



(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) 
1-0019761

(51)⁷ **C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 1/04, (13) B**
37/06, C07K 16/46, C12N 1/15, 1/19,
1/21, 5/10, 15/09, C12P 21/08

(21) 1-2012-01320 (22) 28.10.2010
(86) PCT/JP2010/069653 28.10.2010 (87) WO2011/052799A1 05.05.2011
(30) 61/256,521 30.10.2009 US
(45) 25.09.2018 366 (43) 26.11.2012 296
(73) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)
6-10, Koishikawa 4-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088 Japan
(72) NISHIMURA, Miyuki (JP), SAKAMOTO, Yoshimasa (JP), KAWANO, Tetsu (JP),
IMAI, Toshio (JP)
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) **KHÁNG THỂ KHÁNG FRACTALKIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẪM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp liên quan đến các kháng thể được làm giống như của người và mảnh gắn kết fractalkin của nó.

		CDR1		CDR2
m3A5-2_VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF	NYIIHWVKQRPGQGLEWIG		WIYPGDGSPK
H3	--Q-VQ--A-VK-----V-----		--K-A-----I-----	
H3-2	--Q-VQ--A-VK-----V-----		--K-A-----I-----	
HK2	--Q-VQ--A-VK-----V-----		--R-A-----I-----	
HK3	--Q-VQ--A-VK-----V-----		--R-A-----I-----	
Dòng mầm Ig	--Q-VQ--A-VK-----V-----	XXXXXX	--R-A-----	MGXXXXXXXXXX
AAA68427.1	--K-LE--A-VK-----V-----	GHYMH	--R-A-----	IGWISPNRGATR

	CDR2		CDR3
m3A5-2_VH	FNERFKGKTTLTADKSSNTAYMLLSLTS	EDSAIYFCATGPTDGDYFDY	WGQGTTLTVSS
H3	-----RT-L-A-K-TN-A--L--S-RSD-T-V-F--T-----		-----V-----
H3-2	-----RT-L-A-K-TN-A--L--S-RSE-T-V-F--T-----		-----V-----
HK2	-----RT-M-A-T-TS-A--E--S-RSE-T-V-F--R-----		-----V-----
HK3	-----RT-L-A-K-TS-A--E--S-RSE-T-V-F--R-----		-----V-----
Dòng mầm Ig	XXXXXXXXRV-M-R-T-TS-A--E--S-RSE-T-V-Y--RXXXXXXXXX		-----V-----
AAA68427.1	FÄQKFQGRV-M-S-T-IN-V--E--G-RFD-T-V-Y--TIRTAYYGMDV		-----V-----

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm và phương pháp liên quan đến các kháng thể gắn kết fractalkin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Fractalkin (FKN) là chemokin xuyên màng mà được biểu hiện trên bề mặt của tế bào màng trong được hoạt hóa và gắn kết với thụ thể CX3CR1. Sự gắn kết của FKN được gắn kết màng với CX3CR1 được gắn kết màng làm trung gian cho sự bám dính tế bào-tế bào mạnh mẽ mà không liên quan đến selectin hoặc integrin. FKN được tiết, mà được tiết ra từ FKN gắn kết màng, cũng gắn kết với CX3CR1 và gây hoạt hóa integrin và hóa ứng động tế bào.

Sự biểu hiện của FKN được tạo ra trên bề mặt của tế bào màng trong bởi xytokin tiền viêm. Sự biểu hiện gia tăng của FKN và sự tích tụ của tế bào bạch huyết phản ứng kích thích độc tế bào CX3CR1⁺ và đại thực bào đã được báo cáo ở các đối tượng mắc nhiều rối loạn, bao gồm các rối loạn viêm và tự miễn dịch, bao gồm viêm loét ruột kết (UC), bệnh Crohn (CD), viêm khớp dạng thấp (RA), viêm gan tự miễn dịch (AIH), đa xơ cứng (MS), và bệnh đái tháo đường. Umehara et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24:34-40 (2004) mô tả vai trò của FKN trong chứng xơ vữa động mạch và thương tổn mạch. Nishimura et al., Ann. NY Acad. Sci. 1173:350-356 (2009) mô tả FKN là đích điều trị hiệu lực đối với bệnh viêm ruột như UC và CD.

Các kháng thể và các mảnh gắn kết FKN của kháng thể là các chất điều trị mong muốn bởi vì tính đặc hiệu của chúng. Các kháng thể và các mảnh gắn kết FKN có thể được sử dụng cho các tế bào hoặc mô đặc hiệu đích, nhờ đó giảm thiểu các tác dụng phụ hiệu lực của đích không đặc hiệu. Có nhu cầu để nhận biết và xác định các kháng thể điều trị hữu ích trong điều trị các rối loạn viêm, bao gồm các rối loạn được mô tả ở đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm sáu CDR được chọn từ:

- (a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28;
- (b) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29;
- (c) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30;
- (d) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31;
- (e) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32; và
- (f) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33.

Kháng thể có thể là kháng thể nguyên vẹn. Ví dụ, kháng thể là kháng thể được làm giống như của người. Miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được làm giống như của người có thể bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 42, hoặc SEQ ID NO: 43, và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được làm giống như của người có thể bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, hoặc SEQ ID NO: 45.

Ví dụ, kháng thể là kháng thể kháng fractalkin hoặc mảnh gắn kết FKN của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm chuỗi nặng với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 và chuỗi nhẹ với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44.

Kháng thể cũng có thể là kháng thể khảm. Ví dụ, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể khảm bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể khảm bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

Các mảnh gắn kết FKN của kháng thể cũng được đề xuất. Mảnh gắn kết FKN có thể là mảnh Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc Fv mà giữ lại tính đặc hiệu gắn kết với FKN.

Theo một số ví dụ, khi kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó bao gồm vùng cố định của người, vùng cố định này là IgG isotyp (ví dụ, IgG2 isotyp). Theo ví dụ khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN bao gồm vùng Fc đột biến sao cho kháng thể có ADCC và/hoặc hoạt hóa phân bù giảm so với vùng Fc thiếu đột biến. Ví dụ, vùng Fc có thể được đột biến ở một hoặc nhiều gốc axit amin V234, G237, C131 hoặc C219.

Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN về căn bản là làm giảm hoặc ức chế sự gắn kết của FKN với thụ thể của nó, CX3CR1, ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc lớn hơn, hoặc về căn bản là ức chế hFKN được làm trung hòa trong thử nghiệm hóa ứng động như thử nghiệm được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế và chất mang hoặc tá dược được dụng. Theo một số phương án, được phẩm bao gồm một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, như các chất được mô tả dưới đây.

Cũng được đề xuất là axit nucleic mã hóa và kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN được mô tả trên đây. Theo một phương án, axit nucleic mã hóa tất cả hoặc một phần chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó. Theo phương án khác, axit nucleic mã hóa tất cả hoặc một phần chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó. Axit nucleic có thể là trong vector (ví dụ, vector biểu hiện).

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ mà bao gồm một hoặc nhiều vector theo sáng chế. Ví dụ, tế bào chủ bao gồm hai vector, vector thứ nhất bao gồm axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và vector thứ hai bao gồm axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN được mô tả ở đây. Sự biểu hiện của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở tế bào chủ tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào chưa có nhân thật. Theo phương án

khác, tế bào chủ là tế bào có nhân thật. Các tế bào động vật có vú ví dụ hữu ích để sản xuất kháng thể và mảnh gắn kết FKN là các tế bào CHO và tế bào NS0.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN của nó. Phương pháp này bao gồm (a) biểu hiện vector theo sáng chế ở tế bào chủ thích hợp, và (b) thu hồi kháng thể này. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN có thể được tiết bởi tế bào chủ vào môi trường nuôi cấy. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó được tinh chế để loại bỏ ít nhất là 95% hoặc lớn hơn tạp chất chứa các vật liệu không phải kháng thể.

