâm, được phân giải bằng cách điện di trên 8% gen SDS-PAGE, và được chuyển điện vào màng nitroxenluloza. Để dùng cho các thử nghiệm c-Met, các sản phẩm thủy phân được kết tủa miễn dịch đối với protein đặc thù được quan tâm trước khi điện di và chuyển điện.

Các kết quả được thể hiện trong các hình vẽ từ Fig.25 tới Fig.32 chứng tỏ một lần nữa rằng không thấy có hoạt tính nội tại của kháng thể h224G11 trong các tế bào được thử nghiệm.

Ví dụ 16: So sánh In vivo 224G11 kiểu hoang ở chuột với dạng 224G11 đã được tạo bằng kỹ thuật di truyền bản lề loại khả được mô tả là 224G11[C2D5-7] (mô hình dị ghép NCI-H441)

NCI-H441 có nguồn gốc từ adenocarcinom phổi hình nhú, biểu hiện mức cao của c-Met, và thể hiện quá trình phosphoryl hóa cấu thành của c-Met RTK.

Để đánh giá tính tất yếu của tạo bản lề bằng kỹ thuật di truyền để giữ lại hoạt tính in vivo của kháng thể ở chuột 224G11, chuột nhất không có tuyến ức từ sáu tới tám tuần tuổi được nhốt trong các lồng được phủ bằng dãn lọc hút vô trùng, được duy trì trong các điều kiện vô trùng và được thao tác bằng tay theo các hướng dẫn French và European. Chuột nhất được tiêm dưới da 9×10^6 tế bào NCI-H441. Tiếp đó, sáu ngày sau khi cấy tế bào dưới da, các khối u được đo (khoảng 100mm^3), các con vật này được chia thành nhiều nhóm mỗi nhóm gồm 6 chuột nhất có cùng kích cỡ khối u và đầu tiên được xử lý bằng liều dùng 2mg kháng thể/chuột nhất và sau đó hai lần mỗi tuần bằng 1mg/liều dùng của mỗi kháng thể cần thử nghiệm. Chuột nhất tiếp đó được sự quan sát về tốc độ phát triển dị ghép.

Thể tích khối u được tính toán theo công thức: $\pi (Pi)/6 \times \text{độ dài} \times \text{độ rộng} \times \text{chiều cao}$. Các kết quả được mô tả trong Fig.33 chứng tỏ rằng Mab ở chuột không có hành vi hoạt tính chủ vận in vitro bất kỳ, như được mong đợi, làm chất đối kháng in vivo hiệu lực. Như được gợi ý bởi các kết quả thu được in vitro, trong các thử nghiệm phosphoryl hóa, kháng thể có bản lề được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền c224G11[C2D5-7], không thể hiện tác dụng chủ vận chủ vận đáng kể, chứng tỏ hoạt tính in vivo mạnh, tương đương với hoạt tính của m224G11 trên mô hình dị ghép NCI-H441.

Ví dụ 17: Đánh giá h224G11 trong thử nghiệm ADCC

Do h224G11 có isotype IgG1, nên ADCC có thể có một phần tác dụng *in vivo* của nó ở người. Thử nghiệm độc tính tế bào giải phóng *in vitro* [^{51}Cr] được thực hiện bằng cách sử dụng Hs746T hoặc các tế bào NCI-H441 làm các tế bào đích và các tế bào NK được tinh chế từ các lymphô bào đơn nhân của máu ngoại vi ở người.

Nói một cách ngắn gọn, một triệu tế bào đích Hs746T hoặc NCI-H441 được ủ cùng với hoặc không cùng với 20 μg h224G11 Ab với sự có mặt của 100 μCi ^{51}Cr (Perkin Elmer) trong 1 giờ. Sau đó, 4×10^3 tế bào được dàn mỏng cùng với số lượng gia tăng của các tế bào tử vong tự nhiên ở người được tách ra từ các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) bằng cách áp dụng quá trình lựa chọn âm tính (Stemcell Technologies). Các tế bào được ủ cùng với nhau trong 4 giờ nữa ở 37°C. Phần trăm sự phân giải tế bào được tính toán theo công thức: $[(\text{sự giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ trong thử nghiệm} - \text{sự giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ tự nhiên})/(\text{sự giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ đầy đủ} - \text{sự giải phóng } ^{51}\text{Cr} \text{ tự nhiên})] \times 100$. Sự giải phóng tự nhiên là số đếm thu được khi các tế bào đích được nuôi cấy khi không có mặt của các tế bào tử vong tự nhiên. Sự giải phóng đầy đủ là số đếm thu được khi các tế bào đích được phân giải bằng 1% Triton X-100. h224G11 làm tăng lên một cách đáng kể sự phân giải của các tế bào cả Hs746T (Fig.34a) lẫn NCI-H441 (Fig.34b) lần lượt là 62,9% và 63,2% với tỷ lệ của các tế bào NK/Target là 100.

Ví dụ 18: Các nghiên cứu hóa học mô miễn dịch (IHC)

Các phương pháp nhuộm IHC các khối u đã được gắn parafin: các phần từ 8

tới 12 μ M của các khối u đã làm đông lạnh đã và được cố định ngay lập tức trong axeton đã làm lạnh trước -20°C trong 3 phút. Sau đó, các lát cắt được làm lạnh ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút tới 1 giờ. Sau 2 lần rửa trong PBS, hoạt tính peroxidaza nội sinh được phong bế bằng cách sử dụng chất phản ứng phong bế peroxidaza (Dako K4007) trong năm phút. Các phần được rửa bằng PBS và được ủ trong chất phản ứng phong bế avidin/biotin (Dako X0590) ngay trước khi làm bão hòa các vị trí không đặc thù trong PBS-BSA 4% trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các lát cắt được ủ cùng với h224G11 đã biotinyl hóa (từ 50 tới 10 μ g/ml) hoặc IgG1/kappa đã biotinyl hóa ở người (từ 50 tới 10 μ g/ml, vị trí gắn kết) làm đối chứng âm 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Các phần được rửa bằng PBS và được ủ cùng với phổ sụng phức chất Streptavidin-peroxydaza (Dako K0679) trong khoảng thời gian từ 30 tới 45 phút. 3-amino-9-etylcarbazol được sử dụng để phát triển sản phẩm phản ứng đỏ (Sigma). Các lát cắt đã được ngâm trong hematoxylin trong 4 phút đưa vào phản chất nhuộm (Dako S3309).

Các kết quả được thể hiện trong Fig.35.

h224G11 nhuộm một cách khác biệt màng tế bào của các loại khối u khác nhau. Trong phương pháp hóa học mô miễn dịch này, sản phẩm phản ứng đỏ tương quan với việc nhuộm dương tính màng tế bào và không có sản phẩm phản ứng đỏ tương quan với sự nhuộm âm tính và không hiển thị hóa màng tế bào. Đối chứng IgG, IgG1/kappa ở người là đối chứng đáp ứng isotype.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó, có khả năng ức chế quá trình đime hoá c-Met, kháng thể này hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó bao gồm chuỗi nặng chứa CDR-H1, CDR-H2 và CDR-H3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 1, 2 và 3; và chuỗi nhẹ chứa CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin SEQ ID No. 5, 6 và 7, kháng thể này hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó, còn khác biệt ở chỗ, nó cũng bao gồm vùng bản lề chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID No. 22, 23, 24, 26, 28, từ 59 tới 63 và từ 65 tới 71.
2. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, vùng bản lề bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID No. 24, 26 và 28 và các SEQ ID No. từ 59 tới 63 và từ 65 tới 71.
3. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, nó gồm kháng thể khảm.
4. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 1 hoặc 2, khác biệt ở chỗ, nó gồm kháng thể được làm giống như ở người.
5. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 4, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4; và vùng thay đổi của chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 8, 9 hoặc 10.
6. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4; vùng thay đổi của chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 8; và vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 28.
7. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit

amin SEQ ID No. 4; vùng thay đổi của chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 9; và vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 28.

8. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 5, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm vùng thay đổi của chuỗi nặng có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 4; vùng thay đổi của chuỗi nhẹ có trình tự bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 10; và vùng bản lề chứa trình tự axit amin SEQ ID No. 28.

9. Kháng thể hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó theo điểm 8, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm chuỗi nặng đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 37 và chuỗi nhẹ đầy đủ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID No. 40.

10. Axit nucleic đã được phân lập, khác biệt ở chỗ, nó được chọn trong số các axit nucleic:

a) axit nucleic, ADN hoặc ARN, mã hoá cho kháng thể, hoặc dẫn xuất hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó, như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 9;

b) axit nucleic như được xác định ở mục a) và bao gồm trình tự ADN bao gồm các trình tự SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13 và các trình tự SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16 và SEQ ID No. 17;

c) axit nucleic như được xác định ở mục a) hoặc b) và bao gồm trình tự ADN bao gồm các trình tự SEQ ID No. 14 và SEQ ID No. 18, 19 hoặc 20;

d) axit nucleic ARN tương ứng của các axit nucleic ADN như được xác định ở mục a), b) hoặc c); và

e) axit nucleic bổ trợ của các axit nucleic như được xác định ở mục a), b) và c).

11. Axit nucleic đã được phân lập theo điểm 10, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleic mã hoá cho vùng bản lề của kháng thể này bao gồm trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID No. 29, 30, 31, 33, 35, từ 74 tới 78 và từ 80 tới 86 khi vùng bản lề có trình tương ứng trong số các trình tự SEQ ID No. 22, 23, 24, 26, 28, từ 59 tới 63 và từ 65 tới 71.

12. Vật truyền chứa axit nucleic theo điểm 10 hoặc 11.

13. Tế bào chủ chứa vật truyền theo điểm 12.

14. Động vật biến đổi gen, trừ người, bao gồm ít nhất một tế bào theo điểm 13 được biến nạp bằng vật truyền.

15. Quy trình sản xuất kháng thể, hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó, như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 9, khác biệt ở chỗ, nó bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy trong môi trường và các điều kiện nuôi cấy tế bào thích hợp theo điểm 13; và
- b) thu hồi kháng thể, hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó, đã được tạo ra như vậy từ môi trường nuôi cấy hoặc các tế bào được nuôi cấy.

16. Chế phẩm chứa hoạt chất là hợp chất gồm kháng thể, hoặc đoạn chức năng có hoá trị hai của nó, như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 9.

17. Phương pháp chẩn đoán *in vitro* các bệnh do sự biểu hiện quá mức hoặc sự biểu hiện dưới mức bình thường của thụ thể c-Met từ mẫu sinh học trong đó thụ thể c-Met bị nghi ngờ là có mặt ở mức không bình thường, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước trong đó mẫu sinh học được cho tiếp xúc với kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 tới 9.

Danh mục trình tự

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> kháng thể kháng cMet

<130> D27117

<140> PCT/EP2009/066201

<141> 2009-12-02

<150> PCT/IB2008/055663

<151> 2008-12-02

<150> US 61/184,502

<151> 2009-06-05

<160> 117

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 2

Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 4

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 Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn 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 Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 5

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 6

Arg Ala Ser
 1

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 7

Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 11

ggctacatct tcacagcata cacc

24

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 12
 attaaaccca acaatgggct ggcc 24

<210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 13
 gccaggagcg aaattacaac agaattcgat tac 33

<210> 14
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 14
 caggtccagc tgggtcaatc cggcgagag gtgaagaagc caggcgcttc cgtgaaggtg 60
 agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
 cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaaccca acaatgggct ggccaactac 180
 gccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaaggata ccagcatcag caccgcatat 240
 atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgcgc caggagcgaa 300
 attacaacag aattcgatta ctgggggcag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 15
 gaatctgtgg actcttacgc aaacagcttt 30

<210> 16
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 16
 agggcttct 9

<210> 17
 <211> 27
 <212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 17

cagcagtcca aggaggaccc cctgact

27

<210> 18

<211> 333

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 18

gacattgtgc tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60

atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgaa acagctttat gcactggtat 120

cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgattaca gggtcttac caggagagc 180

ggcgtgccc ataggttcag cggatctggc agcaggaccg actttacact gaccatctcc 240

agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300

actttcgggg gtgtactaa agtggagatc aag 333

<210> 19

<211> 333

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 19

gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60

atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgaa acagctttat gcactggtat 120

cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgattaca gggtcttac caggagagc 180

ggcgtgccc ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240

agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300

actttcgggg gtgtactaa agtggagatc aag 333

<210> 20

<211> 333

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 20

gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60

atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgaa acagctttat gcactggtat 120

cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgattaca gggtcttac caggagagc 180

ggcgtgccc ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240

agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300

actttcgggg gtgtactaa agtggagatc aag

333

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự protein bản lề nhân tạo liên ứng

<220>

<221> đột biến

<222> (1)..(1)

<223> Xaa là P hoặc R

<220>

<221> đột biến

<222> (2)..(2)

<223> Xaa là K hoặc R

<220>

<221> đột biến

<222> (3)..(3)

<223> Xaa là S, D hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (5)..(5)

<223> Xaa là G, D hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (7)..(7)

<223> Xaa là K, H hoặc V

<220>

<221> đột biến

<222> (8)..(8)

<223> Xaa là E, P, T hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (10)..(10)

<223> Xaa là P hoặc I

<220>

<221> đột biến

<222> (11)..(11)

<223> Xaa là P hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (13)..(13)

<223> Xaa là P hoặc T

<400> 21

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa

1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lề nhân tạo có nguồn gốc từ IgG2

<400> 22

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lề nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 23

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lề nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 24

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lề nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 25

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Pro
 1 5 10

<210> 26

<211> 13
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 26

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 27

Pro Arg Asp Cys Gly Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 28

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG2

<400> 29
 aggaagtgcgt gtgtggagtgc cccccctgc cca 33

<210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 30
 ccccgaggact gtgggtgcaa gccttgcat tgtacc 36

<210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 31
 cccaagagct gtgggtgcaa gccttgcat tgtacc 36

<210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 32
 ccaaagagct gcggctgcaa gccttgatc tgtccc 36

<210> 33
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 33
 ccacgggact gtgggtgcaa gccctgccct ccgtgtcca 39

<210> 34
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 34
 ccagagact gtgggtgtca cacctgccct ccttgctct 39

<210> 35
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> bản lễ nhân tạo có nguồn gốc từ IgG1

<400> 35

cccaaaagct gcgattgccca ctgtcctcca tgtcca

36

<210> 36

<211> 443

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 36

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 Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn 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 Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 37
<211> 445
<212> PRT
<213> chuột nhà

<400> 37

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 Ile Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn 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 Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 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> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 39
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 40
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 41
<211> 1332
<212> ADN
<213> chuột nhà

<400> 41
caggtccagc tgggtcaatc cggcgcagag gtgaagaagc caggcgcttc cgtgaaggtg 60
agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaaccca acaatgggct ggccaactac 180
gccagaaaat tccagggtag ggtcactatg acaagggata ccagcatcag caccgcatat 240
atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgtgtctt attattgcgc caggagcgaa 300
attacaacag aattcgatta ctggggggcag ggcacccctg tgaccgtgtc ctctgccagc 360
accaaggggc caagcgtgtt cccgctagcg cctgctcca gaagcaccag cgagagcaca 420
ggcgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcca agcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gaggaagtgc 660
tgtgtggagt gccccccctg cccagcccc ccagtggccg gaccagcgt gttctgttc 720
cccccaagc ccaaggacac cctgatgac agcagaaccc ccgaggtgac ctgtgtggtg 780
gtggacgtgt cccacgagga ccccgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttta acagcacctt ccgggtggtg 900
tccgtgtga ccgtggtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggtc 960
tccaacaagg gcctgccagc cccatcgaa aagaccatca gcaagaccaa gggacagcca 1020
agagagccac aggtctacac cctgcccccc agcagggagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
tccctgacct gtctggtgaa gggtcttac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccaa tgctggacag cgacggcagc 1200
ttcttctgt acagcaagct gacagtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260

agctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320

tcccaggt ga

1332

<210> 42

<211> 1341

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 42

caggtccagc tgggtcaatc cggcgagag gtgaagaagc caggcgcttc cgtgaagtg 60

agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacaca tgcactgggt gaggcaagct 120

cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaacca acaatgggt ggccaactac 180

gcccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaaggata ccagcatcag caccgcatat 240

atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgcgc caggagcgaa 300

attacaacag aattcgatta ctgggggcag ggcacctgg tgaccgtgc ctctgccagc 360

accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccgtcttcaa agagtacctc aggcggaact 420

gccgctcttg gttgccttg gaaggactat ttctctgagc ccgtgacgt cagctggaac 480

tctggcgac tgactagcgg cgtacacaca ttccctgagg tcttcaaag ttccgggtg 540

tactactgt cctccgtgt gaccgttcca tctagttccc tcgggacaca gacatac 600

tgtaatgtga atcataagcc ttcaaacacc aaggtcgaca aacgggtcga gcccaaaagc 660

tgcgattgcc actgtctcc atgtccagcc cccgaactgt tgggcggacc gagcgtgttc 720

ttgtttccac ccaagcccaa agataccctc atgacagca gaacccccga ggtgacctgt 780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggt cgtggacggc 840

gtggagggtgc acaagcccaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900

gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960

aaggtgtcca acaagccct gccagccca atcgaaaaga ccatcagca ggccaagggc 1020

cagccaagag agccccaggt gtacacctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaaggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgtt ggacagcgac 1200

ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260

gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320

agcctgtccc caggcaagt a

1341

<210> 43

<211> 657

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 43

gacattgtgc tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60

atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcactggtat 120

cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggctttac caggagagc 180

ggcgtgcccc ataggttcag cggatctggc agcaggaccg actttacact gaccatctcc 240

agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300

actttcgggg gtgtactaa agtggagatc aagcgtacgg tggccgtcc cagcgtgttc 360

atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420

aacaacttct accccaggga ggccaagggt cagtgaagg tggacaacgc cctgcagagc 480

ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540

agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600

accaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

<210> 44

<211> 657

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 44

gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60

atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcactggtat 120

cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggctttac caggagagc 180

ggcgtgcccc ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240

agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300

actttcgggg gtgtactaa agtggagatc aagcgtacgg tggccgtcc cagcgtgttc 360

atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420

aacaacttct accccaggga ggccaagggt cagtgaagg tggacaacgc cctgcagagc 480

ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540

agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600

accaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

<210> 45

<211> 657

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 45

gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgaa acagctttct gcactggtat 120
 cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgattaca gggcttctac caggagagc 180
 ggctgtcccg atagggtcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300
 actttcgggg gtgttactaa agtggagatc aagcgtacgg tggccgtcc cagcgtgttc 360
 atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct accccaggga ggccaagggt cagtgaagg tggacaacgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtagcc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 46

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 112
<212> PRT
<213> chuột nhà

<400> 47

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

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

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
100 105 110

<210> 48
<211> 354
<212> ADN
<213> chuột nhà

<400> 48

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60

agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120

ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180

aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240

atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300

atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcaactgcac tgaccgtctc ctcc 354

<210> 49
<211> 333

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 49

gatattgtgc tgacacagtc tccgcaagc ctcgctgta gcctgggtca acgggccaca 60

attagttgtc gcgcctctga atccgtcgac tcttatgcta acagctttat gcactggtat 120

caacagaagc ccgggcagcc acctaaactg ctgatctaca gggccagcaa tctggagagt 180

ggcatcccag ctgatttag cgggtccggg tccaggaccg acttcactct gaccatcaac 240

cccgtggagg cagacgacgt ggccacttac tactgccagc agtctaaaga ggatccctc 300

acattcggct ccggaacaaa gctggaatg aag 333

<210> 50

<211> 443

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 50

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 51

<211> 446

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 51

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 52
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 52