Phương pháp điều trị rối loạn viêm bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế cũng được đề xuất. Các rối loạn viêm ví dụ là bệnh viêm ruột, bệnh Crohn và viêm loét ruột kết. Đối với các rối loạn này, phương pháp này còn bao gồm dùng một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung. Các chất điều trị ví dụ là opiat, axit 5-aminosalicylic, 6-mercaptopurin, azathioprin, glucocorticoit, methotrexat, cyclosporin và metronidazol. Các chất điều trị thích hợp khác là được mô tả dưới đây.

Các rối loạn viêm mà được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế cũng bao gồm các bệnh gan mật tự miễn dịch (ví dụ, bệnh viêm gan tự miễn dịch, bệnh xơ gan mật sơ cấp hoặc bệnh viêm đường mật xơ cứng sơ cấp). Đối với các rối loạn này, phương pháp này còn có thể bao gồm dùng 6-mercaptopurin, axit ursodeoxycholic, azathioprin, glucocorticoit, chất lợi tiểu thiazit, chất lợi tiểu kháng aldosteron, cyclosporin, albumin hoặc spironolacton.

Bệnh viêm khớp dạng thấp (RA) cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế. Trong điều trị bệnh RA, phương pháp này còn có thể bao gồm dùng được chất chống viêm không steroit (NSAID), methotrexat, leflunomit, bucillamin, axit 5-aminosalicylic, glucocorticoit, hydrocortison, vitamin D, canxi hoặc alendronat.

Bệnh luput ban đỏ hệ thống (ví dụ, luput hệ thần kinh trung ương hoặc viêm thận do luput,) cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN, riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung. Các chất điều trị bổ sung ví dụ là glucocorticoit, xyclophosphamit, methotrexat, xyclosporin, và tacrolimus.

Bệnh đa xơ cứng và viêm tủy thị thần kinh cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN. Việc điều trị còn có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, như glucocorticoit, interferon- β , hoặc Copaxone[®].

Bệnh đa rễ thần kinh mất myelin (ví dụ, hội chứng Guillain-Barré hoặc viêm đa rễ thần kinh mất myelin mạn tính) cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN. Hơn nữa, cùng điều trị cũng được đề xuất, và điều trị còn có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, như glucocorticoit hoặc globulin miễn dịch trong tĩnh mạch.

Việc dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN cũng có thể là hữu ích để điều trị đau do nguyên nhân thần kinh, riêng hoặc kết hợp với chất điều trị bổ sung. Các chất bổ sung ví dụ để điều trị đau do nguyên nhân thần kinh là lamotrigin, topiramat, oxcarbazepin, levetiracetam, fentanyl, tramadol, capsaixin, cloridin, NSAID, amitriptylin, pregabalin, lidocain, duloxetine và carbamazepin.

Bệnh Alzheimer cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN. Phương pháp còn có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, như tacrin hydroclorua, donepezil hydroclorua, rivastigmin tartrat, galantamin hydrobromua, memantin hydroclorua, paroxetin, risperidon, quetiapin hoặc perospiron.

Đau nội tạng kết hợp với bệnh ung thư cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN,

riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, như morphin, NSAID, phentanyl, lidocain, pentazoxin hoặc clonidin.

Chứng xơ vữa động mạch cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN. Phương pháp này còn có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, như prostacyclin, aspirin, clopidogrel, ticlopidin, limaprost, prostaglandin E1, chất ức chế HMG CoA reductaza, bezafibrat, lidocain, mexiletin, chất lợi tiểu, digitalis, dopamin, chất chủ vận thụ thể β -adrenergic, isosorbit dinitrat, nitroglycerin, peptit kích thích bài tiết natri trong nước tiểu, warfarin, heparin, chất hoạt hóa plasminogen mô, urokinaza hoặc procainamid.

Bệnh mạch máu (ví dụ, thoái hóa điểm liên quan đến tuổi tác, bệnh Behcet, bệnh Harada và viêm màng mạch nhỏ có nguồn gốc sacoit) cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế. Phương pháp này còn có thể bao gồm dùng một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung được chọn từ glucocorticoit, xyclophosphamid, pegaptanib, ranibizumab, NSAID, colchixin, chlorambucil, thalidomit và verteporfin.

Bệnh thận (ví dụ, viêm thận do luput., viêm tiểu cầu thận hoặc bệnh thận do đái tháo đường) cũng có thể được điều trị bằng cách dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế. Glucocorticoit, sulfonilure, xyclophosphamid, glinit, xyclosporin, tacrolimus, mycophenolat mofetil, mizoribin, chất lợi tiểu, insulin, biguanit, chất ức chế α -glucosidaza, chất phong bế thụ thể angiotensin, thiazolidinedion, chất ức chế enzym biến đổi angiotensin (ACE), chất chặn kênh canxi hoặc chất ức chế thụ thể β -adrenergic có thể được bao gồm trong phương pháp điều trị này. Các chất ức chế thụ thể adrenergic có thể được bao gồm trong phương pháp điều trị này.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế trong điều trị rối loạn bất kỳ trong số các rối loạn viêm được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế trong bào chế thuốc để điều trị rối loạn bất kỳ trong số các rối loạn viêm được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ức chế sự nhận bạch cầu vào vị trí viêm ở đối tượng bằng cách cho đối tượng cần điều trị này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN, nhờ đó ức chế việc nhận bạch cầu đến vị trí viêm.

Thử nghiệm ex vivo cũng có thể được sử dụng cho các ứng dụng điều trị. Thử nghiệm ex vivo bao gồm chuyển nhiễm hoặc truyền tính trạng tế bào thu được từ đối tượng với polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Các tế bào được chuyển nhiễm hoặc truyền tính trạng sau đó được cho quay trở lại đối tượng. Các tế bào có thể là tế bào bất kỳ trong số nhiều loại tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, tế bào tạo máu (ví dụ, tế bào tủy xương, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào hình cây, tế bào T hoặc tế bào B), nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, tế bào màng trong, keratinoxit hoặc tế bào cơ.

Đối với mục đích theo sáng chế, các chữ viết tắt và các thuật ngữ sau đây được xác định dưới đây.

Thuật ngữ “kháng thể” (ở đây được sử dụng có thể thay thế cho “globulin miễn dịch”) bao gồm các kháng thể đơn dòng và đa dòng nguyên vẹn, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép) và các mảnh kháng thể mà thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn (ví dụ, khả năng gắn kết FKN và điều biến sự tương tác giữa FKN và CX3CR1). “Các kháng thể nguyên vẹn” là các glycoprotein bậc bốn khác loại có khoảng 150000 Dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau (L) và hai chuỗi nặng giống nhau (H). Mỗi chuỗi nhẹ được liên kết với chuỗi nặng bằng một liên kết disulfua cùng hóa trị, trong khi số lượng liên kết disulfua thay đổi trong số các chuỗi nặng của các isotyp globulin miễn dịch khác nhau. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các cầu disulfua trong chuỗi có khoảng trống đều nhau. Mỗi chuỗi nặng có miền biến đổi (VH) ở một đầu tiếp theo là nhiều miền cố định. Mỗi chuỗi nhẹ có miền biến đổi ở một đầu

(VL) và miền cố định ở đầu khác của nó. Miền cố định của chuỗi nhẹ được sắp xếp với miền cố định thứ nhất của chuỗi nặng, và miền biến đổi chuỗi nhẹ được sắp xếp với miền biến đổi chuỗi nặng. Các gốc axit amin cụ thể được cho là tạo thành bề mặt chung giữa chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng.