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

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

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 53

<211> 1332

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 53

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcg ccctgctcca gaagcaccag cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgccttgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgttgt gaccgtgcca agcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
 tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gaggaagtc 660
 tgtgtggagt gccccccctg cccagccccc ccagtggccg gaccagcgt gttcctgttc 720
 ccccccaagc ccaaggacac cctgatgac agcagaacct ccgaggtgac ctgtgtggtg 780
 gtggacgtgt cccacgagga ccccgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttta acagcacctt ccgggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtggtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggtc 960
 tccaacaagg gcctgccagc cccatcgaa aagaccatca gcaagaccaa gggacagcca 1020
 agagagccac aggtctacac cctgcccccc agcagggagg agatgaccaa gaaccagtg 1080

tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccaa tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttctgt acagcaagct gacagtggac aagagcagat ggcagcaggg caactgttc 1260
 agctgctccg tgatgcacga ggcctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320
 tccccaggct ga 1332

<210> 54
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 54
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccgtcttcaa agagtacctc aggcggaact 420
 gccgctcttg gttgccttgt gaaggactat ttctctgagc ccgtgacggt cagctggaac 480
 tctggcgcac tgactagcgg cgtacacaca ttcctgcgg tgctccaaag ttccgggctg 540
 tactcactgt cctccgttgt gaccgttcca tctagttccc tcgggacaca gacatacatc 600
 tgtaatgtga atcataagcc tcaaacacc aaggtcgaca aacgggtcga gcccaaaagc 660
 tgcgattgcc actgtctcc atgtccagcc ccggaactgt tggcgggacc gagcgtgttc 720
 ttgtttccac ccaagcccaa agataccctc atgacagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggtg cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggcctt gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccagggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tctgtacag caagtgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgagcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320

agcctgtccc caggcaagtg a

1341

<210> 55

<211> 657

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 55

gatattgtgc tgacacagtc tcccgcaagc ctgctgtta gcctgggtca acgggccaca 60

attagtgtc ggcctctga atccgtcgac tcttatgcta acagctttat gcactggtat 120

caacagaagc ccgggcagcc acctaaactg ctgatctaca gggccagcaa tctggagagt 180

ggcatcccag ctagatttag cgggtccggg tccaggaccg acttactct gaccatcaac 240

cccgtggagg cagacgacgt ggccacttac tactgccagc agtctaaaga ggatcccctc 300

acattcggct ccggaacaaa gctggaaatg aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 360

atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420

aacaacttct accccaggga ggccaagggt cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 480

ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540

agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600

accaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgtgta 657

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> trình tự protein bản lẻ nhân tạo liên ứng

<220>

<221> đột biến

<222> (1)..(1)

<223> X is P, R, C hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (2)..(2)

<223> X là K, C, R hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (3)..(3)

<223> X là S, C, D hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (5)..(5)

<223> X is D, C, G hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (6)..(6)

<223> X là K, C hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (7)..(7)

<223> X là T, C hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (8)..(8)

<223> X là H, V, K hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (9)..(9)

<223> X là T, C, E, P hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (11)..(11)

<223> X là P hoặc I

<220>

<221> đột biến

<222> (12)..(12)

<223> X is P hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (14)..(14)

<223> X là P hoặc T

<400> 56

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa

1 5 10

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> trình tự protein bản lẻ nhân tạo liên ứng

<220>

<221> đột biến

<222> (1)..(1)

<223> X is P, R, C hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (2)..(2)

<223> X là K, C, R hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (3)..(3)

<223> X là S, C, D hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (5)..(5)

<223> X is D, C, G hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (6)..(6)

<223> X là K, C hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (7)..(7)

<223> X là T, C hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (8)..(8)

<223> X là H, V, K hoặc không có gì

<220>

<221> đột biến

<222> (9)..(9)

<223> X là T, C, E, P hoặc không có gì

<400> 57

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 58

Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 59

Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 60

Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 61

Pro Lys Ser Cys Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 62

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 63

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 64

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 65
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 65

Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 66
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 66

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 67
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 67

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 68
 <211> 12

<212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 68

Pro Cys Ser Cys Lys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 69

Pro Ser Cys Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 70

Pro Ser Cys Asp Lys His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 71

Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 72
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 72

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 73

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 73

tgcaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 74

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 74

ccctgcagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 75

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 75

cccaagtgt gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 76

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 76

cctaagagct gttgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 77

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 77

cccaagagct gcgactgcac ccacacctgt cccccctgcc ct

42

<210> 78

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 78

cccaagagct ggcacaagtg ccacacctgt cccccctgcc ct

42

<210> 79

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 79

cccaagagct ggcacaagac ccactgctgt cccccctgcc ct

42

<210> 80

<211> 36

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 80

aagtgcgaca agaccacac ctgtcccccc tgcct

36

<210> 81

<211> 39

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 81

cccaagagct gcgactgcca cacctgtccc ccctgcct

39

<210> 82

<211> 39

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 82

cccaagagct gcgactgcac ccactgcccc ccctgccct

39

<210> 83

<211> 36

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 83

ccctgcagct gcaagcacac ctgtcccccc tgcct

36

<210> 84

<211> 36

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 84

cctagctgct gcacccacac ctgtcccccc tgcct

36

<210> 85

<211> 36

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 85

cccagctgcg acaagcactg ctgtcccccc tgcct

36

<210> 86

<211> 30

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 86

cccaagagct gcacctgtcc ccctgtcct

30

<210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> nhân tạo

<220>

<223> vùng bản lề nhân tạo

<400> 87

cccaagagct gcgataagtg cgtggagtgcccccttgct ct 42

<210> 88

<211> 448

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

420

425

430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 89

<211> 448

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 89

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 90

<211> 448

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 90

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr
210 215 220

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 91
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 91

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 92
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 92

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

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

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 93
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 93

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

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

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 94
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 94

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

His Cys Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 95
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 95

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Lys Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 96
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 96

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His

210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 97

<211> 447
 <212> PRT
 <213> chuột nhà

<400> 97

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

His Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 98

<211> 446

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 98

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 99

<211> 446

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 99

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 100
<211> 446
<212> PRT
<213> chuột nhà

<400> 100

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 101
<211> 444
<212> PRT
<213> chuột nhà

<400> 101

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

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

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 102

<211> 448

<212> PRT

<213> chuột nhà

<400> 102

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 103

<211> 1347

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 103

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60

agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcataataca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctggggggaat ctctggactg gatcggagggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gtgcaagagc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgccctg aactgctggg cggaccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtgacgt gtcccagag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgtgaagg tgtccaacaa ggcctgccca gccccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgcctctgac ctgtctgggt aagggttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagAAC aactacaaga ccaccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 104
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 104
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaAC ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcataataca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctggggggaat ctctggactg gatcggagggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240

atg gatctga gaagcctgac atccgaggac agtcagtggt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gccctgcagc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccacagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtggact gtcacacag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tgtcaacaa gccctgccg gcccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aaggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgcctctgac ctgtctgtg aagggttct acccaagcga catgccctg 1140
 gagggggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc agtgctgac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 105
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 105
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgcag cgtgaagatt 60
 agctgaaga ccagcggta catctttaca gcataacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctctc cacagcttac 240
 atg gatctga gaagcctgac atccgaggac agtcagtggt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgcgtgga gccaagtgc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggacccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgagggtg 780
 accctgtgtg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagttaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgttaagg tgtccaaca ggccctgcc gcccgaatcg aaaagacat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctgtg aagggtctt acccaagcga catgccctg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccagaa aactacaaga ccaccccc agtgcctggac 1200
 agcgacggca gtttcttct gtacagcaag ctgaccgtg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 106
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 106
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaa acctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgttaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacctg accgtcgata agtcctctt cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcctaagagc 660

tgttgcaaga cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccaccg 720
 gtgttcctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtgacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagttcaa ctgttacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgtgaagg tgtccaacaa ggccctgccg gcccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccagggttac accctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctgtg aagggttct acccaagcga catgccctg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc agtctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtcccagg caagtga 1347

<210> 107
 <211> 1346
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 107
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggtaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgtagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttgaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacac 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgcgactgca cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccaccg 720
 gtgttcctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtgacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagttcaa ctgttacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900

tacaggggtggtgtccgtgctgacctgtctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgtgaagg tgtccaacaa ggccctgccac gccccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
aaggggccagc caagagagcc ccaggtgtac acctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggtctct acccaagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgacctgg acaagagcag atggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgtctc cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag 1320
agcctgagcc tgtccccagg caagtg 1346

<210> 108
<211> 1347
<212> ADN
<213> chuột nhà

<400> 108
gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatalacca tgcactgggt gaggcagagt 120
ctgggggaat ctctggactg gatcggagggt attaaagcca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtcagtggt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgacctctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacctg gtcttgaac 480
agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gacctgtcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
tgcgacaagt gccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccagc 720
gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac acctgatga tcagcagaac ccccaggtg 780
acctgtgtgg tgggtggactg gtccacagag gaccagagg tgaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
tacaggggtggtgtccgtgctgacctgtctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgtgaagg tgtccaacaa ggccctgccac gccccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
aaggggccagc caagagagcc ccaggtgtac acctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080

aagaaccagg tgccctgac ctgtctggtg aagggttctt acccaagcga catgccgtg 1140
 gaggggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gtttcttct gtacagcaag ctgacctgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgccccagg caagtga 1347

<210> 109
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 109
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctctc cacagcttac 240
 atggaatga gaagcctgac atccgaggac agtgcaagt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcaactgac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgtagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gtcgctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacctg gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgagc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtgtt gaccgtgctt agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgcgacaaga cccactgctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtgacgt gtccacagag gaccagagg tgaagtcaa ctgttacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgtt gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tgtcaacaa ggcctgcca gcccaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac acctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgccctgac ctgtctggtg aagggttctt acccaagcga catgccgtg 1140
 gaggggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gtttcttct gtacagcaag ctgacctgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320

agcctgagcc tgtccccagg caagtga

1347

<210> 110

<211> 1341

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 110

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60

agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120

ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180

aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240

atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc ccggtctgag 300

atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360

accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420

gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540

tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gaagtgcgac 660

aagaccaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tggcgggacc cagcgtgttc 720

ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gagtggaagt tcaactgga cgtggacggc 840

gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900

gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960

aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020

cagccaagag agccccaggt gtacacctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140

gagagcaacg gccagcccgga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1200

ggcagcttct tcctgtacag caagtgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260

gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320

agcctgtccc caggcaagtg a

1341

<210> 111

<211> 1344

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 111

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctggggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gcgcacctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttgaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgcgactgcc acacctgtcc cccctgcctt gccctgaac tgctgggcgg acccagcgtg 720
 ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtaca cagcacctac 900
 aggggtggtg ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgtaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaag agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccacca gcaggaggga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1260
 aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt cccagggcaa gtga 1344

<210> 112

<211> 1344

<212> ADN

<213> chuột nhà

<400> 112

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120

ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc cgggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgtagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgcctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc cgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgagc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tggactgca cccactgccc cccctgccct gcccctgaac tgctgggagg acccagcgtg 720
 ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgagtgacc 780
 tgtgtggtgg tggacgtgc ccacaggac ccagaggta agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtaca cagcacctac 900
 aggggtggtg cgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgtaagggtg ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 gccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccacca gcaggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1260
 aacgtgttca gctgctcctg gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccccaggcaa gtga 1344

<210> 113
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 113
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcataacca tgactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc cgggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360

accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgccttgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgttgt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagtgga gccctgcagc 660
 tgcaagcaca cctgtcccc ctgcctgtcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtgtgtgtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactgta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtgtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aagggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccg gaacaactac aagaccaccc cccagtgtct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcagaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 114
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 114
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcggcag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcataacca tgactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctctc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcaagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgccttgt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540

tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcctagctgc 660
 tgcaccaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactgta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgtgt ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcagaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 115
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 115
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggfta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgacctctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacctg gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccagctgc 660
 gacaagcact gctgccccct ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactgga cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcca gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccg gaacaactac aagaccaccc cccagtgtgt ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgagggc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 116
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

<400> 116
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggaac agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcacaag cggcggaaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaactga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgacactgtc cccctgttc tggccctgag ctgctgggag gaccagcgt gttcctgttc 720
 cccccaagc ccaaggacac cctgatgac agcagaaccc ccgaggtgac ctgtgtggtg 780
 gtggacgtgt cccacagga cccagaggtg aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggtg 960

tccaacaagg cctgccagc cccaatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca 1020
 agagagcccc aggtgtacac cctgccaccc agcagggagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccag tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttctgt acagcaagct gaccgtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260
 agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320
 tccccaggca agtga 1335

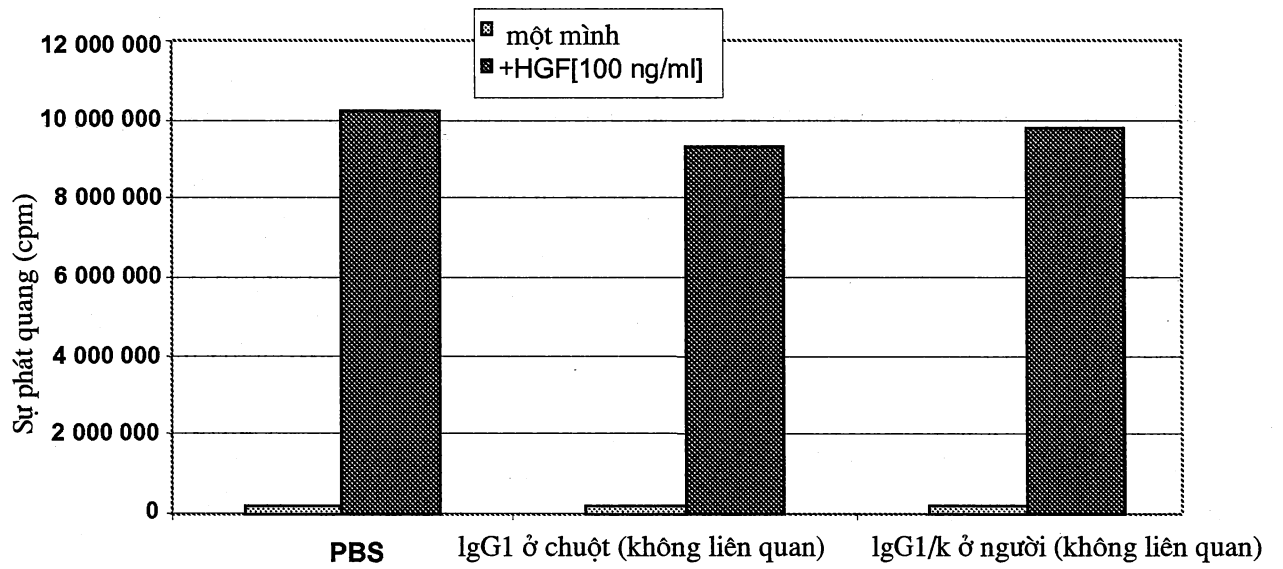
<210> 117
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> chuột nhà

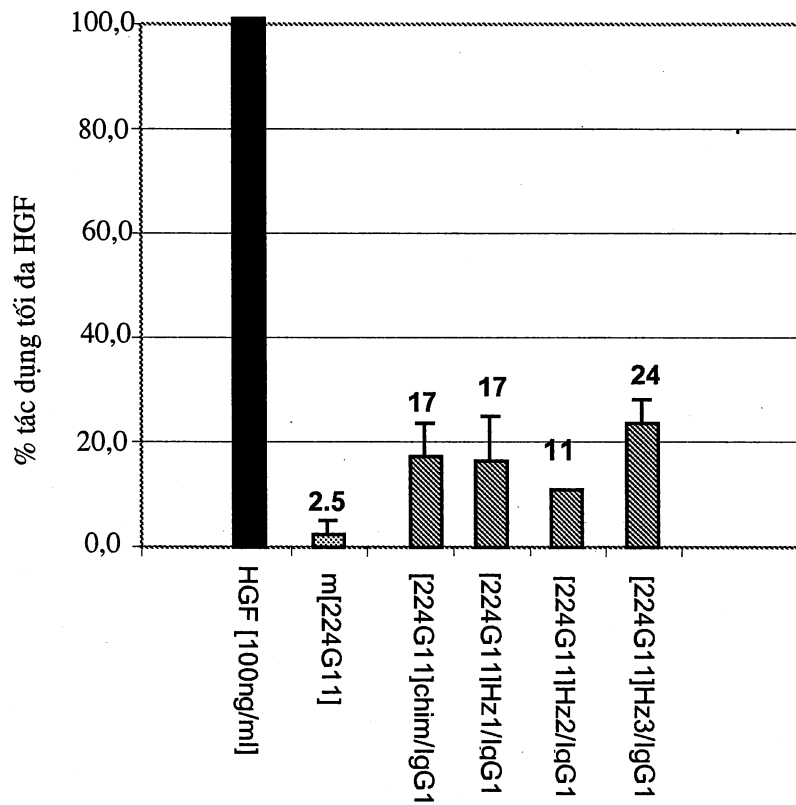
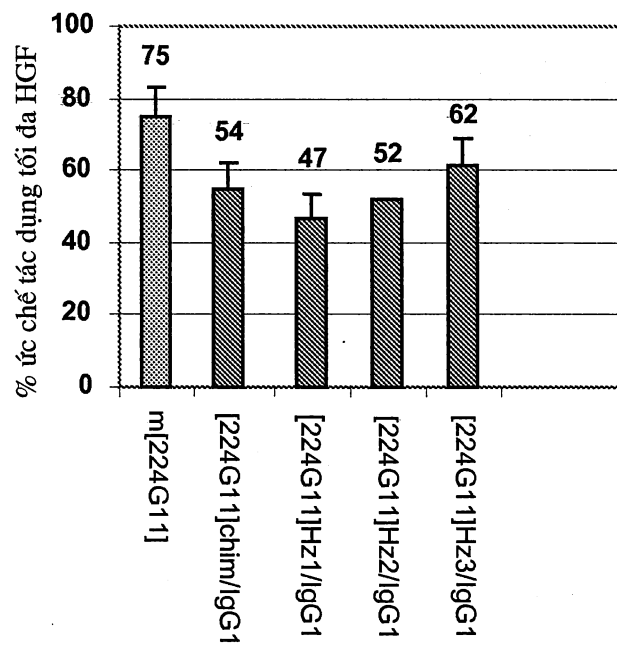
<400> 117
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctgggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctggggggaat ctctggactg gatcggagggt attaaagcca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc cgggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcacaag cggcggaaca 420
 gccgcctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccaagagc 660
 tgcgataagt gcgtggagtg cccccctgt cctgccccctg agctgctggg cggacccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 accgtgtgg tgggtggacgt gtccacag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgtagg tgtccaacaa ggccctgccg gcccaatcg aaaagacat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggttct acccaagcga catgccctg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc agtgcctggac 1200

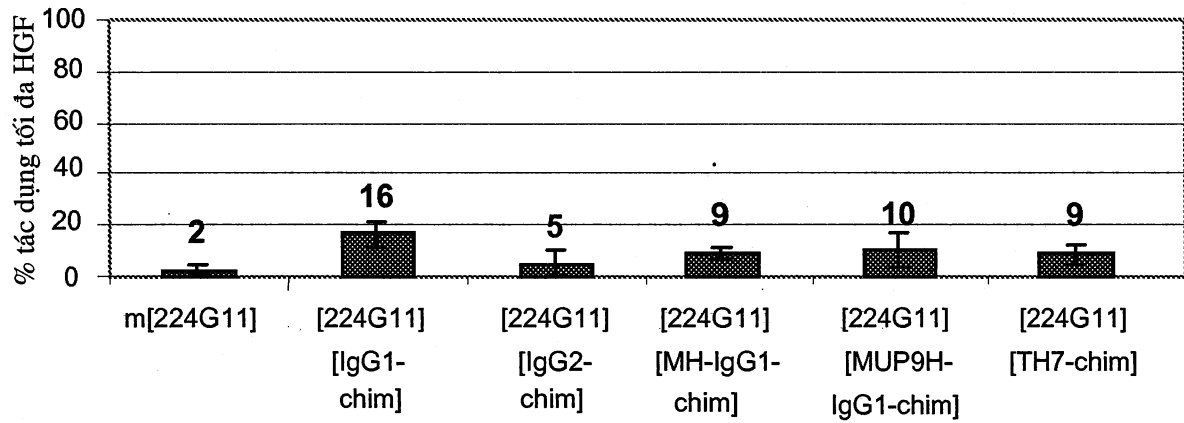
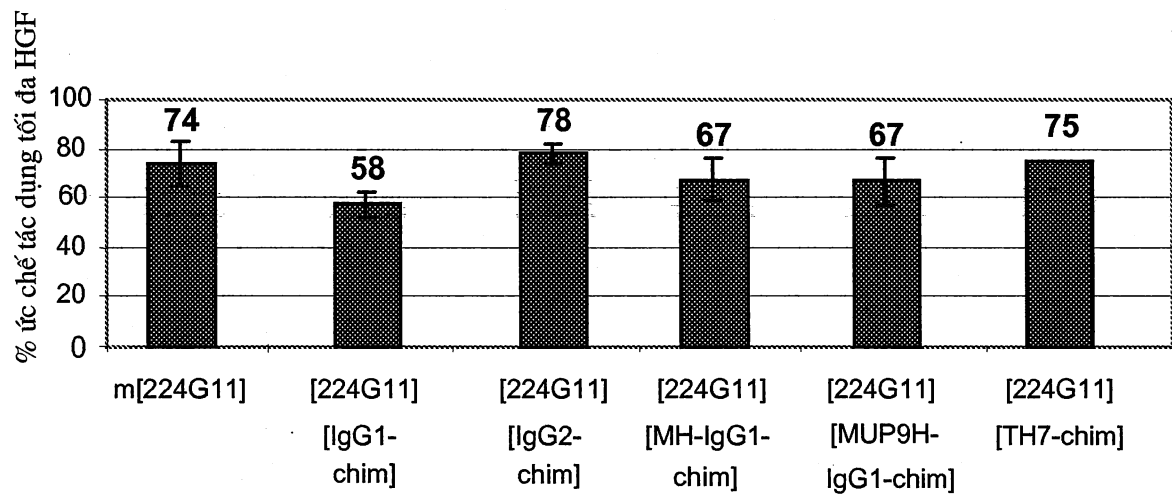
agcgacggca gcttttcct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260

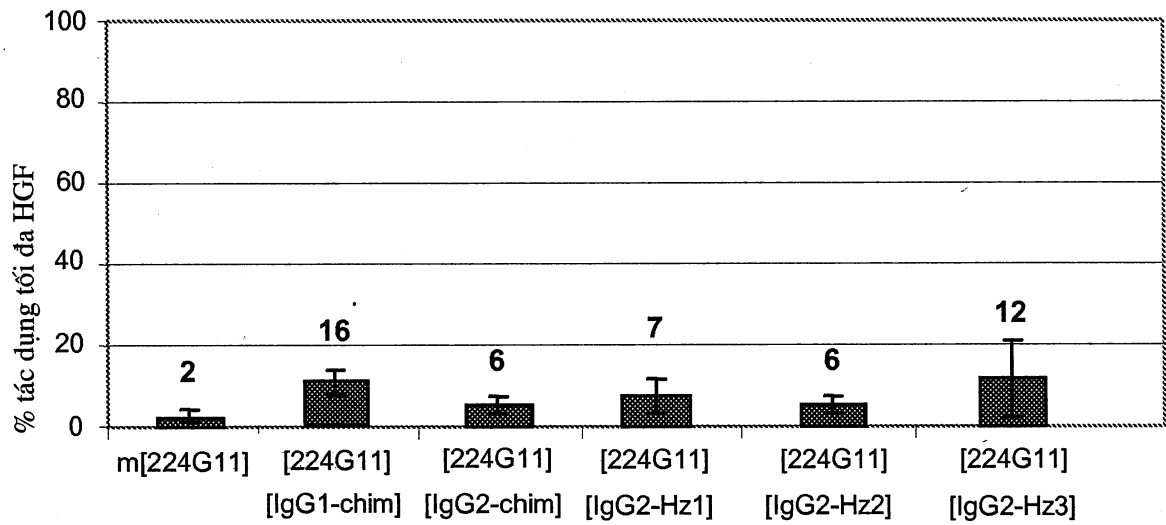
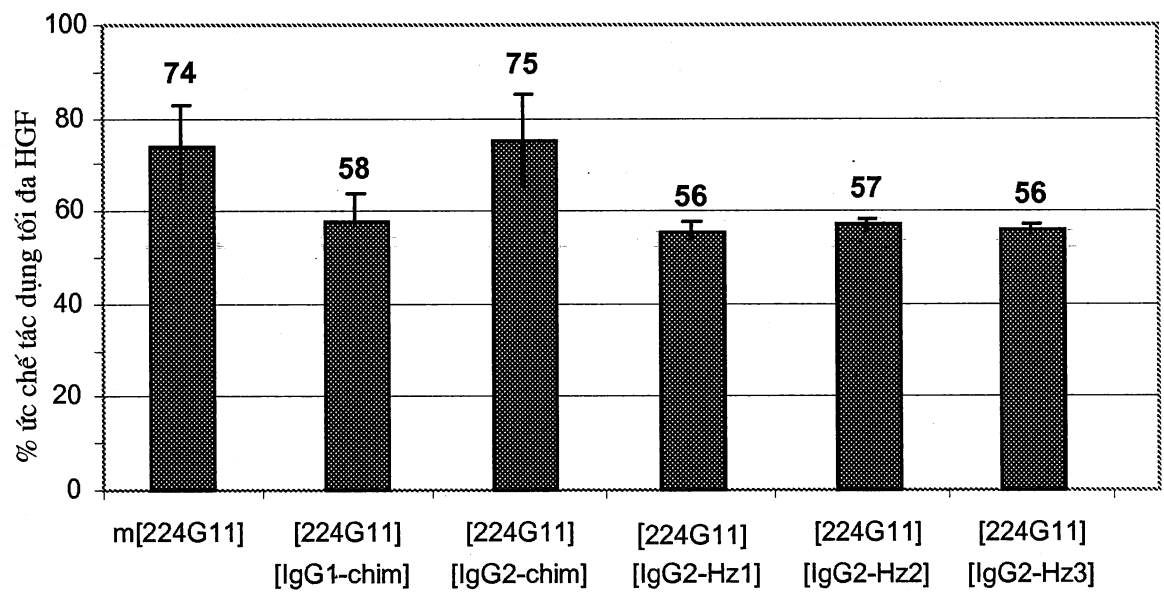
ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320

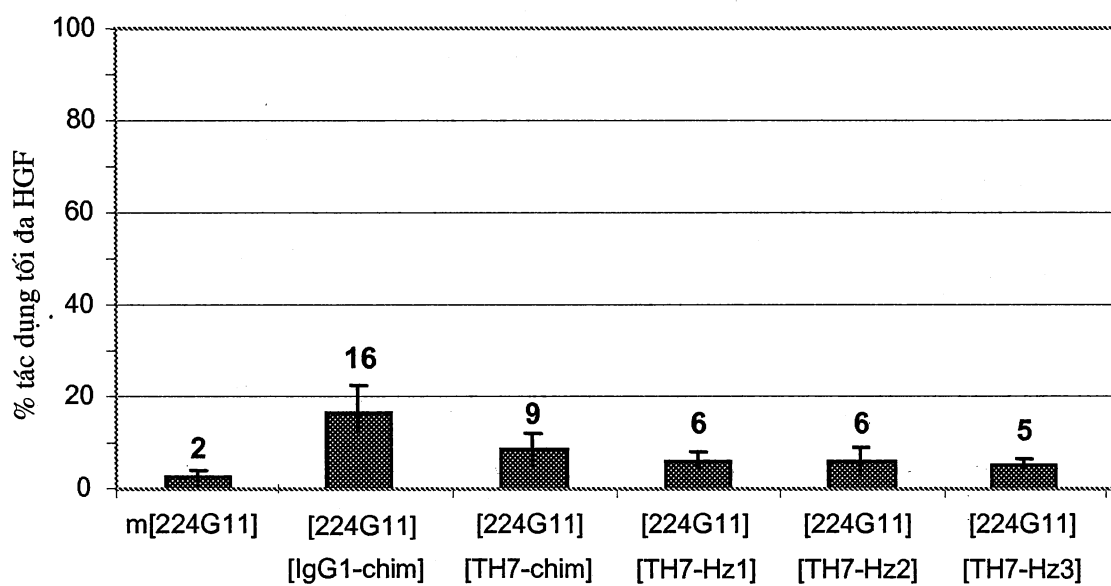
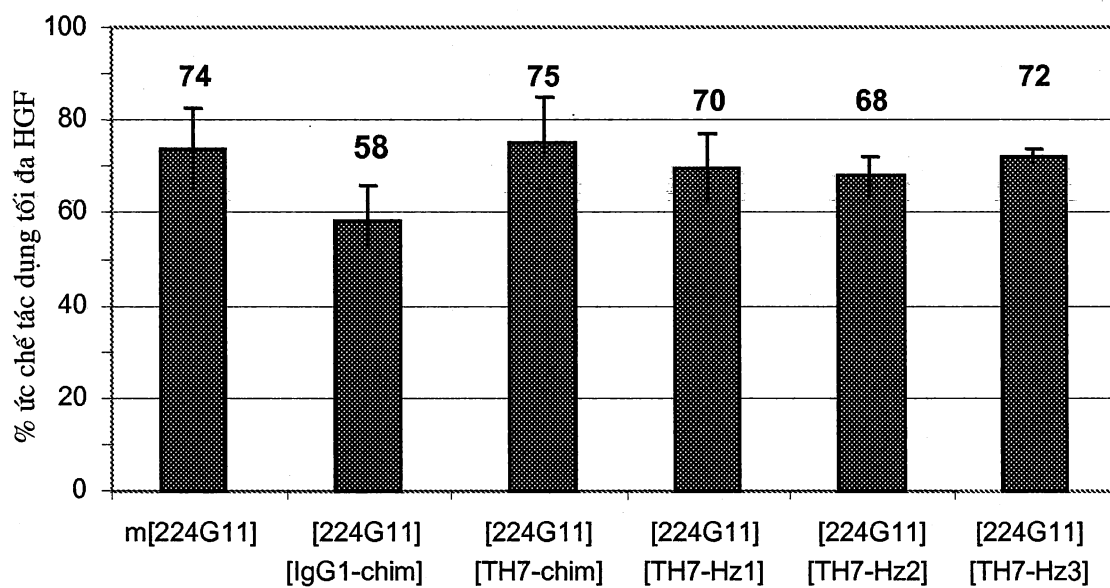
agcctgagcc tgtcccagg caagtga 1347