Có năm nhóm globulin miễn dịch chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và vài nhóm trong số chúng còn có thể được phân chia thành các nhóm phụ (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Kháng thể có thể là một phần của phân tử dung hợp lớn hơn, được tạo thành bằng cách kết hợp cùng hóa trị hoặc không cùng hóa trị của kháng thể với một hoặc nhiều protein hoặc peptit khác. Kháng thể cũng có thể là một phần của tiếp hợp miễn dịch, trong đó kháng thể được tiếp hợp với phân tử thứ hai (ví dụ, độc tố, đồng vị phóng xạ hoặc đánh dấu.)

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về căn bản là tương đồng, nghĩa là, các kháng thể riêng rẽ là giống nhau ngoại trừ các đột biến có thể có mà có thể có mặt với lượng nhỏ hơn.

Các dạng “được làm giống như của người” của kháng thể không phải của người là các kháng thể hoặc mảnh của chúng mà chứa vùng khung (FR) có chủ yếu là trình tự axit amin của globulin miễn dịch của người và vùng quyết định phân bù (CDR) có chủ yếu là trình tự axit amin của globulin miễn dịch không phải của người (nghĩa là, trình tự “nhập khẩu”). Theo một số ví dụ, các gốc vùng khung của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc không phải của người tương ứng. Các biến đổi khác của kháng thể được làm giống như của người có thể được tạo thành để thực hiện tính chế kháng thể.

Thuật ngữ “vùng quyết định phân bù” hoặc “CDR” có nghĩa là một trong ba trình tự siêu biến trong các vùng biến đổi trong mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch.

Thuật ngữ “vùng khung” hoặc “FR” có nghĩa là trình tự axit amin được đặt ở bên cạnh của ba CDR của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch.

Các FR và CDR của kháng thể được làm giống như của người không cần phải thích hợp một cách chính xác với trình tự ban đầu, ví dụ, CDR nhập khẩu hoặc FR liên ứng có thể được tạo đột biến bằng cách thay thế, lồng vào hoặc loại bỏ ít nhất là một gốc sao cho gốc CDR hoặc FR ở vị trí đó không tương ứng với trình tự liên ứng hoặc nhập khẩu. Tuy nhiên, các đột biến này thường sẽ không lớn. Thông thường, ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 99% gốc kháng thể được làm giống như của người sẽ tương ứng với gốc của trình tự ban đầu.

Thuật ngữ “khoảng,” như được sử dụng ở đây, khi đề cập đến giá trị có thể xác định như lượng, thời gian tạm thời và tương tự, có nghĩa là bao gồm biến thiên đến tối đa là $\pm 20\%$, tốt hơn là $\pm 10\%$, tốt hơn nữa là $\pm 5\%$, thậm chí còn tốt hơn nữa là $\pm 2\%$ so với giá trị xác định, các biến thiên này là thích hợp để thực hiện các phương pháp được mô tả. Trừ phi có chỉ định khác, tất cả các chữ số biểu hiện số lượng thành phần, các đặc tính như trọng lượng phân tử, điều kiện phản ứng và v.v được sử dụng trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ được hiểu là được biến đổi trong tất cả các trường hợp theo thuật ngữ “khoảng.” Do đó, trừ phi có chỉ định khác, các tham biến chữ số được nêu trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ kèm theo sau đây là các phép tính xấp xỉ mà có thể thay đổi phụ thuộc vào các đặc tính mong muốn có thể thu được theo sáng chế. Rất ít là, và không nhằm giới hạn ứng dụng học thuyết tương đương với phạm vi của yêu cầu bảo hộ, một tham biến chữ số ít nhất là sẽ được tạo cấu trúc theo quan điểm số lượng chữ số đáng kể được báo cáo và bằng cách áp dụng các kỹ thuật làm tròn thông thường.

Thuật ngữ “lượng đủ” hoặc “lượng hữu hiệu” có nghĩa là lượng kháng thể điều trị hoặc dược phẩm chứa nó cần để điều trị hoặc cải thiện rối loạn, như rối loạn viêm, theo cách có liên quan về mặt lâm sàng. Lượng đủ của kháng thể điều trị kháng FKN, mảnh gắn kết FKN hoặc dược phẩm chứa chúng được sử dụng cho thực tiễn sáng chế để điều trị, ví dụ, rối loạn viêm thay đổi phụ thuộc vào cách dùng, tuổi và sức khỏe của người bệnh.

“Ái lực gắn kết” thường đề cập đến cường độ của tổng các tương tác không cùng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Ái lực gắn kết có thể được thể hiện bởi hằng số phân ly (K_d). Ái lực có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các thử nghiệm gắn kết FKN được đánh dấu phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE[®]).

Các kháng thể “khảm” hoặc “được khảm” (nghĩa là, globulin miễn dịch) đề cập đến các kháng thể trong đó một phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ các loài cụ thể hoặc thuộc nhóm hoặc nhóm phụ kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác hoặc thuộc nhóm hoặc nhóm phụ kháng thể khác, cũng như các mảnh của kháng thể này, miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855, 1984).

Thuật ngữ “epitop” hoặc “quyết định kháng nguyên” có nghĩa là trình tự axit amin mà, là kết quả của cấu trúc tiếp tuyến hoặc cấu hình ba chiều, tạo thành vị trí gắn kết đối với kháng thể. Epitop thích ứng, mà có thể bao gồm các phần gián đoạn của trình tự axit amin của kháng nguyên, tương tác với kháng thể là kết quả của cấu trúc bậc ba của epitop. Trái lại, epitop tiếp tuyến là epitop mà được nhận biết bởi các kháng thể dựa trên cấu trúc sơ cấp của nó. Theo một phương án, epitop của fractalkin mà tạo thành bề mặt chung tối thiểu với Fab bao gồm, ví dụ, E66-Q69, W81-Q87, H70-F73, và H88-D90.

Thuật ngữ “biểu hiện” và “sản xuất” được sử dụng đồng nghĩa ở đây, và đề cập đến sinh tổng hợp sản phẩm gen. Các thuật ngữ này bao gồm sự sao chép gen thành ARN. Các thuật ngữ này cũng bao gồm sự dịch mã của ARN thành một hoặc nhiều polypeptit và còn bao gồm tất cả các biến đổi sau sao chép và sau dịch mã xuất hiện trong tự nhiên. Việc biểu hiện/sản xuất của kháng thể có

thể là trong tế bào chất của tế bào, và/hoặc trong môi trường ngoại bào như môi trường phát triển của nuôi cấy tế bào.

Thuật ngữ “fractalkin,” “FKN,” “FK,” hoặc “neurotactin” có nghĩa là polypeptit mà tương đồng với polypeptit được xác định bởi SEQ ID NO: 1 (Fig.1) và có hoạt tính sinh học FKN (ví dụ, gắn kết với thụ thể CX3CR1; thu hút hóa học tế bào T và bạch cầu đơn nhân; hoặc thúc đẩy sự bám dính của bạch cầu với tế bào màng trong được hoạt hóa). Hoạt tính sinh học của FKN polypeptit có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ. Như được sử dụng ở đây, FKN cũng bao gồm thành viên của họ FKN bất kỳ hoặc isoform. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,390,490, WO 2006/046739, và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0233710.

“Mảnh gắn kết FKN” bao gồm phần kháng thể nguyên vẹn, bao gồm vùng gắn kết FKN của chúng và có khả năng gắn kết FKN. Các mảnh gắn kết FKN có thể là các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, hoặc Fv; diabody; triabody; tetrabody; các kháng thể nhỏ; các phân tử Affibody; các kháng thể nhỏ; các kháng thể tuyến tính; các phân tử kháng thể chuỗi đơn; hoặc các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể.

Thuật ngữ “tương đồng” có nghĩa là trình tự gen hoặc protein bất kỳ mà mang ít nhất là 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% hoặc nhiều hơn tương đồng với trình tự gen hoặc protein đã biết so với chiều dài của trình tự so sánh. Protein “tương đồng” cũng có thể có ít nhất là một hoạt tính sinh học của protein so sánh. Đối với các polypeptit, chiều dài của trình tự so sánh thường ít nhất sẽ là 15, 20, 25, 35 hoặc nhiều hơn axit amin. Đối với các axit nucleic, chiều dài của trình tự so sánh thường ít nhất sẽ là 50, 60, 75, 100, 125 hoặc nhiều hơn nucleotit. “Tương đồng” cũng có thể đề cập đến về căn bản là tương tự giữa epitop được sử dụng để tạo ra các kháng thể và protein hoặc mảnh của nó mà các kháng thể đề cập đến. Trong trường hợp này, thuật ngữ tương đồng đề cập đến sự giống nhau đủ để gây sản xuất kháng thể mà có thể nhận biết đặc hiệu protein lúc tạo ra.

“Kháng thể người” có nghĩa là kháng thể chỉ có nguồn gốc từ người hoặc kháng thể bất kỳ trong đó các trình tự miễn biến đổi và miễn cố định là các trình tự của người hoặc trình tự của kháng thể người. Thuật ngữ này bao gồm các kháng thể với các trình tự có nguồn gốc từ (nghĩa là, sử dụng) gen của người, nhưng đã được làm thay đổi, ví dụ, để làm giảm khả năng sinh miễn dịch có thể có, tăng ái lực, loại bỏ xystein mà có thể làm gấp nếp không mong muốn, v.v. Thuật ngữ này bao gồm các kháng thể được tạo ra về mặt tái tổ hợp ở tế bào không phải của người, mà có thể làm cho sự glycosyl hóa không điển hình tế bào của người.

“Thể lai” đề cập đến sản phẩm của sự dung hợp tế bào giữa tế bào bạch huyết ung thư được nuôi cấy và tế bào bạch huyết B hoặc T nguyên thủy, mà biểu hiện hiệu lực miễn dịch đặc hiệu của tế bào ban đầu.

“Rối loạn viêm” như được sử dụng ở đây đề cập đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh bất kỳ trong đó hệ miễn dịch được hoạt hóa bình thường. Rối loạn viêm có thể là, ví dụ, viêm loét ruột kết, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột, viêm khớp dạng thấp, viêm cơ, đa xơ cứng, viêm tủy thị thần kinh, chứng xơ vữa động mạch, bệnh vẩy nến, luput ban đỏ hệ thống (ví dụ, luput hệ thần kinh trung ương hoặc viêm thận do luput,), viêm thận, viêm tiểu cầu thận, bệnh gan mật tự miễn dịch (ví dụ, bệnh viêm gan tự miễn dịch, bệnh xơ gan mật sơ cấp, hoặc viêm đường mật xơ hóa sơ cấp), bệnh vật chủ chống mảnh ghép, viêm da dị ứng, bệnh hen, bệnh thoái hóa thần kinh (ví dụ, bệnh Alzheimer), bệnh đa rễ thần kinh mất myelin (ví dụ, hội chứng Guillain-Barré hoặc bệnh viêm đa rễ thần kinh mất myelin mạn tính), đau do nguyên nhân thần kinh, đau nội tạng ung thư, chứng xơ vữa động mạch, thoái hóa điểm liên quan đến tuổi tác, bệnh thận do đái tháo đường, viêm màng mạch nhỏ có nguồn gốc sarcoit, hoặc bệnh đái tháo đường.

Theo cách khác, bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh là bệnh của đường hô hấp trên hoặc dưới, ví dụ, viêm khí-phế quản u bạch huyết; nhạy cảm quá mức do dị ứng hoặc tình trạng tiết quá mức, như viêm phế quản mạn tính và xơ hóa

phổi do u nang; xơ hóa phổi do nhiều nguyên nhân khác nhau (ví dụ, xơ hóa phổi tự phát); bệnh nghẽn phổi mạn tính (COPD); sarcoit; viêm mũi dị ứng và không dị ứng; chứng mày đay do dị ứng hoặc không dị ứng; bệnh liên quan đến da được đặc trưng bởi viêm do mất điều chỉnh, tạo cấu trúc lại mô, hình thành mạch, và khối u ung thư; bệnh đường dạ dày ruột, như bệnh Hirschsprung, bệnh tiêu chảy, tình trạng kém hấp thụ, và tình trạng bệnh viêm; rối loạn hệ thần kinh trung ương và ngoại biên, như suy yếu, tình trạng lo âu, bệnh Parkinson, đau nửa đầu và các dạng đau sợ khác, đột quỵ và nôn; bệnh của hệ miễn dịch, như buồn bực và mô bạch huyết, bệnh tự miễn dịch, hoặc bệnh liên quan đến miễn dịch khác; bệnh hệ tim mạch, như chứng phù phổi, tăng huyết áp, chứng tiền kinh giật, hội chứng đau vùng phức hợp typ 2, và chứng đột quỵ; bệnh viêm mạn tính, như chứng viêm khớp; bệnh liên quan đến xương; đau mạn tính, như đau cơ xơ hóa; và các rối loạn khác trong đó sự hoạt động của neurokinin, tachykinin, hoặc các chất liên quan khác (ví dụ, hemokinin) là có liên quan đến sự phát sinh bệnh, bệnh lý và nguyên nhân gây bệnh.

Các ví dụ bổ sung về các rối loạn viêm là sự phổ biến của mụn cá; hội chứng đau đường hô hấp cấp; bệnh Addison; bệnh viêm trong mắt dị ứng; bệnh viêm mạch nhỏ liên quan đến ANCA; viêm đốt sống mất ankyl; bệnh thiếu máu do tan huyết tự miễn dịch; bệnh Behcet; chứng liệt Bell; pemphigut bóng rộp; chứng thiếu máu cục bộ não; bệnh xơ gan; hội chứng Cogan; viêm da do tiếp xúc; hội chứng Cushing; viêm da cơ; luput ban đỏ hình đĩa; bệnh đau do ưa eozin; nốt ban đỏ; viêm da tróc vảy; xơ hóa cầu thận cục bộ; xơ hóa cầu thận phân đoạn cục bộ; xơ hóa cầu thận phân đoạn; viêm động mạch tế bào khổng; bệnh gút; viêm khớp do bệnh gút; eczema bàn tay; xuất huyết Henoch-Schonlein; bệnh ecpet thời kỳ thai nghén; chứng mọc nhiều lông; viêm màng cứng phổi tự phát; xuất huyết liên quan đến tiểu huyết cầu tự phát; bệnh viêm ruột xuất huyết liên quan đến tiểu huyết cầu miễn dịch hoặc rối loạn dạ dày ruột; bệnh da do viêm; liken phẳng; viêm khí-phế quản u bạch huyết; chứng phù nổi ban; bệnh nhược cơ năng; bệnh phổi do xơ hóa không đặc hiệu; bệnh viêm khớp mạn tính; bệnh viêm tụy; pemphigus thời kỳ thai nghén; pemphigus mụn; bệnh

viêm nha chu; nốt đa viêm động mạch; đau đa cơ dạng thấp; ngứa bìu; ngứa/viêm; viêm khớp vảy nến; bệnh nấm histoplasmosis phổi; viêm đa sụn tái phát; trứng cá đỏ; sarcoit; bệnh cứng da; hội chứng sốc do nhiễm khuẩn; viêm gân hoặc viêm bao hoạt mạc vai; hội chứng Sjogren; bệnh Still; bệnh Sweet; xơ cứng hệ thống; viêm động mạch Takayasu; viêm động mạch thái dương; hoại tử thượng bì do nhiễm độc; hội chứng thải loại mảnh ghép và liên quan đến thải loại mảnh ghép; bệnh lao; bệnh đái tháo đường typ 1; bệnh viêm mạch; bệnh Vogt-Koyanagi-Harada (VKH); và bệnh u hạt Wegener.