**Fig.1**

**Fig.2A****Fig.2B**

**Fig.3A****Fig.3B**

**Fig.4A****Fig.4B**

**Fig.5A****Fig.5B**

19647

6/35

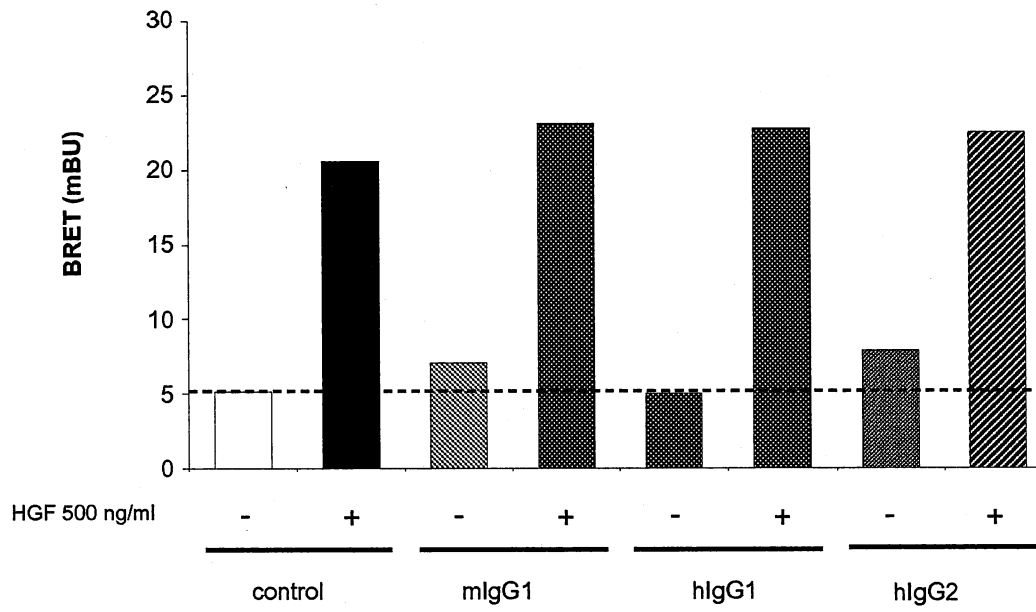


Fig.6A

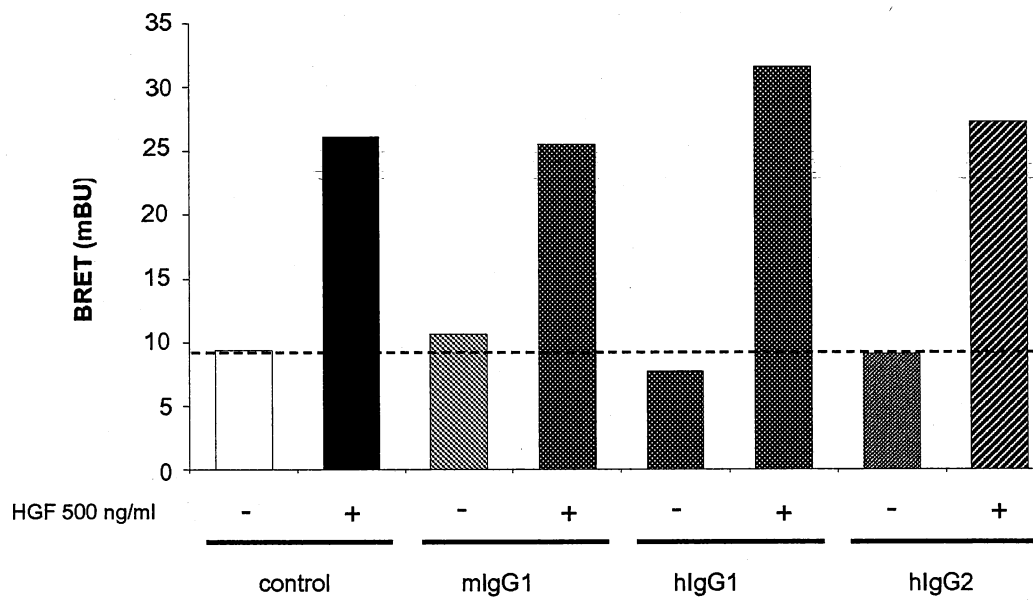
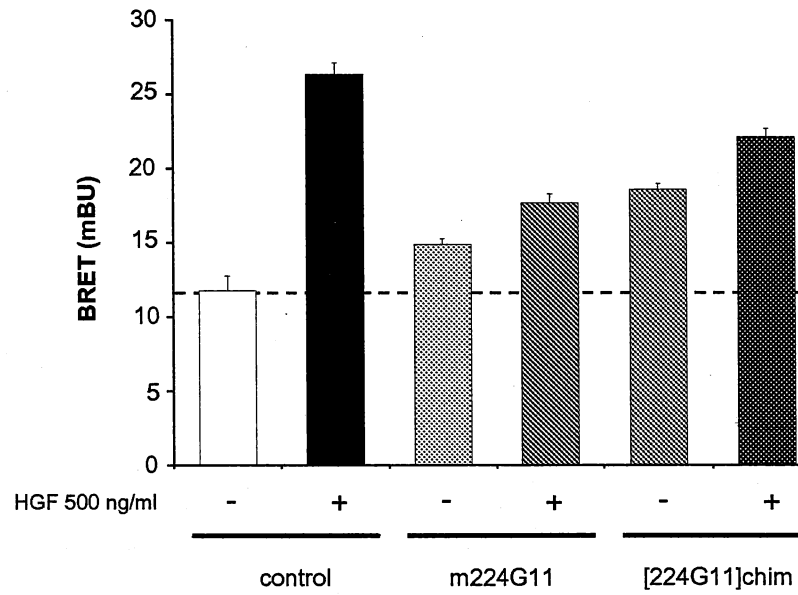
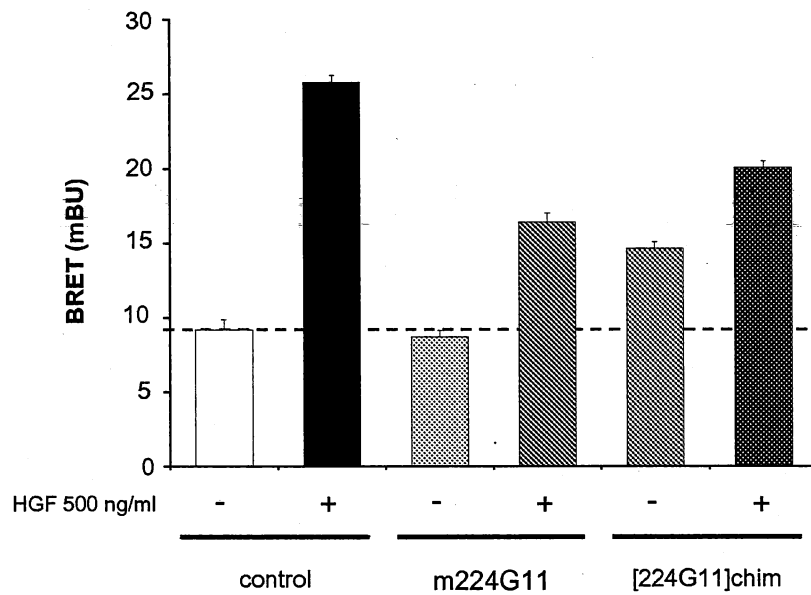
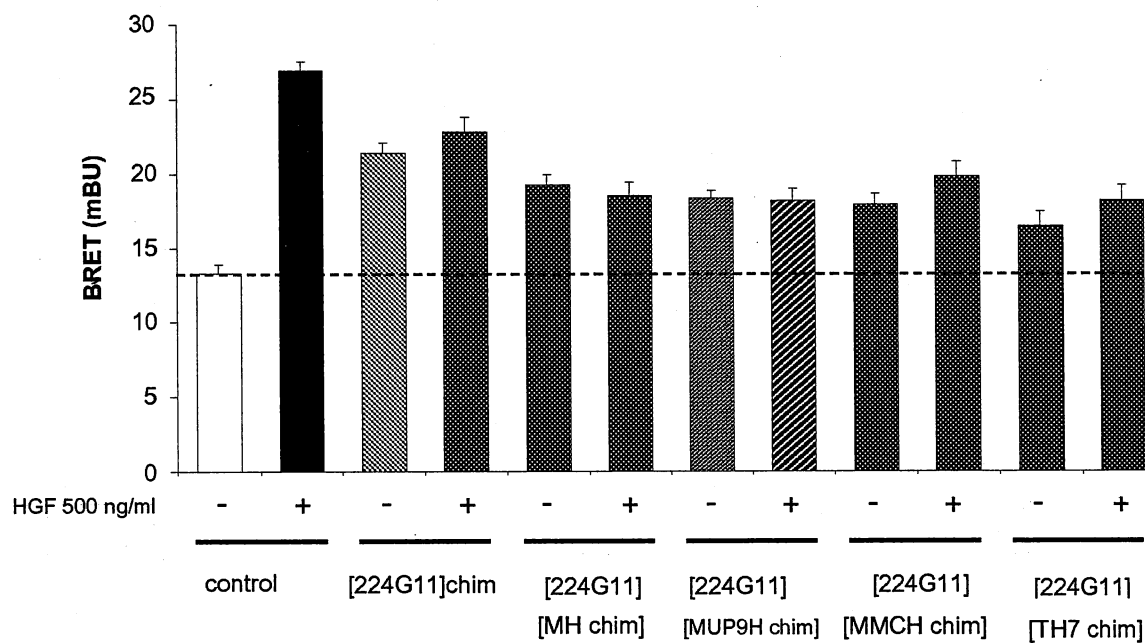
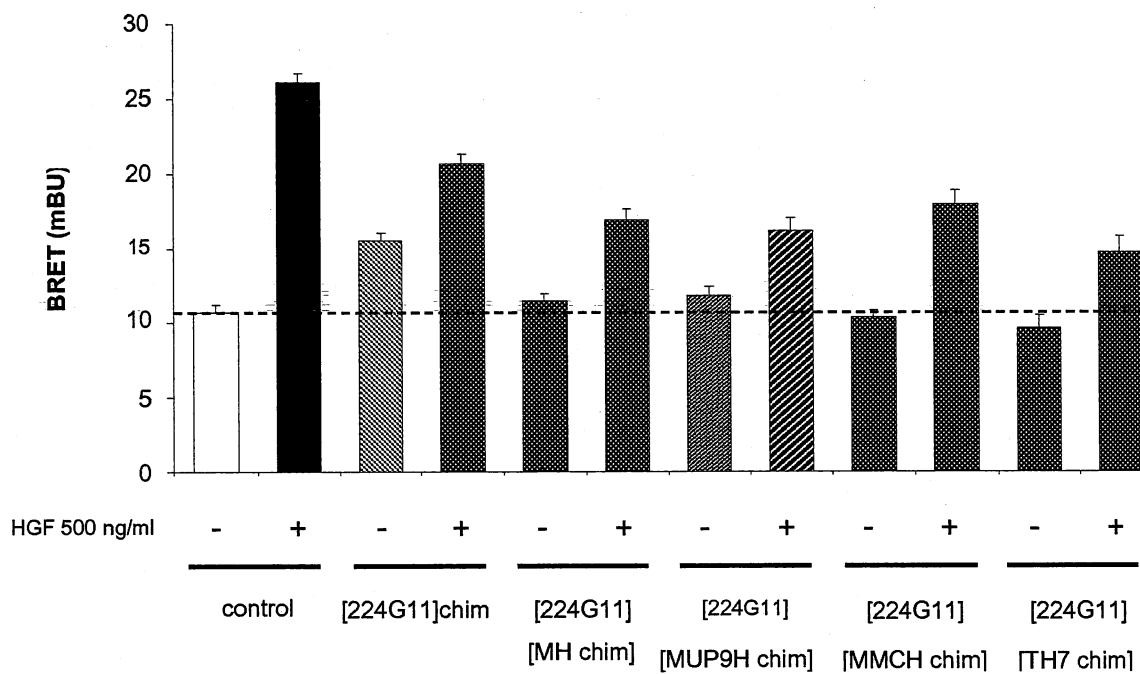
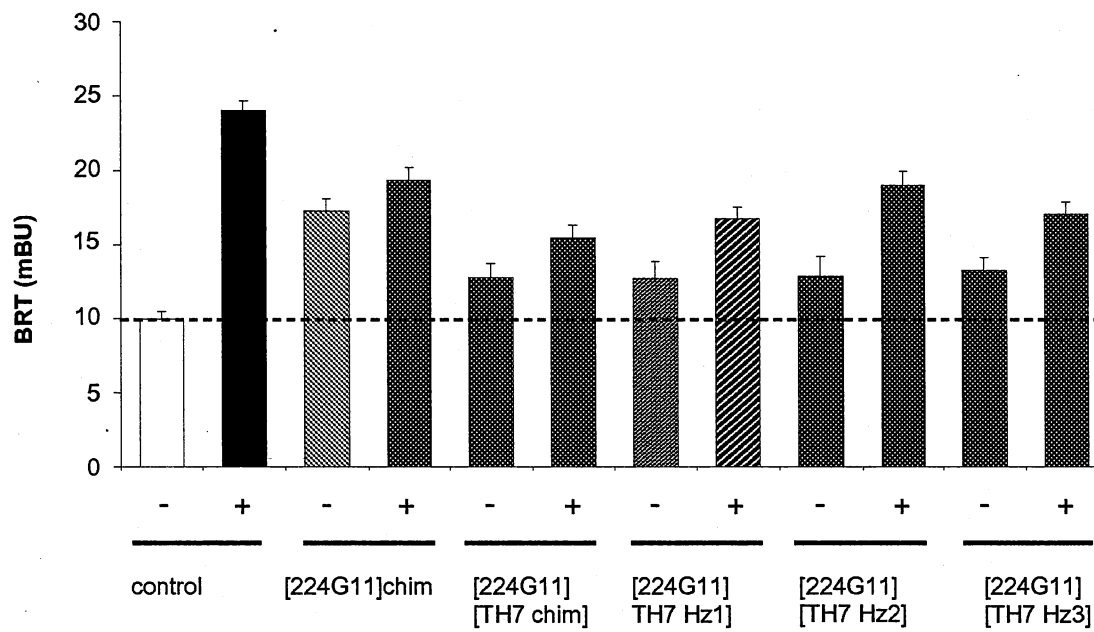
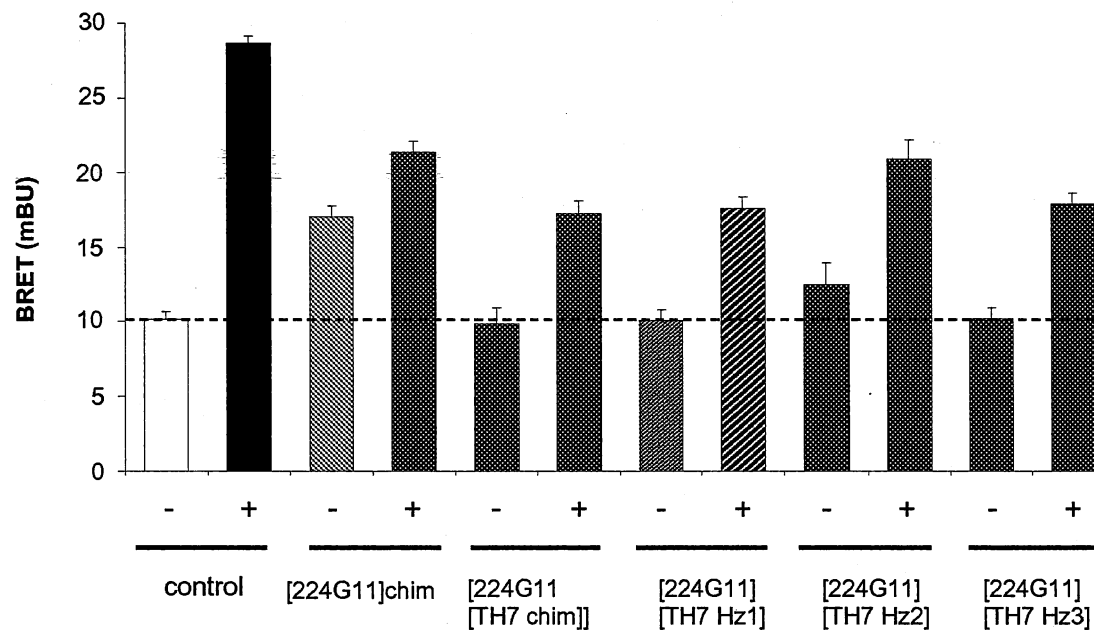
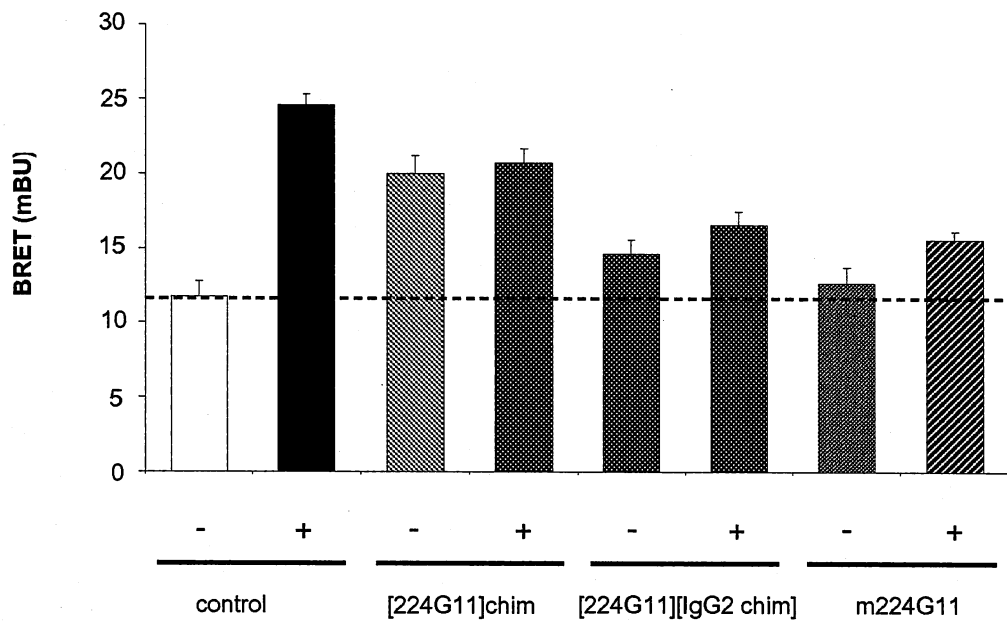
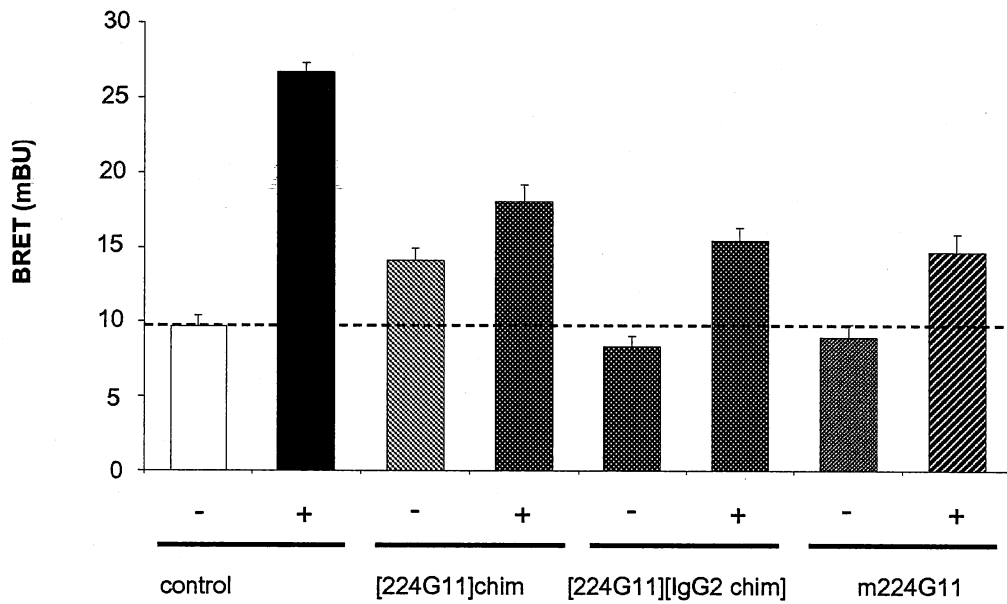


Fig.6B

**Fig.7A****Fig.7B**

**Fig.8A****Fig.8B**

**Fig.9A****Fig.9B**

**Fig.10A****Fig.10B**

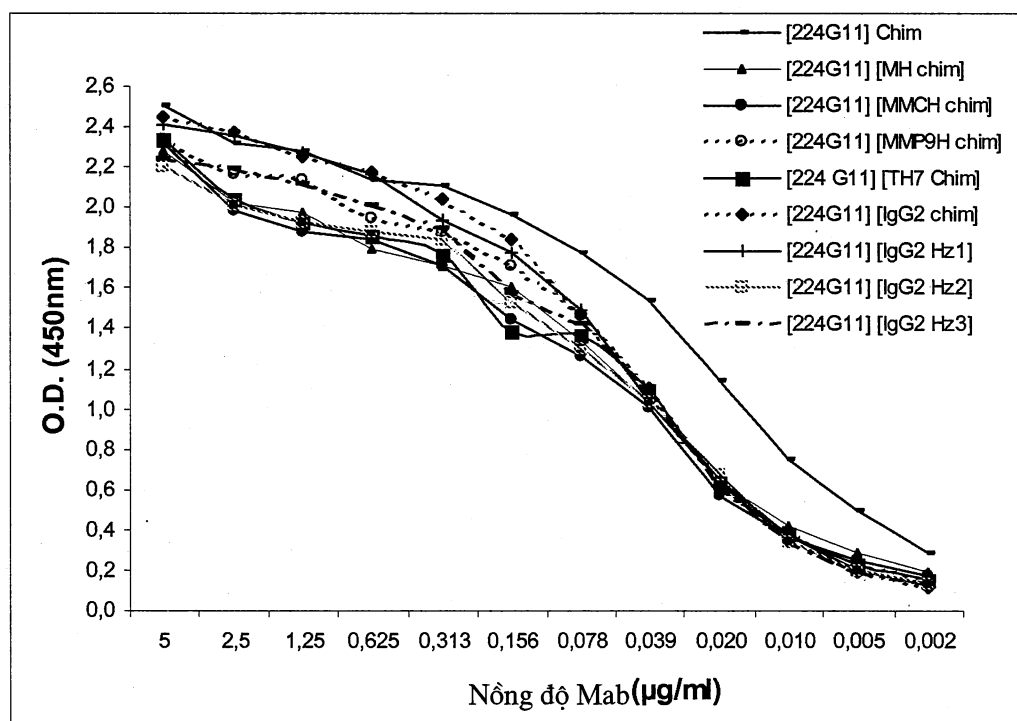
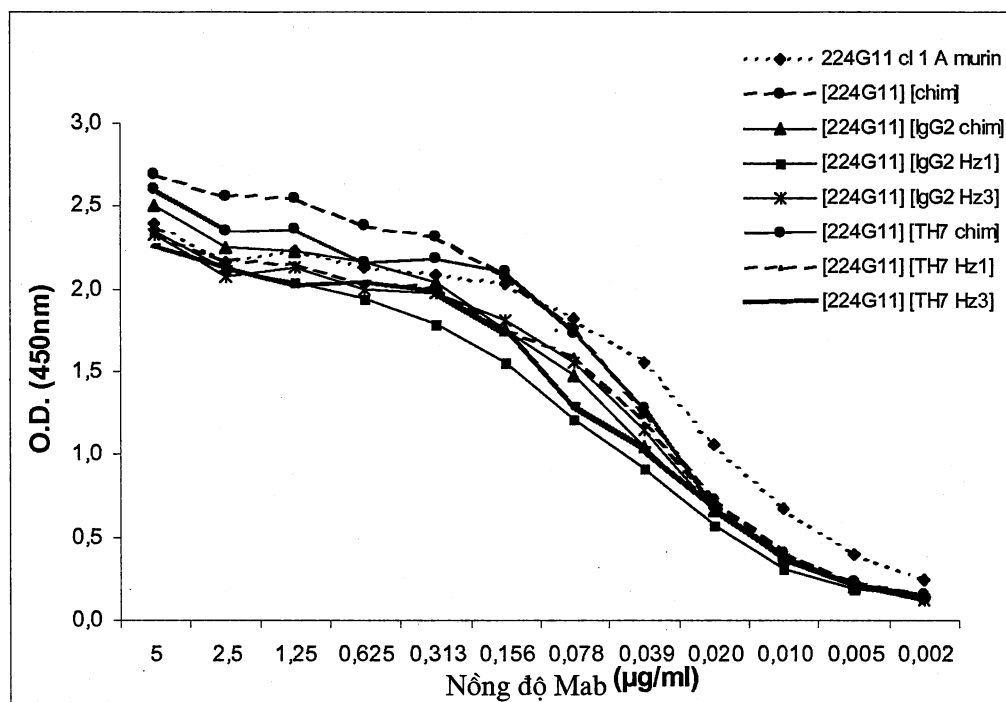