“Được phân lập” hoặc “được tinh chế” có nghĩa là làm thay đổi “thủ công” từ trạng thái tự nhiên. Nếu phân tử hoặc chế phẩm xuất hiện trong tự nhiên, nó đã “được phân lập” hoặc “được tinh chế” nếu nó đã được thay đổi hoặc tách khỏi môi trường ban đầu của nó hoặc cả hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có mặt tự nhiên ở thực vật hoặc động vật sống là không “được phân lập” hoặc “được tinh chế”, nhưng polynucleotit hoặc polypeptit giống nhau được phân lập từ các vật liệu đang cùng tồn tại của trạng thái tự nhiên của nó là “được phân lập” hoặc “được tinh chế” là thuật ngữ được dùng ở đây.

Thuật ngữ “được liên kết chặt chẽ” hoặc “được lồng vào chặt chẽ” có nghĩa là trình tự điều chỉnh cần để biểu hiện trình tự mã hóa được đặt vào phân tử axit nucleic ở các vị trí thích hợp so với trình tự mã hóa sao cho có khả năng biểu hiện trình tự mã hóa. Nhằm ví dụ, đoạn khởi đầu được liên kết chặt chẽ với trình tự mã hóa khi đoạn khởi đầu có khả năng kiểm soát sự sao chép hoặc biểu hiện của trình tự mã hóa. Trình tự mã hóa có khả năng được liên kết chặt chẽ với đoạn khởi đầu hoặc trình tự điều chỉnh theo hướng nghĩa thuận hoặc nghĩa ngược. Thuật ngữ “được liên kết chặt chẽ” đôi khi được áp dụng để sắp xếp các yếu tố kiểm soát sao chép khác (ví dụ, đoạn tăng cường) ở vector biểu hiện.

“Polynucleotit,” được đề cập đồng nghĩa với “phân tử axit nucleic,” đề cập đến polyribonucleotit hoặc polydeoxyribonucleotit bất kỳ, mà có là ARN hoặc ADN không được biến đổi hoặc ARN hoặc ADN được biến đổi. “Polynucleotit” bao gồm, nhưng không giới hạn đến, ADN sợi đơn và sợi đôi,

ADN mà là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi đôi, ARN sợi đơn và sợi đôi và ARN mà là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi đôi, các phân tử lai bao gồm ADN và ARN mà có thể là các vùng sợi đơn, thông thường hơn là, sợi đôi hoặc hỗn hợp sợi đơn và sợi đôi. Ngoài ra, “polynucleotit” đề cập đến các vùng sợi ba bao gồm ARN hoặc ADN hoặc cả ARN và ADN. Thuật ngữ polynucleotit này cũng bao gồm các ADN hoặc ARN chứa một hoặc nhiều bazơ được biến đổi và các ADN hoặc ARN với các khung được biến đổi vì lý do ổn định hoặc các lý do khác. Các bazơ “được biến đổi” bao gồm, ví dụ, các bazơ được trityl hóa và các bazơ khác thường như inosin. Nhiều biến đổi có thể được thực hiện với ADN và ARN; do đó, “polynucleotit” bao gồm các dạng được biến đổi về mặt hóa học, về mặt enzym hoặc về mặt trao đổi chất của polynucleotit như thường được phát hiện trong tự nhiên, cũng như các dạng hóa học có đặc trưng của ADN và ARN của virus và tế bào. “Polynucleotit” cũng bao gồm chuỗi axit nucleic tương đối ngắn, thường được gọi là oligonucleotit.

“Polypeptit” đề cập đến cả hai chuỗi ngắn, thường được gọi là peptit, oligopeptit hoặc oligome, và đến chuỗi dài hơn, thường được gọi là protein. Polypeptit có thể chứa các axit amin khác với 20 axit amin mã hóa gen. “Polypeptit” bao gồm các trình tự axit amin được biến đổi theo các quy trình tự nhiên, như quy trình sau dịch mã, hoặc bằng các kỹ thuật biến đổi hóa học mà đã biết trong lĩnh vực này. Các biến đổi này được mô tả trong các tài liệu cơ bản và chi tiết hơn trong các chuyên đề, cũng như trong nhiều tài liệu nghiên cứu. Các biến đổi có thể xảy ra ở nơi bất kỳ trong polypeptit, bao gồm khung peptit, chuỗi phụ axit amin và tận cùng amino hoặc carboxyl. Sẽ thích hợp rằng loại biến đổi giống nhau có thể có mặt với các mức độ giống nhau hoặc khác nhau ở vài vị trí trong polypeptit. Ngoài ra, polypeptit có thể chứa nhiều loại biến đổi. Các polypeptit có thể được phân nhánh như là kết quả của ubiquitin hóa và chúng có thể là vòng, có hoặc không có phân nhánh. Các polypeptit vòng, phân nhánh và vòng phân nhánh có thể thu được từ các quy trình sau dịch mã tự nhiên hoặc có thể được tạo thành bằng các phương pháp tổng hợp. Các biến đổi bao gồm, ví dụ, axetyl hóa, axyl hóa, ADP-ribosyl hóa, amin hóa, gắn kết cùng hóa trị của

flavin, gắn kết cùng hóa trị của phần heme, gắn kết cùng hóa trị của nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, gắn kết cùng hóa trị của lipit hoặc dẫn xuất lipit, gắn kết cùng hóa trị của phosphatidylinositol, liên kết ngang, vòng hóa, tạo thành liên kết disulfua, demetyl hóa, tạo thành các liên kết ngang cùng hóa trị, tạo thành xystin, tạo thành pyroglutamat, formyl hóa, gama-carboxyl hóa, glycosyl hóa, tạo thành neo GPI, hydroxyl hóa, iot hóa, metyl hóa, myristoyl hóa, oxy hóa, quy trình phân hủy protein, phosphoryl hóa, prenyl hóa, raxemi hóa, selenoyl hóa, sulfat hóa và bổ sung qua trung gian ARN vận chuyển các axit amin vào protein như arginyl hóa và ubiquitin hóa. Xem, ví dụ, Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors, Meth Enzymol (1990) 182:626-646 and Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh của nó nhận biết và gắn kết kháng nguyên (ví dụ, FKN hoặc mảnh của nó), nhưng về căn bản là không nhận biết và gắn kết các phân tử khác trong mẫu (ví dụ, mẫu sinh học). “Đặc hiệu” có nghĩa là để phân biệt sự dính ở mức thấp, không đặc hiệu mà đôi khi có thể xảy ra giữa các protein ngẫu nhiên, ví dụ, với các miền hút nước được tiếp xúc. Nó không có nghĩa là có ngụ ý rằng kháng thể sẽ không gắn kết với protein bất kỳ khác với kháng nguyên theo sáng chế. Các kháng thể có thể phản ứng ngang (và “gắn kết đặc hiệu”) với protein bất kỳ mà bao gồm epitop liên quan.

Thuật ngữ “đối tượng” có nghĩa là động vật bất kỳ, ví dụ, động vật có vú (ví dụ, con người). Đối tượng sẽ được điều trị, ví dụ, rối loạn viêm là đối tượng mà đã được chẩn đoán bởi các bác sỹ y khoa hoặc bác sỹ thú y do trường hợp này có thể có tình trạng bệnh. Việc chẩn đoán có thể được thực hiện theo các cách thích hợp bất kỳ. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng đối tượng

theo sáng chế có thể đã được cho vào các thử nghiệm tiêu chuẩn hoặc có thể đã được nhận biết, mà không cần thử nghiệm, đối tượng ở nguy cơ cao do sự có mặt của một hoặc nhiều yếu tố có nguy cơ gây bệnh, như tuổi, di truyền hoặc lịch sử gia đình.

Tế bào đã “được biến nạp” hoặc “được chuyển nhiễm” bởi các axit nucleic ngoại sinh hoặc khác loại như ADN khi ADN này đã được đưa vào bên trong tế bào. ADN biến nạp có thể hoặc không thể được kết hợp (ví dụ, liên kết cùng hóa trị) vào hệ gen của tế bào. Tế bào chưa có nhân thật, nấm men và động vật có vú, ví dụ, ADN biến nạp có thể được duy trì trên yếu tố bổ sung như plasmit. Đối với các tế bào có nhân thật, tế bào được biến nạp ổn định hoặc “tế bào ổn định” là tế bào trong đó ADN biến nạp trở nên được kết hợp vào nhiễm sắc thể sao cho nó được thừa kế bởi tế bào con thông qua sao chép nhiễm sắc thể. Tính ổn định này được chứng minh bởi khả năng tế bào có nhân thật hình thành các dòng tế bào hoặc thể đơn dòng bao gồm quần thể tế bào con chứa ADN biến nạp. “Thể đơn dòng” là quần thể tế bào có nguồn gốc từ tế bào đơn hoặc tổ tiên chung bằng cách phân bào có tơ. “Dòng tế bào” là thể đơn dòng của tế bào sơ cấp mà có khả năng phát triển ổn định in vitro đối với nhiều thế hệ.

Thuật ngữ “điều trị” có nghĩa là dùng kháng thể điều trị hoặc dược phẩm chứa nó để nhằm mục đích phòng bệnh và/hoặc chữa bệnh. Để “điều trị bệnh hoặc rối loạn” hoặc sử dụng để “điều trị bệnh” đề cập đến dùng điều trị cho đối tượng đã mắc bệnh để cải thiện tình trạng bệnh của đối tượng này. Đối tượng có thể được chẩn đoán với rối loạn viêm dựa trên sự nhận biết triệu chứng bất kỳ trong số các triệu chứng đặc trưng hoặc sử dụng các phương pháp chẩn đoán đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Để “ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn” đề cập đến điều trị phòng bệnh đối tượng mà không bị ốm, nhưng dễ bị thương tổn, hoặc theo cách khác, với nguy cơ phát triển cụ thể. Đối tượng được xác định có nguy cơ phát triển rối loạn viêm bằng cách sử dụng các phương pháp chẩn đoán đã biết trong lĩnh vực này.

“Vecto” là một đơn vị sao chép, như plasmit, thể thực khuẩn, cosmit hoặc virus trong đó đoạn axit nucleic khác có thể được lồng vào chặt chẽ để gây sao chép hoặc biểu hiện của đoạn này.

Như được sử dụng trong phần mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng đơn “một” bao gồm nhiều tham chiếu trừ phi có chỉ định rõ ràng khác. Do đó, ví dụ, tham chiếu đến “tế bào” bao gồm sự kết hợp của hai hoặc nhiều tế bào và tương tự.

Các dấu hiệu và thuận lợi khác của sáng chế sẽ được mô tả trong phần mô tả chi tiết sáng chế và các điểm yêu cầu bảo hộ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là trình tự axit amin của FKN người.

Fig.2 là bảng thể hiện các đặc trưng gắn kết (nghĩa là, hoạt tính làm trung hòa, ái lực gắn kết và khả năng phản ứng ngang của các loài) của các kháng thể đơn dòng kháng FKN.

Fig.3 là sự sắp xếp của vùng biến đổi chuỗi nặng của trình tự mAb kháng FKN được làm giống như của người (SEQ ID NOS 36-37 và 42-43, tương ứng, thứ tự xuất hiện), trình tự m3A5-2 (SEQ ID NO: 26), trình tự Ig dòng mầm (SEQ ID NO: 40), và trình tự AAA68427.1 (SEQ ID NO: 34).

Fig.4 là sự sắp xếp của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của trình tự mAb kháng FKN được làm giống như của người (SEQ ID NOS 38 và 44-45, tương ứng, trình tự xuất hiện), trình tự m3A5-2 (SEQ ID NO: 27), trình tự Ig dòng mầm (SEQ ID NO: 41), và trình tự ABU90602.1 (SEQ ID NO: 35).

Fig.5 là bảng tổng kết kết quả từ ba thử nghiệm hóa ứng động độc lập. Hoạt tính làm trung hòa của các mAb kháng hFKN được làm giống như của người được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa ứng động. Tất cả các kết hợp của H3 và H3-2 với L2 và L4 là được làm giống như của người một cách thành công, do các mAb này thể hiện hoạt tính làm trung hòa tương tự với

mAb khảm. Tuy nhiên, HK2, được tạo thành bằng cách sử dụng các gốc khóa bị giới hạn, thể hiện hoạt tính làm trung hòa giảm trong kết hợp với L2 hoặc L4.

Các Fig.6A và Fig.6B mô tả dãy biểu đồ thể hiện hoạt tính làm trung hòa của m3A5-2 mAb và mAb khảm. Fig.6A là biểu đồ thể hiện hoạt tính làm trung hòa của m3A5-2 mAb như được xác định bởi thử nghiệm hóa ứng động. Fig.6B là biểu đồ thể hiện hoạt tính làm trung hòa của mAb khảm như được xác định bởi thử nghiệm hóa ứng động.

Các Fig.7A đến Fig.7D mô tả dãy biểu đồ thể hiện hoạt tính làm trung hòa của các kháng thể kháng hFKN được làm giống như của người như được xác định bởi thử nghiệm hóa ứng động. Fig.7A thể hiện hoạt tính làm trung hòa của H3L2-IgG2. Fig.7B thể hiện hoạt tính làm trung hòa của H3-L4-IgG2. Fig.7C thể hiện hoạt tính làm trung hòa của HK2L2-IgG2. Fig.7D thể hiện hoạt tính làm trung hòa của HK2L4-IgG2.

Các Fig.8A đến Fig.8F mô tả dãy biểu đồ thể hiện hoạt tính làm trung hòa của các kháng thể kháng hFKN được làm giống như của người như được xác định bởi thử nghiệm hóa ứng động. Fig.8A thể hiện hoạt tính làm trung hòa của H3-2L2-IgG2. Fig.8B thể hiện hoạt tính làm trung hòa của H3-2L4-IgG2. Fig.8C thể hiện hoạt tính làm trung hòa của H3-2L5-IgG2. Fig.8D thể hiện hoạt tính làm trung hòa của HK3L2-IgG2. Fig.8E thể hiện hoạt tính làm trung hòa của HK3L4-IgG2. Fig.8F thể hiện hoạt tính làm trung hòa của HK3L5-IgG2.