Fig.11

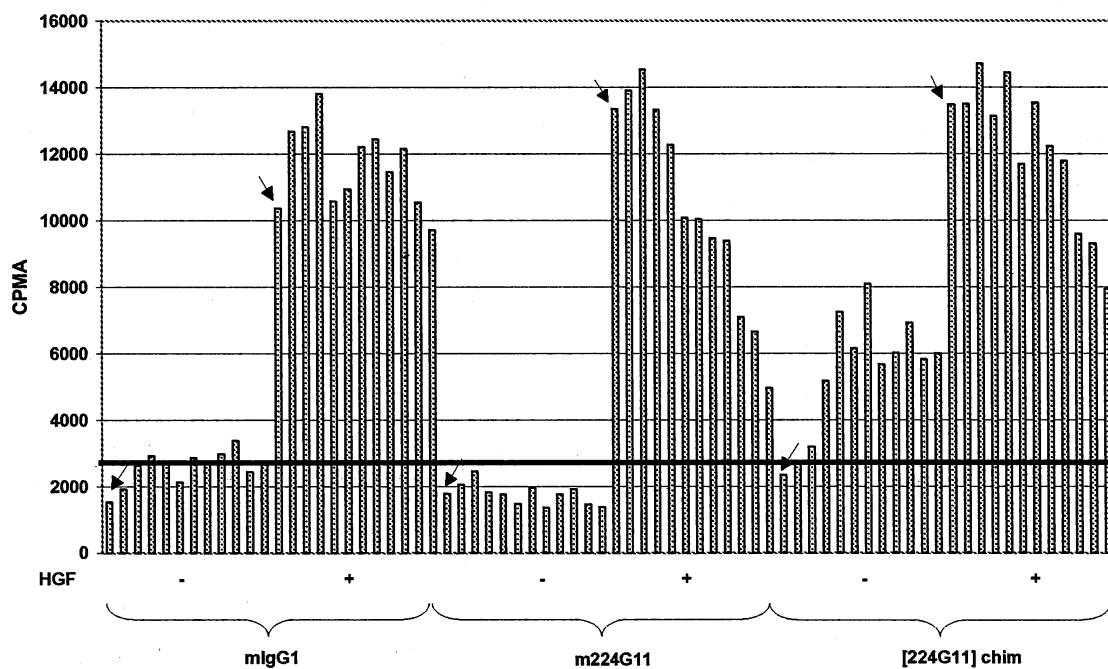


Fig.12

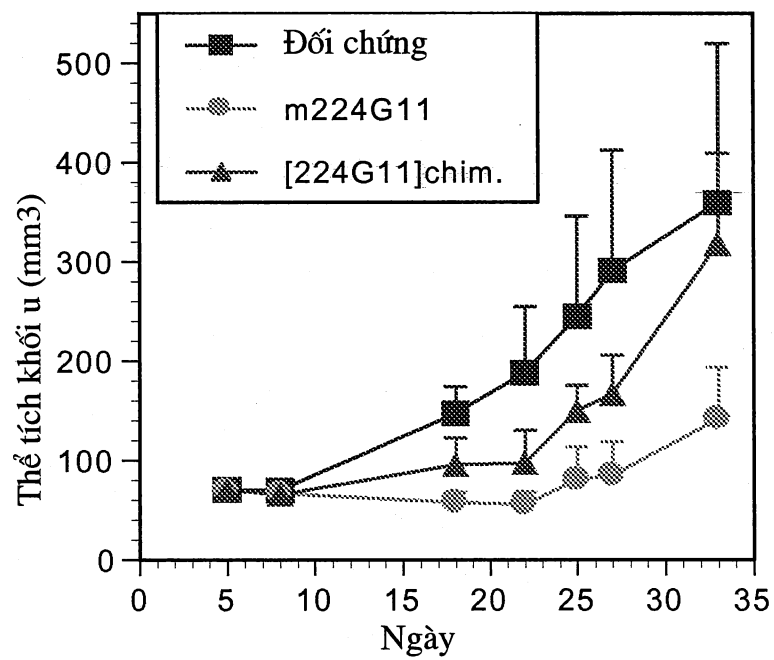


Fig.13

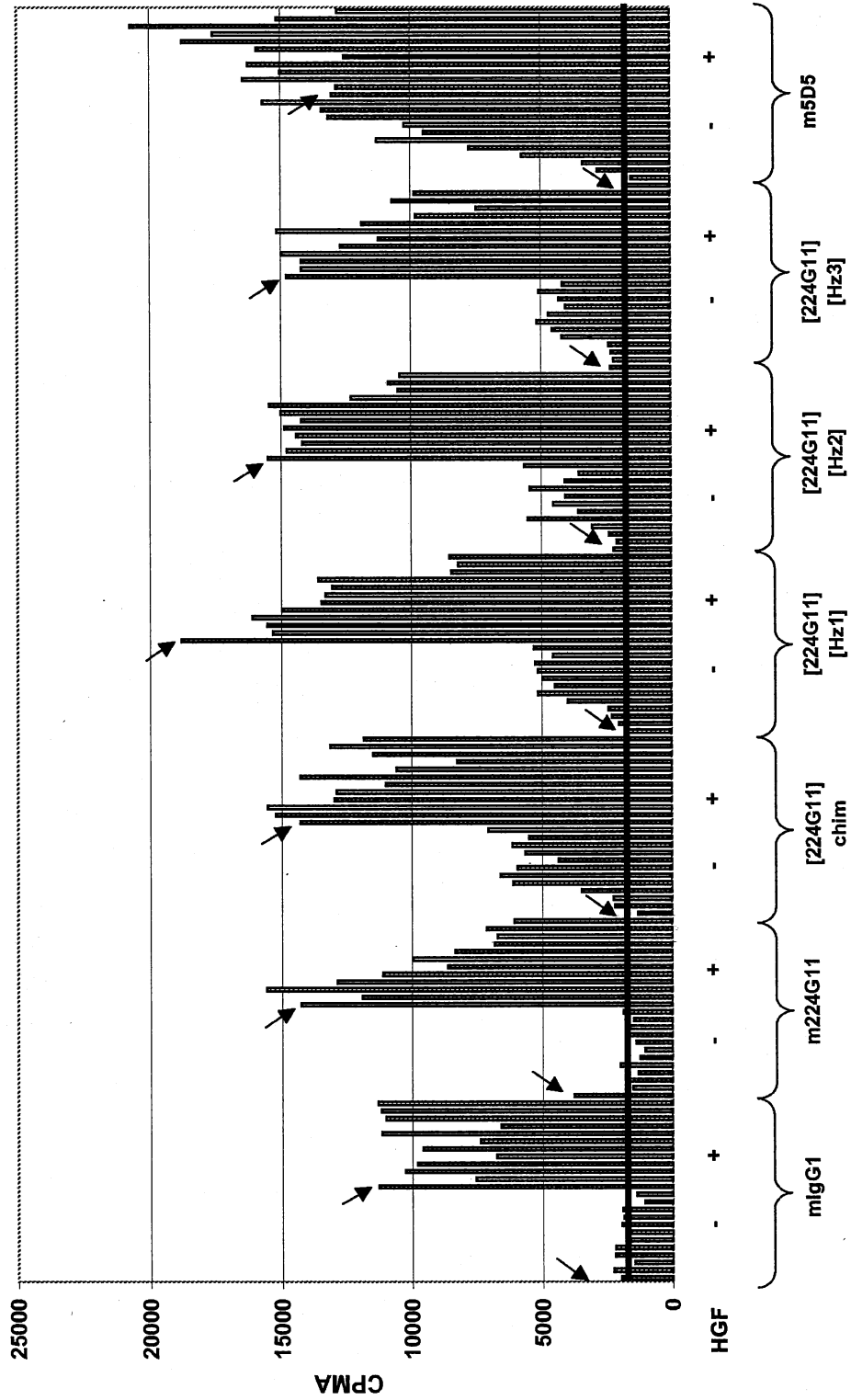


Fig.14A

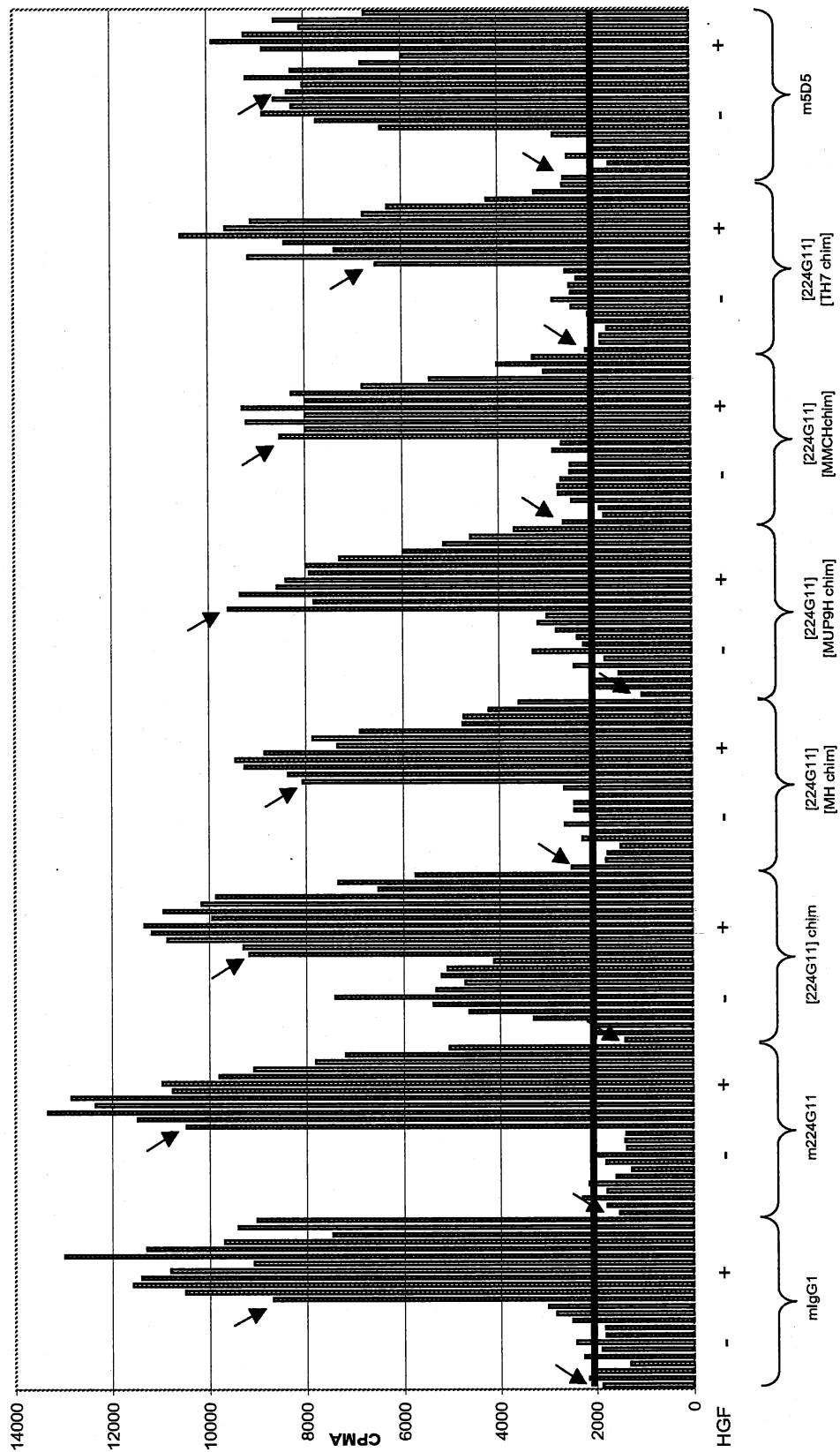


Fig.14B

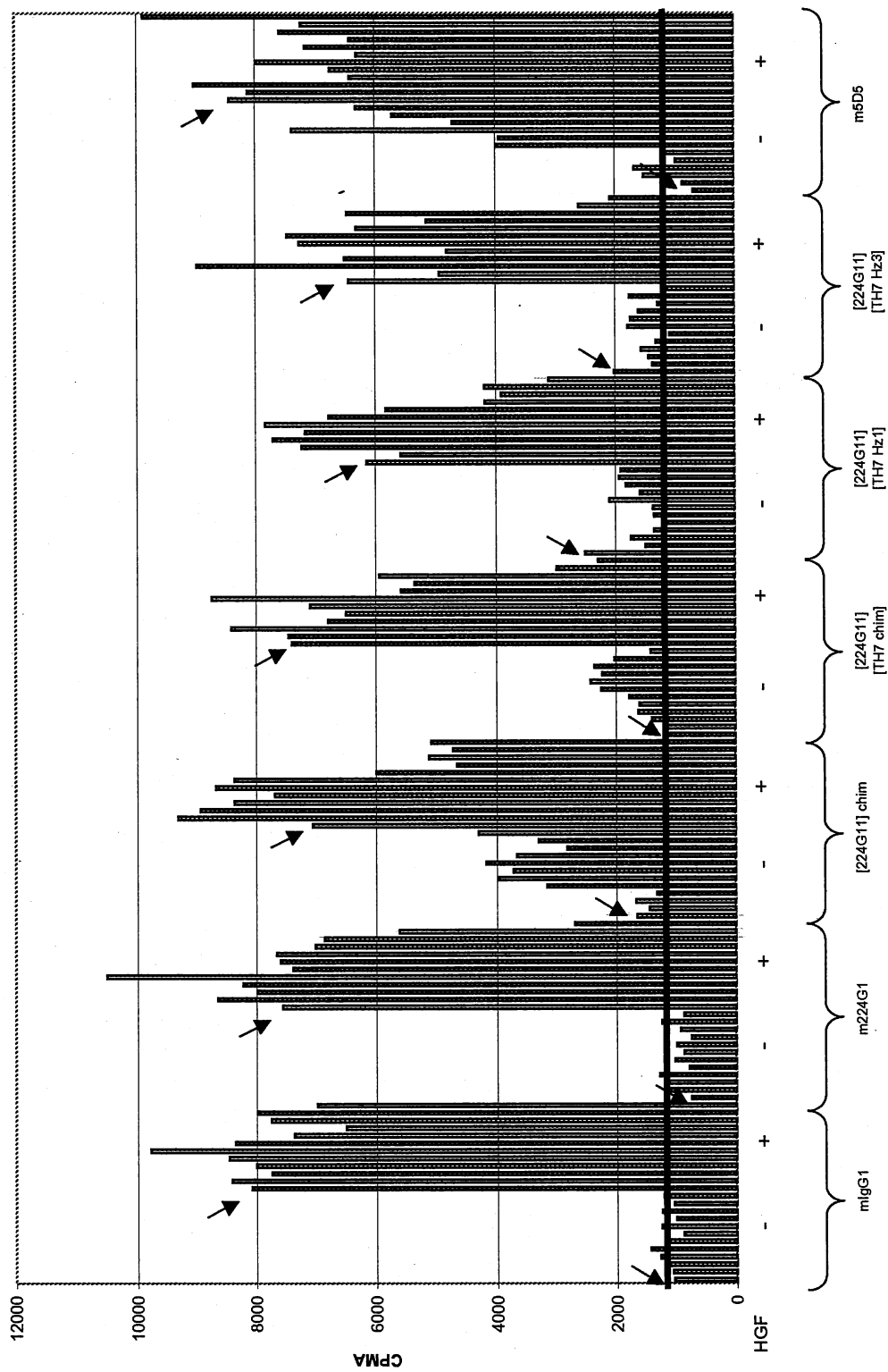


Fig.15

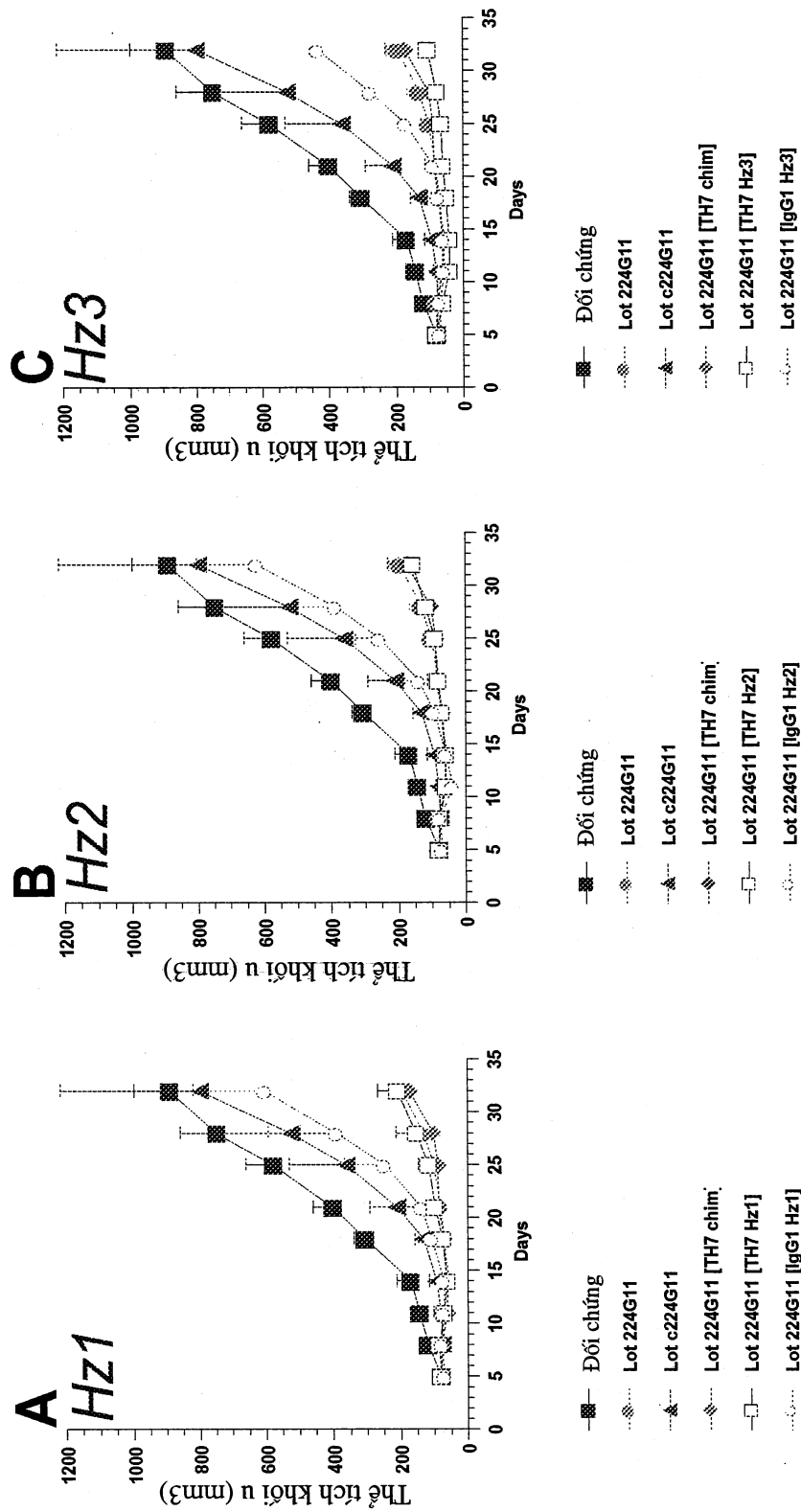


Fig.16

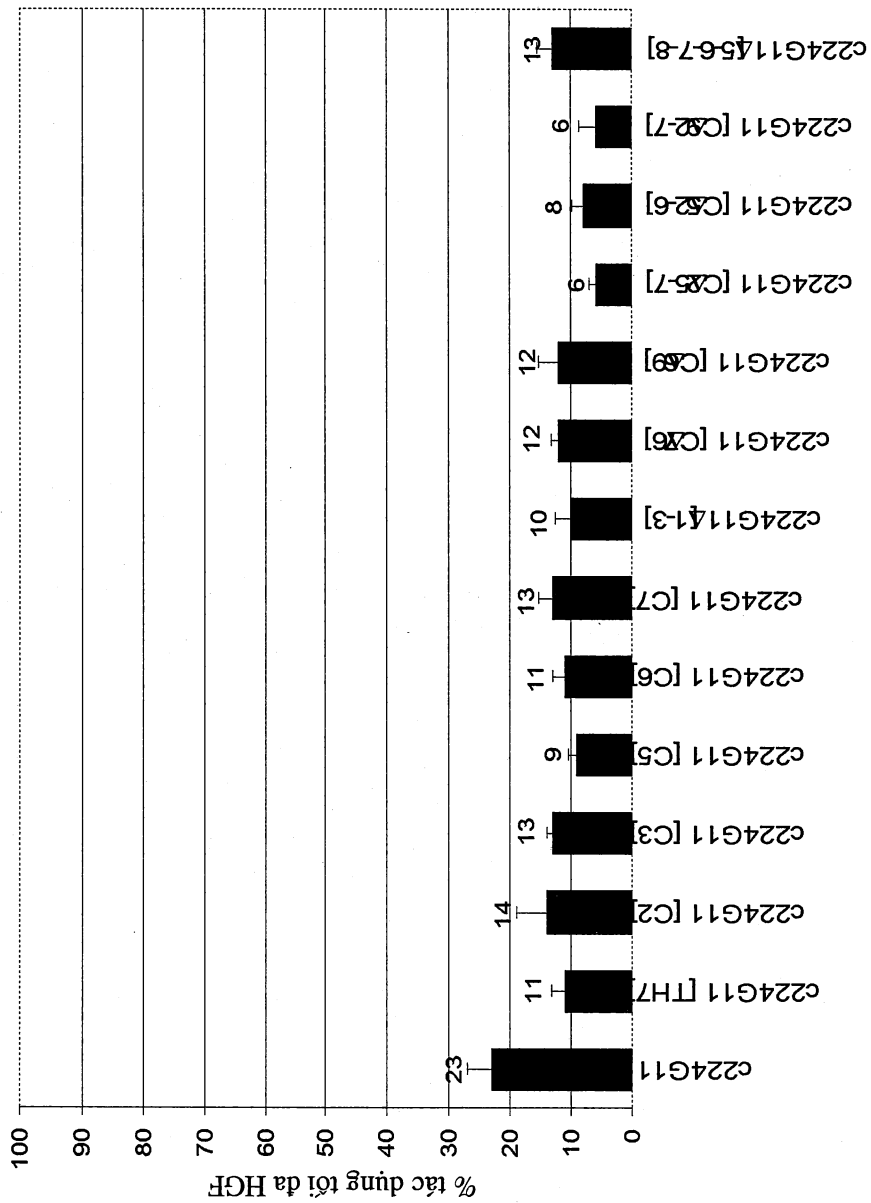


Fig.17A

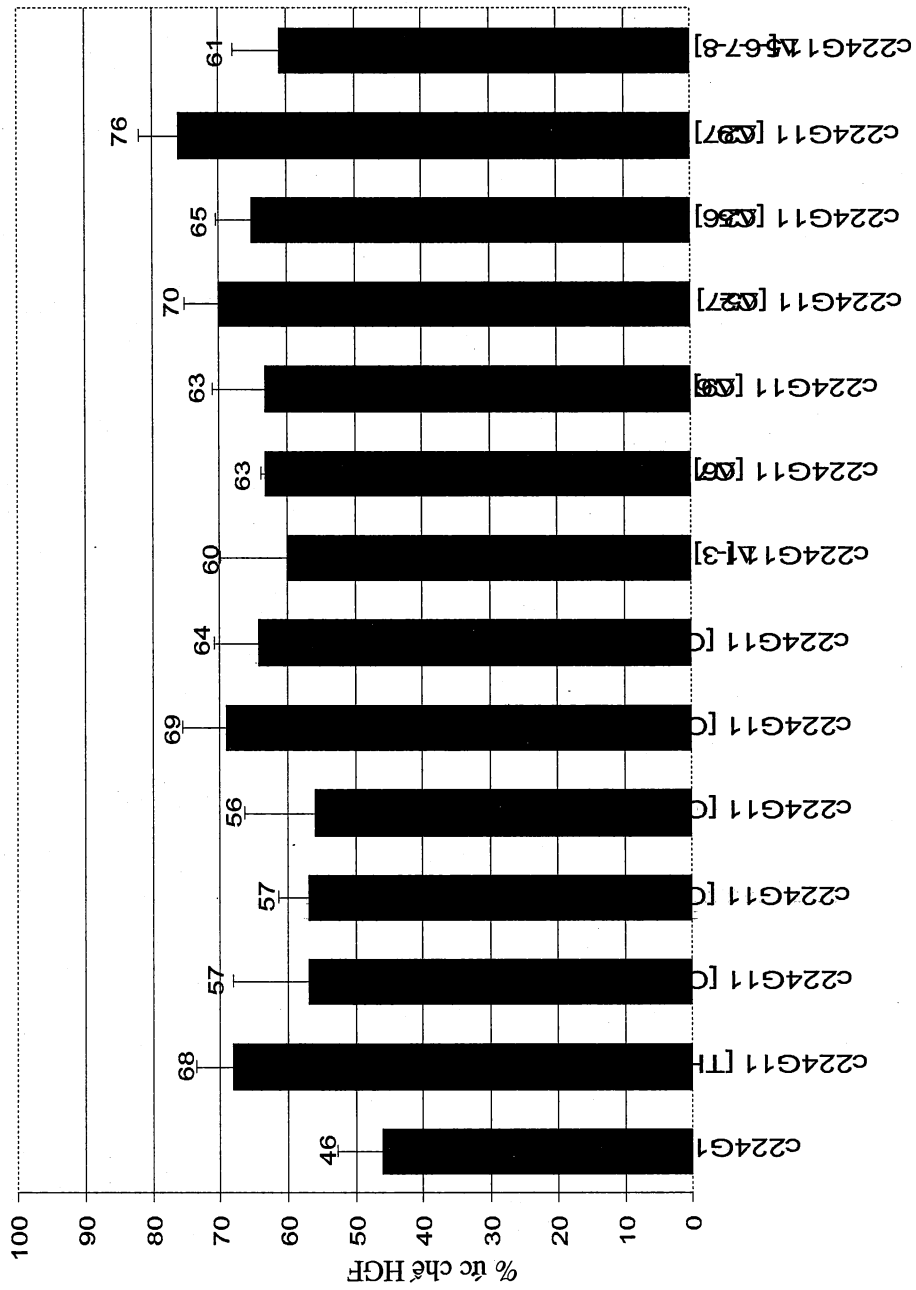