Fig.9 là bảng tổng kết các kết quả của thử nghiệm BIACORE® được sử dụng để xác định ái lực gắn kết của các mAb với hFKN và FKN của khỉ cynomolgus.

Các Fig.10A đến Fig.10C mô tả dãy biểu đồ thể hiện ái lực gắn kết của các kháng thể kháng hFKN khảm và được làm giống như của người (H3L2, H3-2L2, H3L4, H3-2L4, và HK2L4) với hFKN-SEAP và FKN-SEAP khi cynomolgus như được xác định bởi thử nghiệm BIACORE®. Fig.10A là biểu đồ dạng cột thể hiện các giá trị K_a (1/Ms). Fig.10B là biểu đồ dạng cột thể hiện các giá trị K_d (1/s). Fig.10C là biểu đồ dạng cột thể hiện các giá trị KD (M).

Fig.11 mô tả các kết quả của tạo bản đồ epitop bằng cách sử dụng thư viện peptit tổng hợp xếp chồng (SEQ ID NOS 115-135, tương ứng, trình tự xuất hiện) từ miền FKN chemokin.

Fig.12 mô tả các kết quả tạo bản đồ epitop của hFKN bằng cách sử dụng ELISA.

Fig.13 mô tả các kết quả tạo bản đồ epitop của hFKN bằng cách sử dụng BIACORE®.

Fig.14 thể hiện các kết quả của thử nghiệm bão hòa ngang để nhận biết vị trí gắn kết Fab trên fractalkin. Biểu đồ này thể hiện rằng các vùng E66-Q69, W81-Q87, H70-F73 và H88-D90 của FKN được bao gồm trong bề mặt chung tối thiểu với Fab.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tạo mô hình và tách các kháng thể kháng FKN, các kháng thể được làm giống như của người kháng FKN và các mảnh gắn kết FKN của nó. Các kháng thể được làm giống như của người kháng FKN và các mảnh gắn kết FKN của nó được đề cập ở đây có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn viêm. Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để ức chế việc nhận bạch cầu vào vị trí viêm. Các rối loạn viêm mà có thể được điều trị theo sáng chế bao gồm viêm loét ruột kết, bệnh Crohn, bệnh viêm ruột, viêm khớp dạng thấp, viêm cơ, đa xơ cứng, viêm tủy thị thần kinh, chứng xơ vữa động mạch, bệnh vẩy nến, luput ban đỏ hệ thống (ví dụ, luput hệ thần kinh trung ương hoặc viêm thận do luput,), viêm thận, viêm tiểu cầu thận, bệnh gan mật tự miễn dịch (ví dụ, bệnh viêm gan tự miễn dịch, bệnh xơ gan mật sơ cấp, hoặc viêm đường mật xơ hóa sơ cấp), bệnh vật chủ chống mảnh ghép, viêm da dị ứng, asthma, bệnh thoái hóa thần kinh (ví dụ, bệnh Alzheimer), bệnh đa rễ thần kinh mất myelin (ví dụ, hội chứng Guillain-Barré hoặc bệnh viêm đa rễ thần kinh mất myelin mạn tính), đau do nguyên nhân thần kinh, đau nội tạng ung thư, chứng xơ vữa động mạch, thoái hóa điểm liên quan đến tuổi tác, bệnh thận do đái tháo đường, viêm màng mạch nhỏ có nguồn gốc sarcoit, đái tháo đường,

viêm khí-phế quản u bạch huyết, nhạy cảm quá mức do dị ứng hoặc tình trạng tiết quá mức, như viêm phế quản mạn tính và xơ hóa phổi do u nang, xơ hóa phổi do nhiều nguyên nhân khác nhau (ví dụ, xơ hóa phổi tự phát), bệnh nghẽn phổi mạn tính (COPD), sarcoit, viêm mũi dị ứng và không dị ứng, chứng mày đay do dị ứng hoặc không dị ứng, bệnh liên quan đến da được đặc trưng bởi viêm do mất điều chỉnh, tạo cấu trúc lại mô, hình thành mạch, và khối u ung thư, bệnh đường dạ dày ruột, như bệnh Hirschsprung, bệnh tiêu chảy, tình trạng kém hấp thụ, và tình trạng bệnh viêm, rối loạn hệ thần kinh trung ương và ngoại biên, như suy yếu, tình trạng lo âu, bệnh Parkinson, đau nửa đầu và các dạng đau sợ khác, đột quỵ và nôn, bệnh của hệ miễn dịch, như buồn bực và mô bạch huyết, bệnh tự miễn dịch, hoặc bệnh liên quan đến miễn dịch khác, bệnh hệ tim mạch, như chứng phù phổi, tăng huyết áp, chứng tiền kinh giật, hội chứng đau vùng phức hợp typ 2, và chứng đột quỵ, bệnh viêm mạn tính, như chứng viêm khớp, bệnh liên quan đến xương, đau mạn tính, như đau cơ xơ hóa, sự phổ biến của mụn cá, hội chứng đau đường hô hấp cấp, bệnh Addison, bệnh viêm trong mắt dị ứng, bệnh viêm mạch nhỏ liên quan đến ANCA, viêm đốt sống mất ankyl, bệnh thiếu máu do tan huyết tự miễn dịch, bệnh Behcet, chứng liệt Bell, pemphigus bóng rộp, chứng thiếu máu cục bộ não, bệnh xơ gan, hội chứng Cogan, viêm da do tiếp xúc, hội chứng Cushing, viêm da cơ, luput ban đỏ hình đĩa, bệnh đau do ưa eozin, nốt ban đỏ, viêm da tróc vảy, xơ hóa cầu thận trung tâm, xơ hóa cầu thận phân đoạn cục bộ, xơ hóa cầu thận phân đoạn, viêm động mạch tế bào khổng, gout, viêm khớp do bệnh gút, eczema bàn tay, xuất huyết Henoch-Schonlein, bệnh ecpet thời kỳ thai nghén, chứng mọc nhiều lông, viêm màng cứng phổi tự phát, xuất huyết liên quan đến tiểu huyết cầu tự phát, bệnh viêm ruột xuất huyết liên quan đến tiểu huyết cầu miễn dịch hoặc rối loạn dạ dày ruột, bệnh da do viêm, liken phẳng, viêm khí-phế quản u bạch huyết, chứng phù nổi ban, bệnh nhược cơ năng, bệnh phổi do xơ hóa không đặc hiệu, bệnh viêm khớp mạn tính, bệnh viêm tụy, pemphigus thời kỳ thai nghén, pemphigus mụn, bệnh viêm nha chu, nốt đa động mạch, đau đa cơ dạng thấp, ngứa bìu, ngứa/viêm, viêm khớp vảy nến, bệnh nấm histoplasmosis phổi, viêm đa sụn tái

phát, trứng cá đỏ, sarcoit, bệnh cứng da, hội chứng sốc do nhiễm khuẩn, viêm gân hoặc viêm bao hoạt mạc vai, hội chứng Sjogren, bệnh Still, bệnh Sweet, xơ cứng hệ thống, viêm động mạch Takayasu, viêm động mạch thái dương, hoại tử thượng bì do nhiễm độc, hội chứng thải loại mảnh ghép và liên quan đến thải loại mảnh ghép, bệnh lao, bệnh đái tháo đường typ 1, bệnh viêm mạch, bệnh Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), và bệnh u hạt Wegener.

Kháng thể

Phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó là đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Kohler et al., *Nature* 256:495-497 (1975); Hongo et al., *Hybridoma* 14:253-260 (1995); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 2nd ed. (1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier), 563-681 (1981); Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26:265-268 (2006); các patent Mỹ số 7,189,826; 7,078,492; và 7,153,507; Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology* 20:927-937 (2005); Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27:185-191 (2005); US 2006/258841; US 2006/183887; US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; và US 2005/026229.