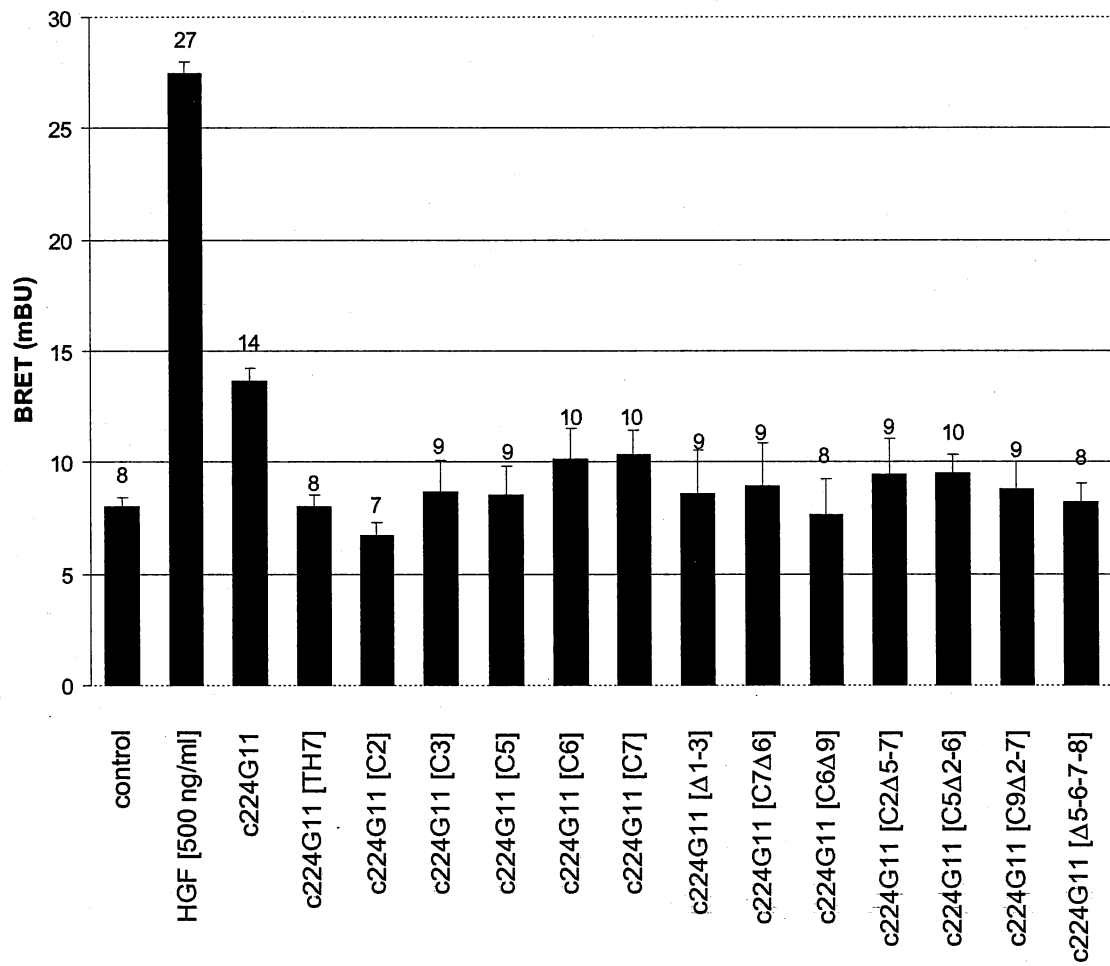
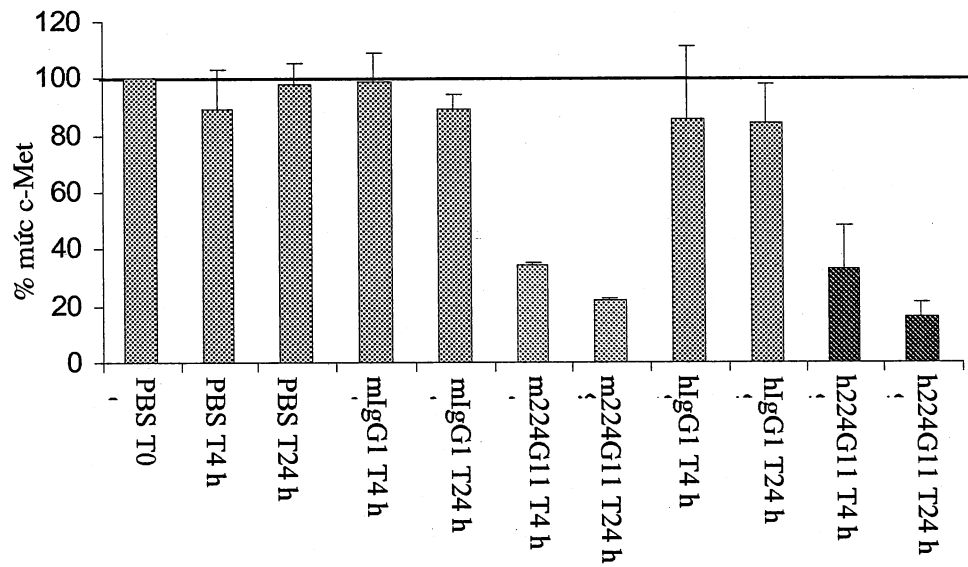
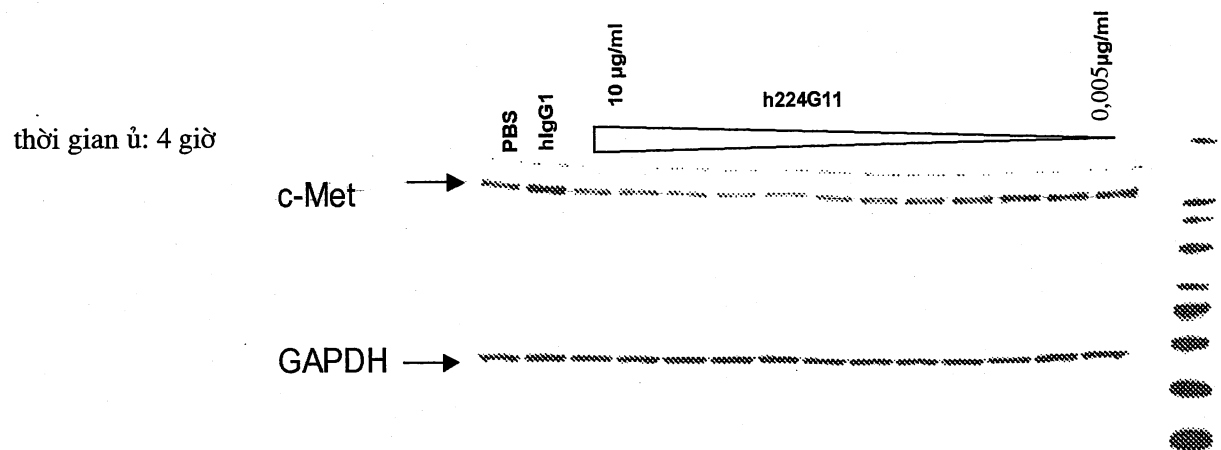
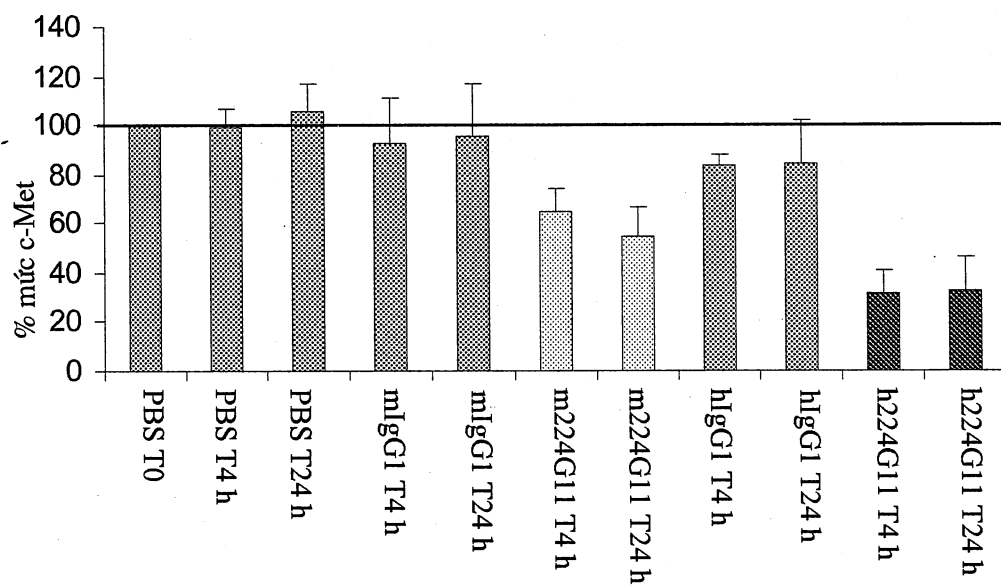
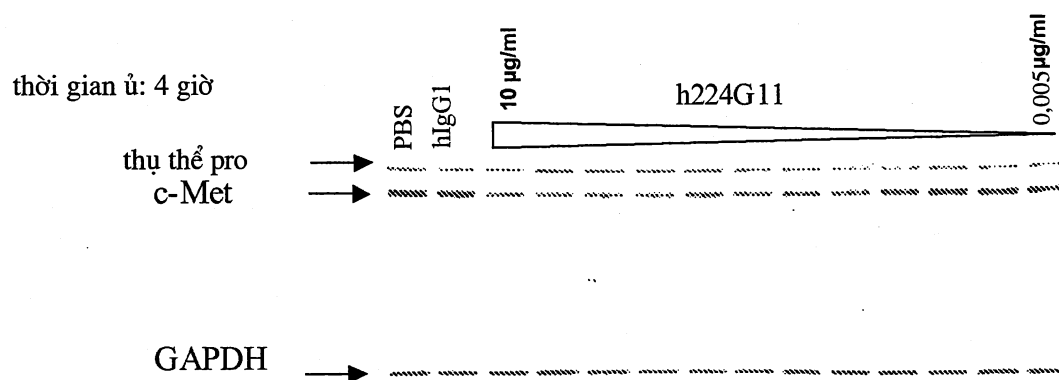


Fig.17B

**Fig.18**

A**B****Fig.19**

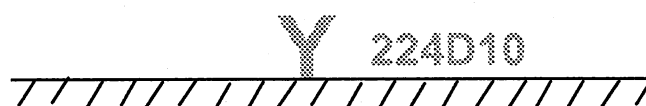
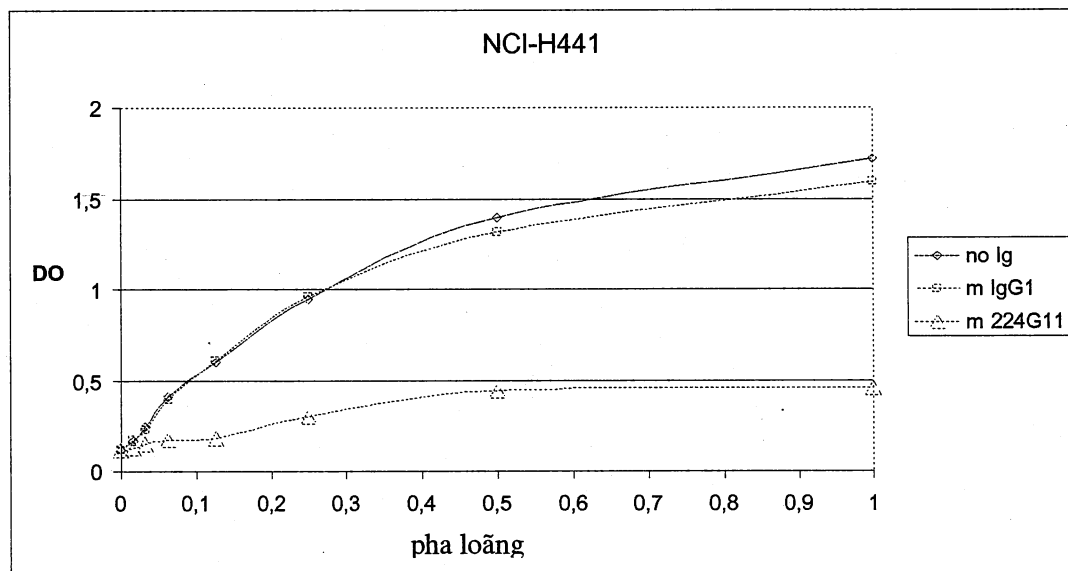
A**B****Fig.20**

ELISA

kháng hFc đã tiếp hợp HRP :

Đối chứng dương:
c-Met monome

hoặc

Thử nghiệm:
Dịch nổi tế bào**Fig.21****Fig.22**

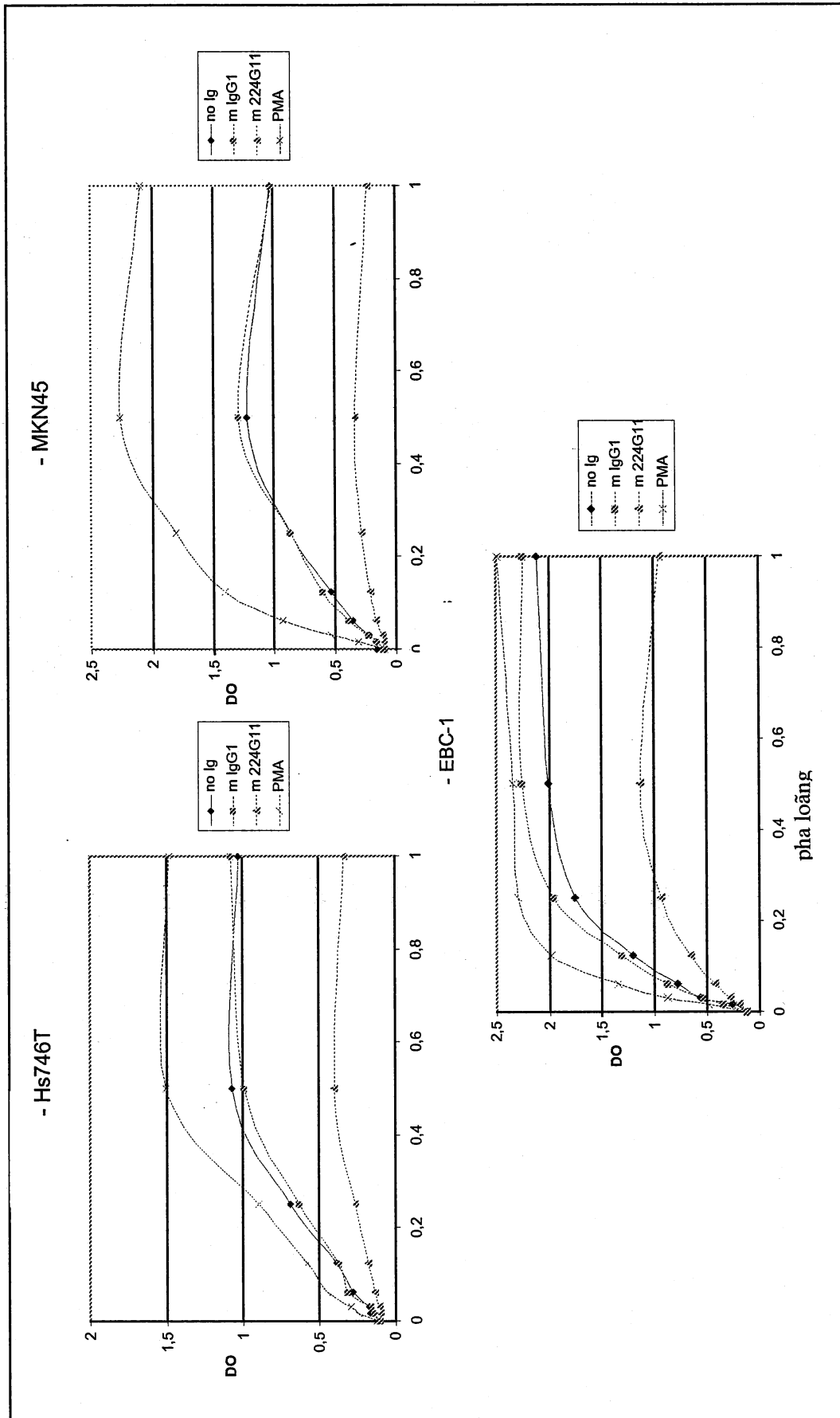


Fig.23

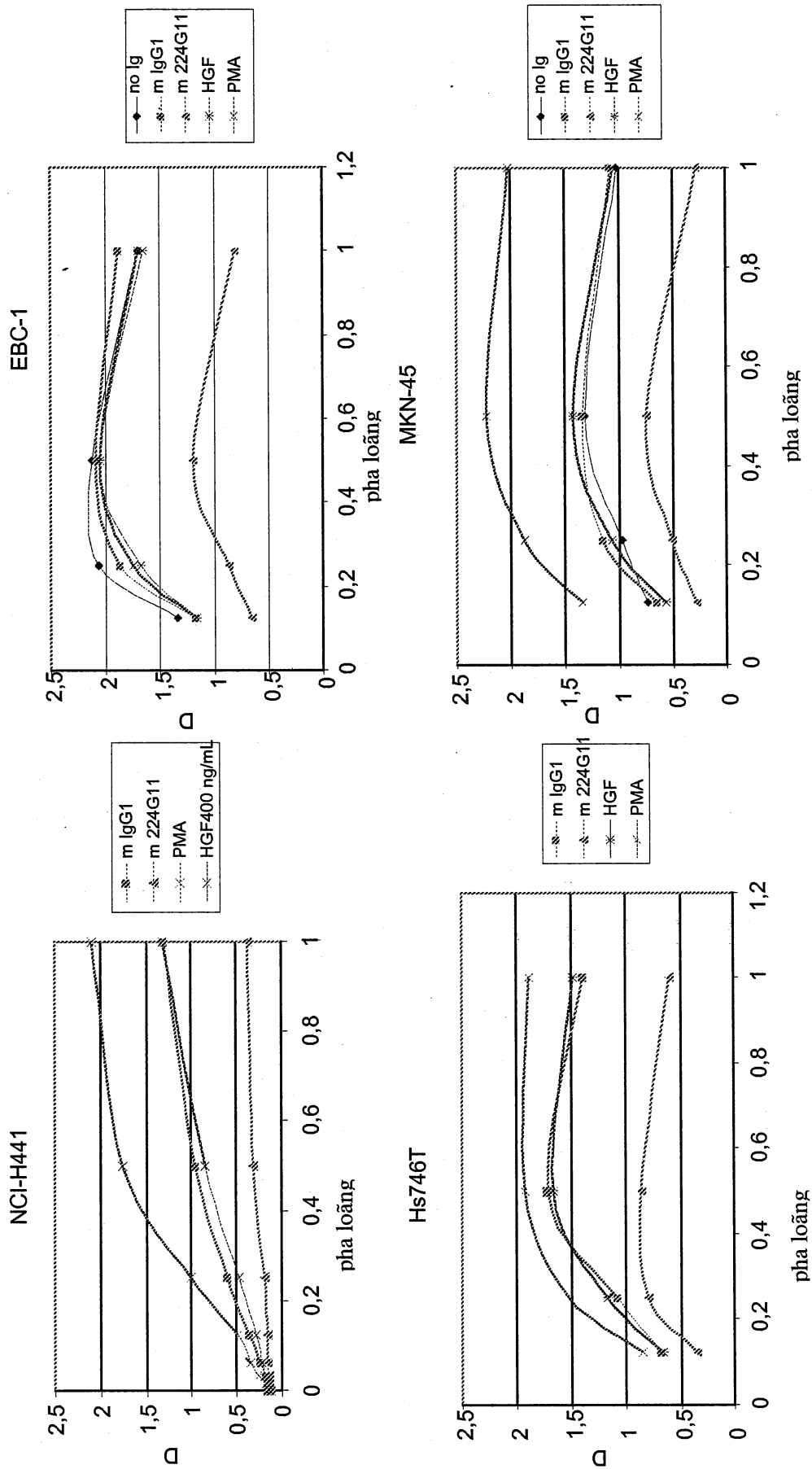


Fig.24

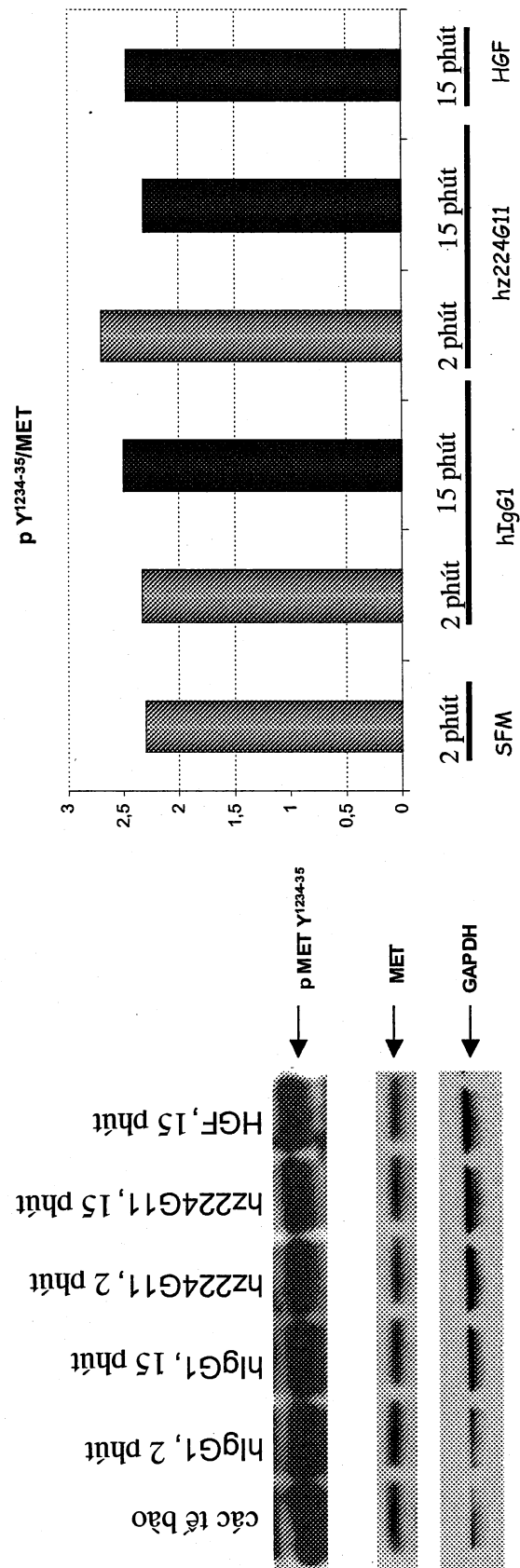


Fig.25

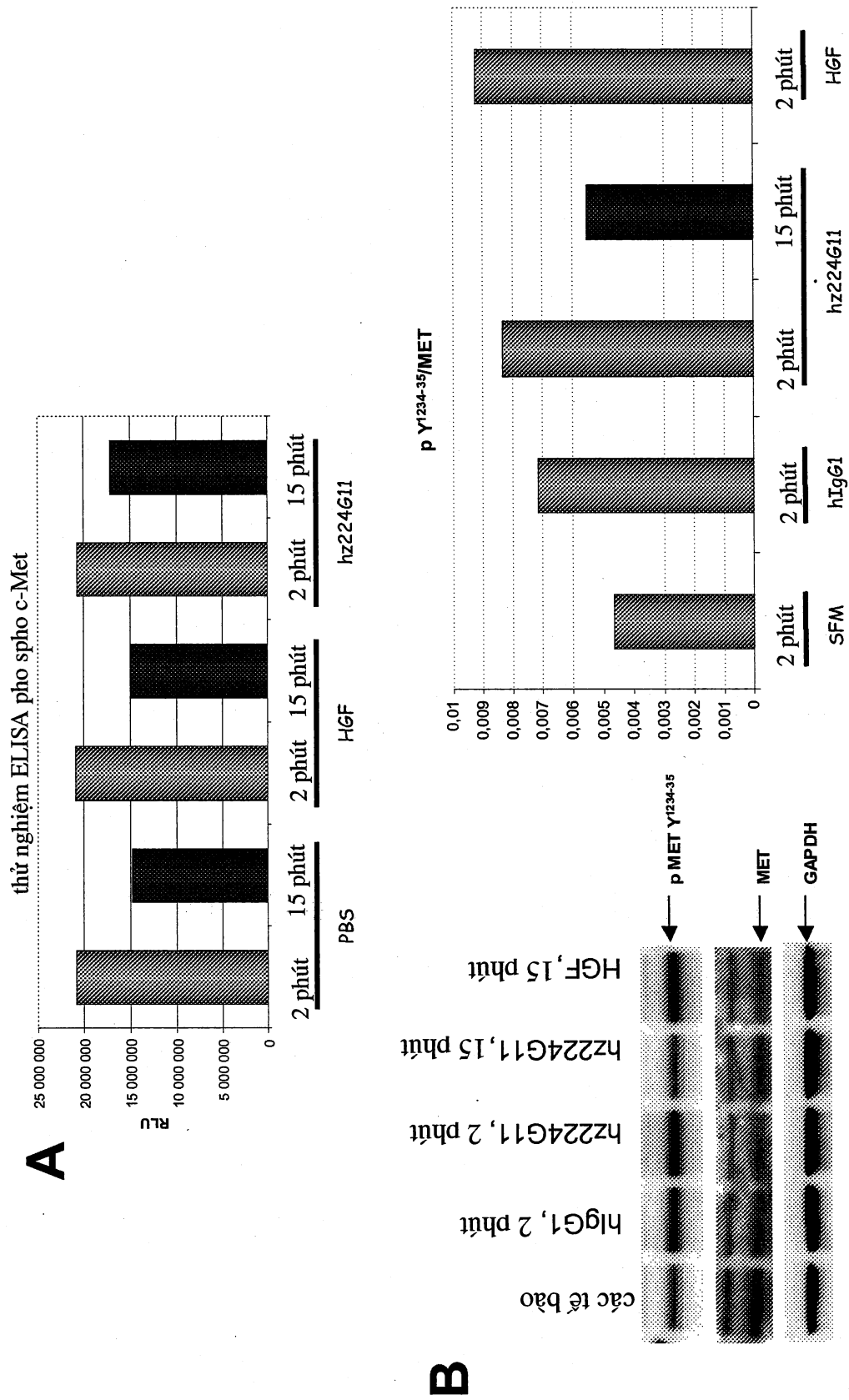


Fig.26

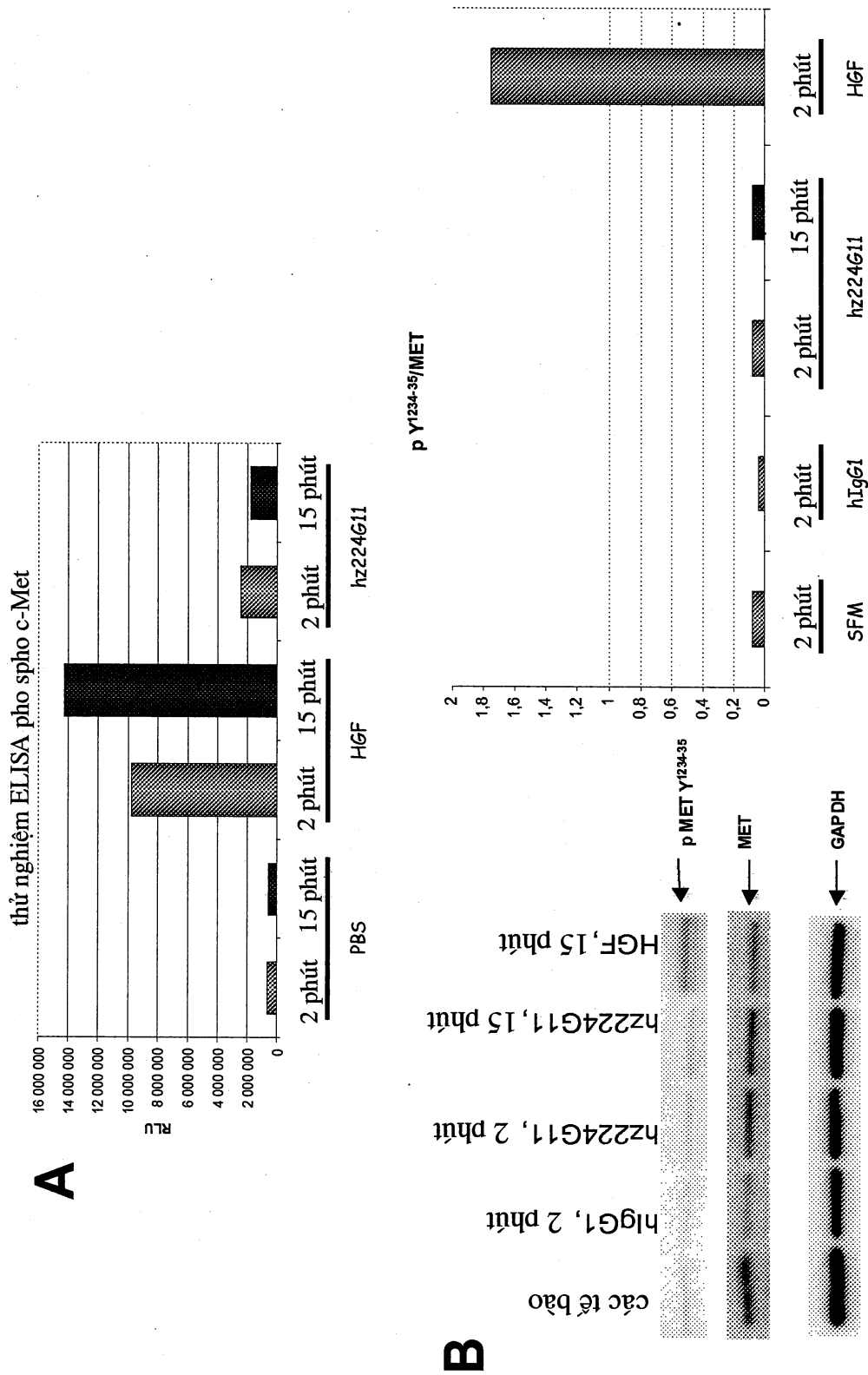


Fig.27

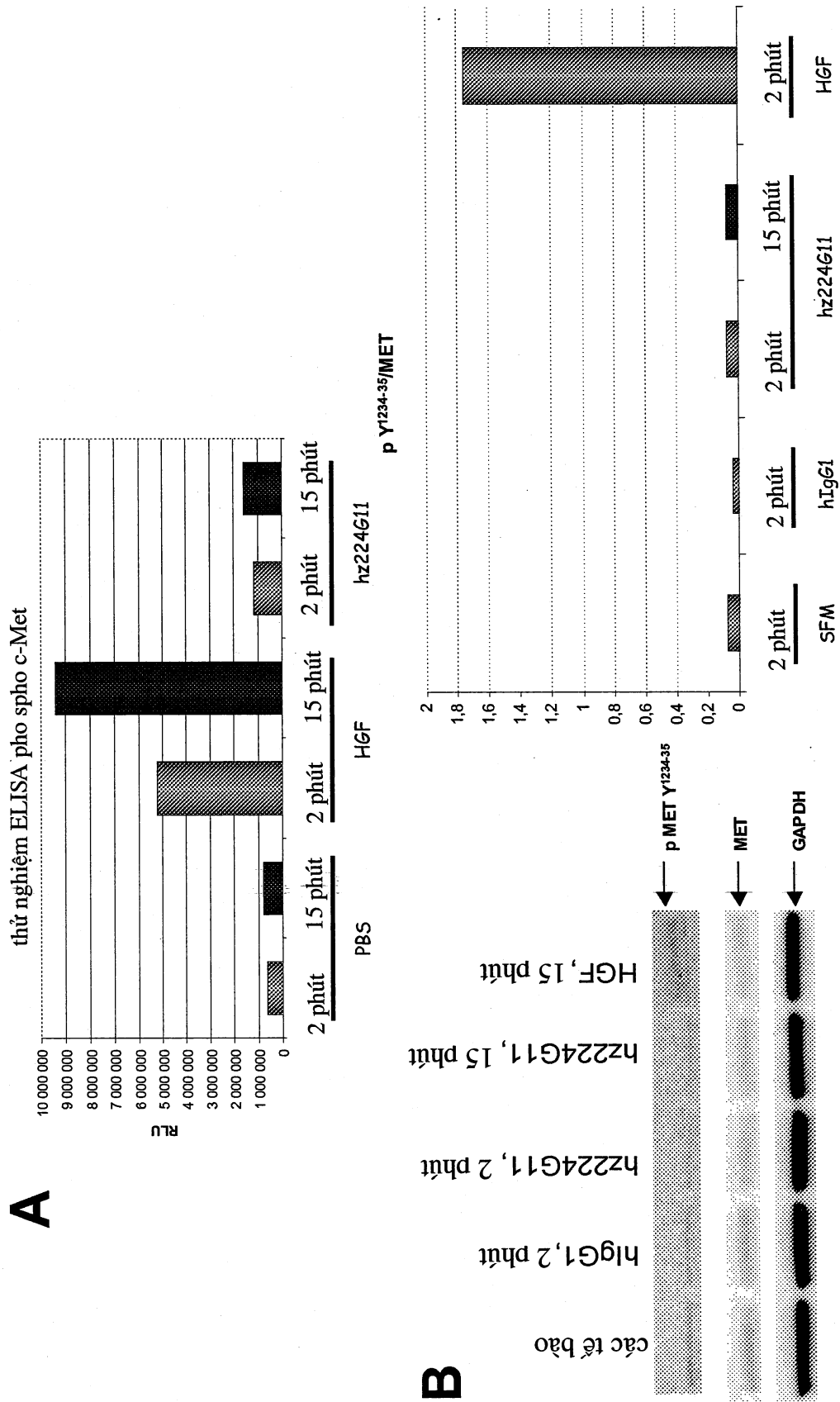
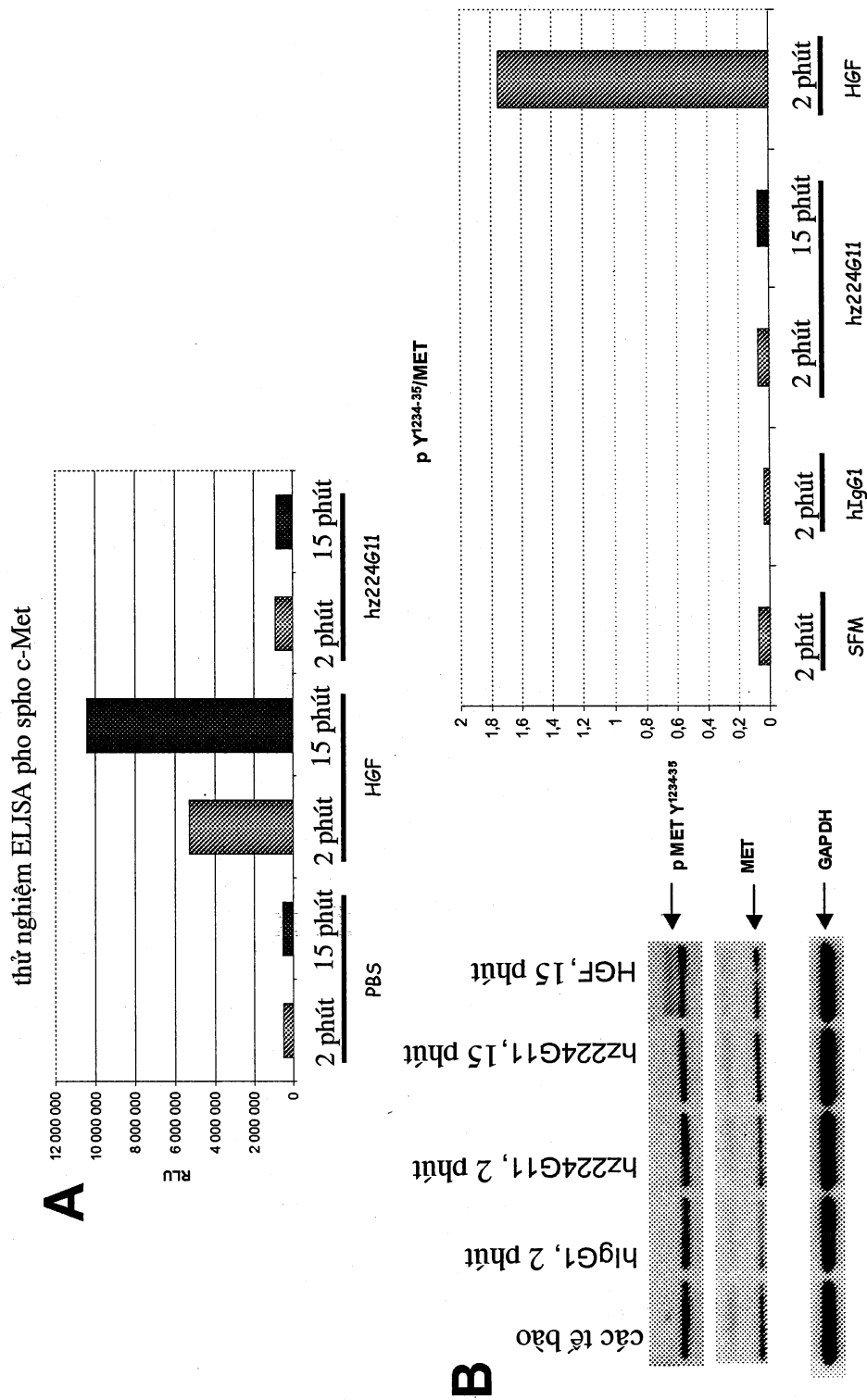


Fig.28



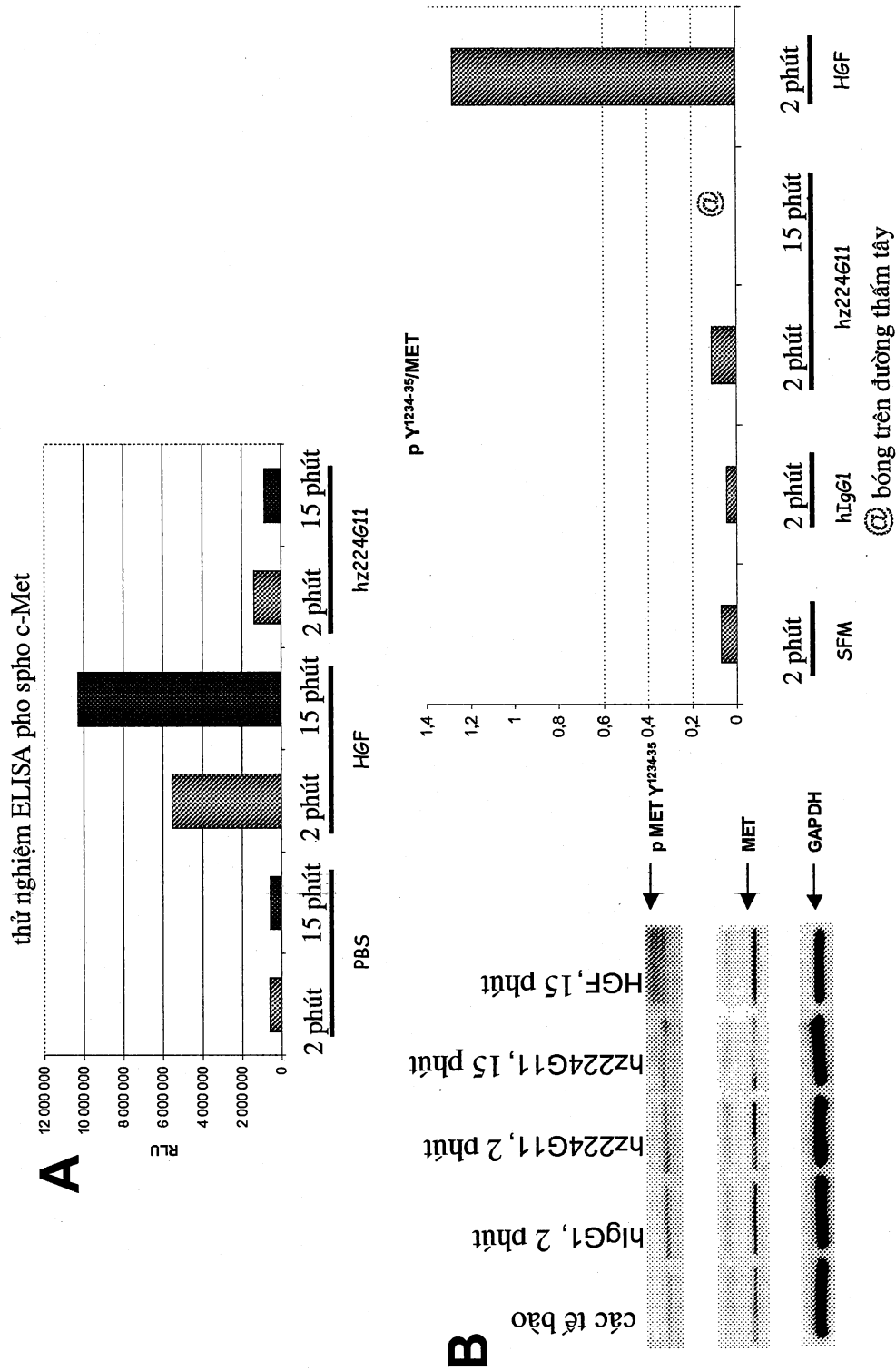
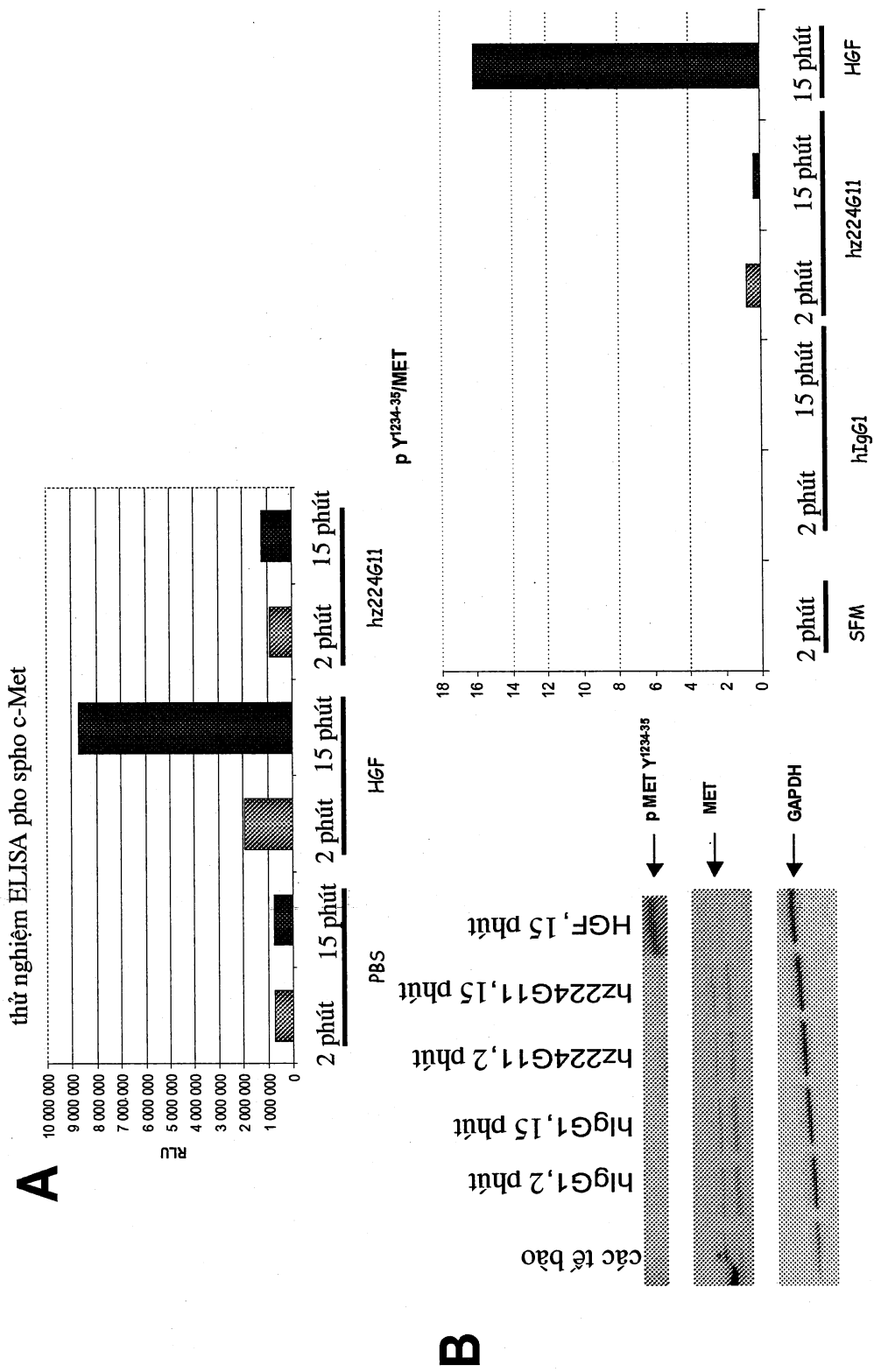


Fig.30



32/35

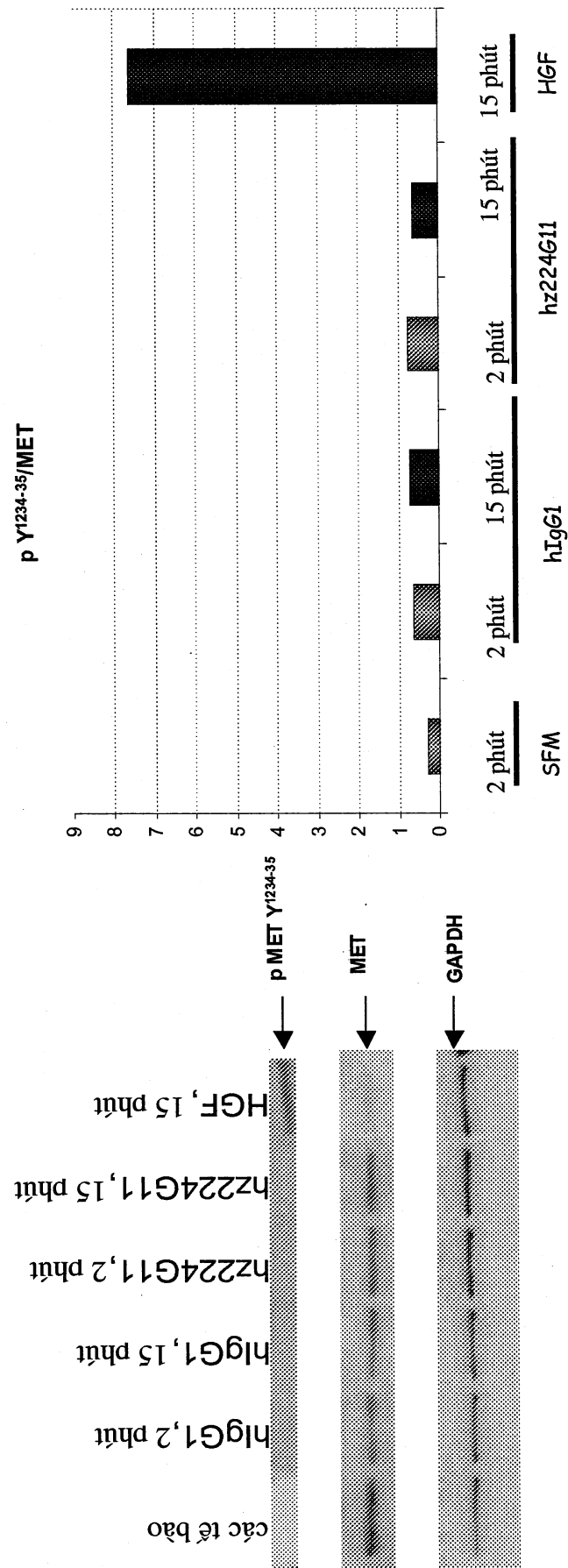
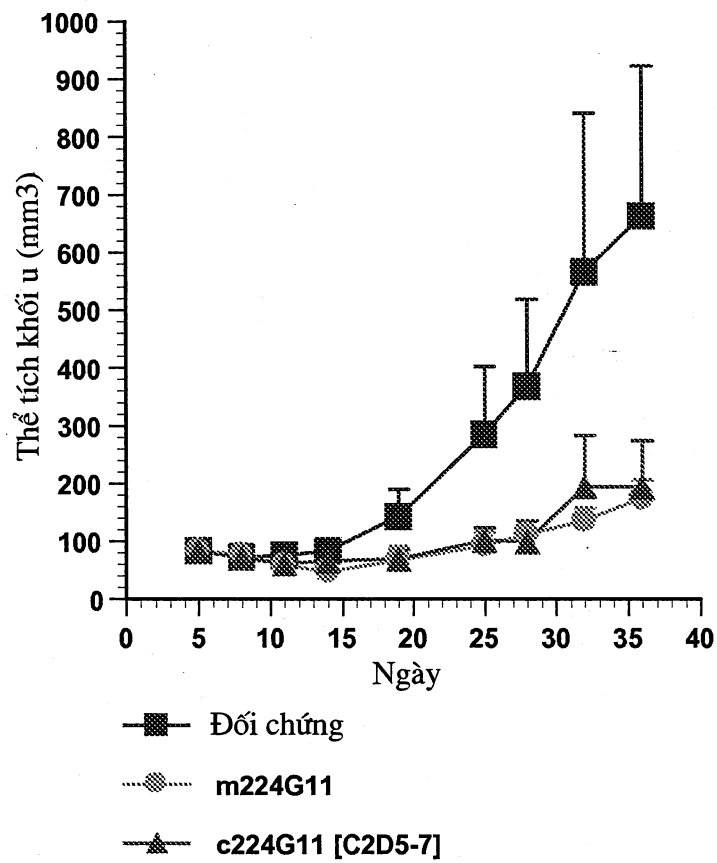


Fig.32

**Fig.33**

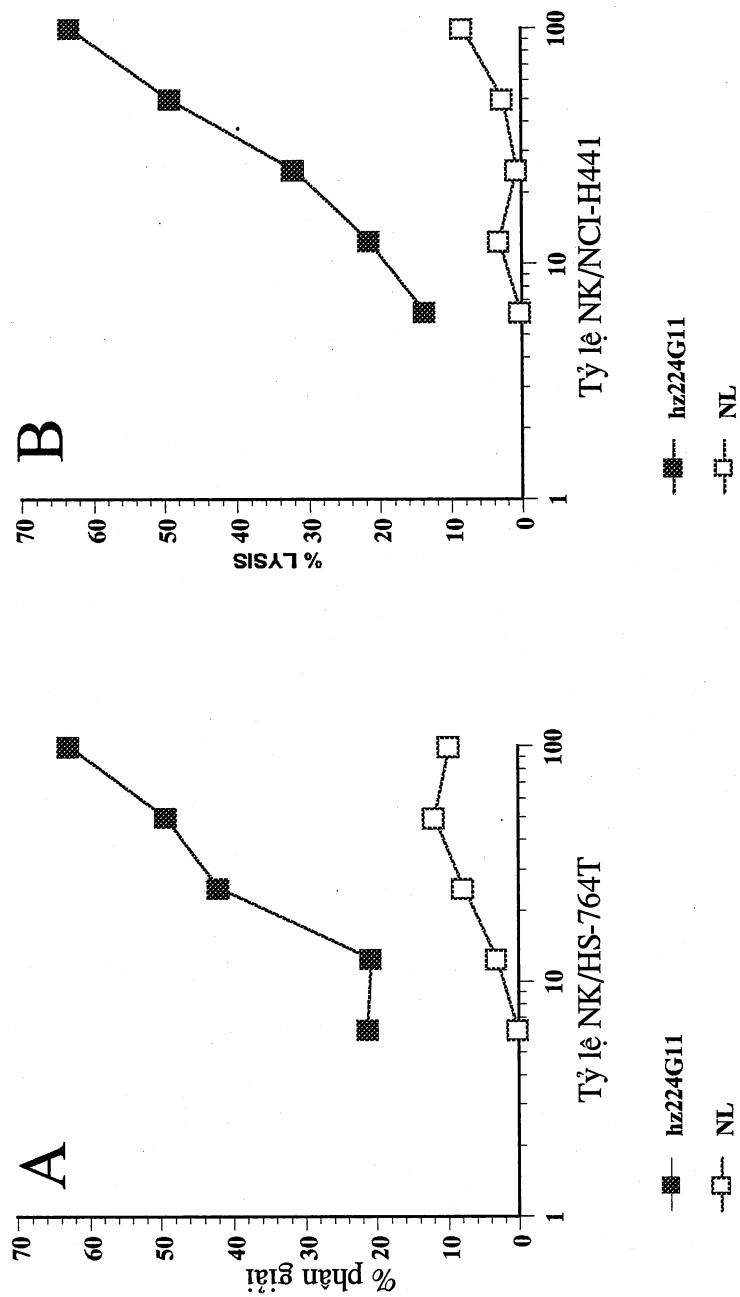


Fig.34

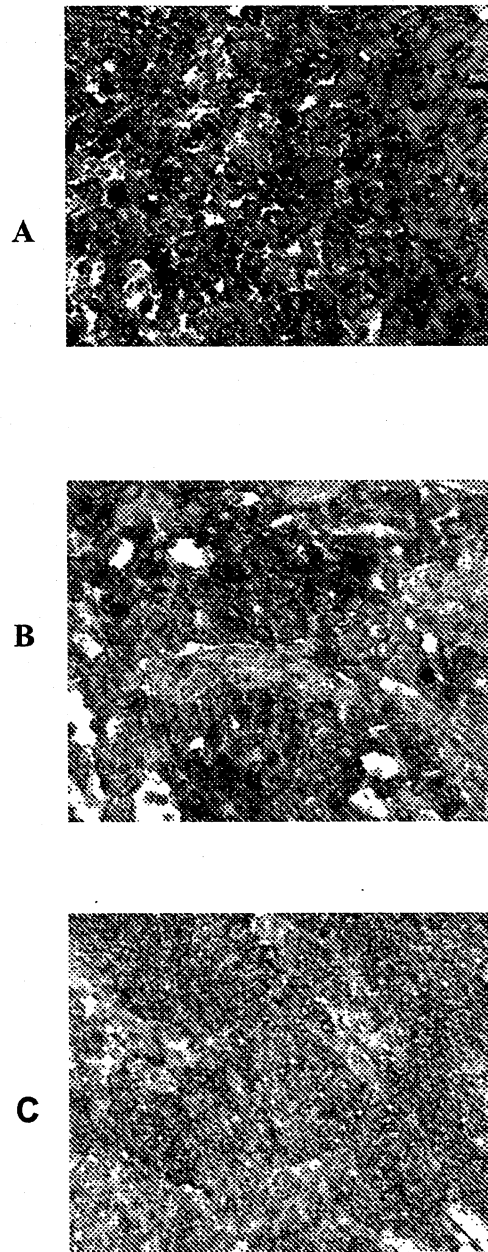


Fig.35