Kháng thể khảm

Các kháng thể khảm và phương pháp sản xuất chúng là đã biết và được thiết lập trong lĩnh vực này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể khảm” có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó, có ít nhất là một số phần có ít nhất là một miền biến đổi có nguồn gốc từ trình tự axit amin kháng thể của động vật có vú không phải con người, bộ gặm nhấm, bò sát, trong khi các phần còn lại của kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó, có nguồn gốc từ con người. Ví dụ, kháng thể khảm có thể bao gồm miền gắn kết kháng nguyên của chuột với Fc của người hoặc miền cấu trúc khác.

Kháng thể được làm giống như của người

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng FKN được làm giống như của người và các mảnh gắn kết FKN của nó mà, ví dụ, điều biến sự tương tác giữa FKN và CX3CR1. Việc làm giống người có thể được thực hiện theo phương pháp vùng quyết định phân bù (CDR)-phương pháp ghép (Kontermann and Dübel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001) và Tsurushita et al., *Methods* 36:69-83 (2005)). Việc làm giống người cũng có thể được thực hiện theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); và Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)) bằng cách thay thế trình tự vùng siêu biến đổi với trình tự tương ứng của kháng thể người. Kháng thể được làm giống như của người thường là các kháng thể của người trong đó một số gốc của vùng siêu biến và một số gốc FR có thể có được thể bởi các gốc từ các vị trí tương tự trong kháng thể không phải của người.

Việc chọn các miền biến đổi của người, cả chuỗi nhẹ và nặng, được sử dụng trong sản xuất kháng thể được làm giống như của người có thể là quan trọng để làm giảm kháng nguyên. Theo phương pháp “thích hợp nhất”, trình tự của miền biến đổi của kháng thể của bộ gặm nhấm được sàng đối với toàn bộ thư viện của trình tự miền biến đổi của người đã biết. Trình tự của người mà là gần nhất với trình tự của bộ gặm nhấm được chấp nhận sau đó như khung của người đối với kháng thể được làm giống như của người. Xem, ví dụ, Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296-2308 (1993) và Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). Phương pháp khác sử dụng khung cụ thể có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của tất cả các kháng thể của người thuộc nhóm phụ chuỗi nhẹ hoặc nặng cụ thể. Khung tương tự có thể được sử dụng đối với vài kháng thể được làm giống như của người khác nhau. Xem, ví dụ, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289 (1992) và Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993).

Còn mong muốn chung rằng các kháng thể được làm giống như của người mà giữ lại ái lực cao đối với kháng nguyên và các đặc tính sinh học thích hợp khác. Để đạt được mục đích này, theo một phương pháp, kháng thể được làm giống như của người được sản xuất bằng phương pháp phân tích trình tự ban đầu

và các sản phẩm được làm giống như của người theo khái niệm khác nhau bằng cách sử dụng các mô hình ba chiều của trình tự ban đầu và được làm giống như của người. Mô hình globulin miễn dịch ba chiều là hiện sẵn có và tương tự với mô hình đã biết trong lĩnh vực này. Các chương trình máy tính là hiện sẵn có mà minh họa và thể hiện các cấu trúc hình thể ba chiều có thể có của các trình tự globulin miễn dịch được chọn. Việc kiểm tra các thể hiện này cho phép phân tích vai trò tương tự của các gốc trong thực hiện chức năng của trình tự globulin miễn dịch quan tâm, nghĩa là, phân tích các gốc mà tác động để khả năng của globulin miễn dịch gắn kết kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc FR có thể được chọn và kết hợp từ các trình tự nhận và nhập khẩu sao cho đặc tính của kháng thể mong muốn, như ái lực gia tăng đối với (các) kháng nguyên đích (ví dụ, FKN hoặc mảnh của nó), là đạt được. Nói chung, các gốc CDR có liên quan trực tiếp và về căn bản là liên quan nhất đến tác động gắn kết kháng nguyên.

Mảnh gắn kết FKN

Theo một số phương án theo sáng chế, đã đề xuất các mảnh gắn kết FKN mà điều biến sự tương tác giữa FKN và CX3CR1. Các mảnh này có thể là mảnh gắn kết kháng nguyên chức năng của các kháng thể nguyên vẹn, được làm giống như của người và/hoặc khảm, như các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, Fv hoặc ScFv (xem, ví dụ, Bird et al., Science 242:423-426 (1998)). Các mảnh này được tạo ra bằng cách tiêu hóa bằng cách phân giải protein các kháng thể nguyên vẹn bằng cách, ví dụ, tiêu hóa papain (xem, ví dụ, WO 94/29348) trực tiếp từ tế bào chủ được biến nạp tái tổ hợp. Các mảnh gắn kết FKN có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật được mô tả dưới đây.

Các mảnh Fv có năng lượng tương tác giữa hai chuỗi của chúng thấp hơn so với các mảnh Fab. Để làm ổn định sự kết hợp của các miền VH và VL, các mảnh Fv đã được liên kết với các peptit (xem, ví dụ, Bird et al., Science 242:423-426 (1998) và Huston et al., PNAS 85:5879-5883 (1998)), các cầu disulfua (xem, ví dụ, Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362-1367 (1990)), và các đột biến “núm trong lỗ” (xem, ví dụ, Zhu et al., Protein Sci. 6:781-788

(1997)). Các mảnh ScFv có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Whitlow et al., *Methods Enzymol.* 2:97-105 (1991) và Huston et al., *Int. Rev. Immunol.* 10:195-217 (1993)). ScFv có thể được tạo ra ở tế bào vi khuẩn như *E. coli*, nhưng cũng có thể được tạo ra ở tế bào có nhân thật. Một thuận lợi của ScFv là hóa trị một của sản phẩm, mà ngăn ngừa ái lực gia tăng do gắn kết đa hóa trị và chu kỳ nửa phân rã ngắn của các mảnh ScFv. Các nỗ lực khắc phục các vấn đề này bao gồm (ScFv')₂ hóa trị hai được tạo ra từ ScFV chứa xystein tận cùng C bổ sung bằng cách cặp đôi hóa học (xem, ví dụ, Adams et al., *Cancer Res.* 53:4026-4034 (1993) và McCartney et al., *Protein Eng.* 8:301-314 (1995)) hoặc dime hóa đặc hiệu vị trí xảy ra của ScFv chứa gốc xystein tận cùng C không cặp đôi (xem, ví dụ, Kipriyanov et al., *Cell. Biophys.* 26:187-204 (1995)). Theo cách khác ScFv có thể được ép để tạo thành nhiều lần bằng cách làm ngắn cầu liên kết peptit đến từ 3 đến 12 gốc để tạo thành các “diabody” (xem, ví dụ, Holliger et al., *PNAS* 90:6444-6448 (1993)). Việc làm giảm cầu liên kết còn có thể dẫn đến ScFV trime để tạo thành các “triabody” (xem, ví dụ, Kortt et al., *Protein Eng.* 10:423-433 (1997)) và tetrame để tạo thành các “tetrabody” (xem, ví dụ, Le Gall et al., *FEBS Letters* 453:164-168 (1999)). Cấu trúc của các phân tử ScFV hóa trị hai cũng có thể đạt được bằng cách dung hợp gen với motif dime hóa protein để tạo thành các “miniantibody” (xem, ví dụ, Pack et al., *Biochemistry* 31:1579-1584 (1992)) và các “minibody” (xem, ví dụ, Hu et al., *Cancer Res.* 56:3055-3061 (1996)). Trình tự ScFv-Sc-Fv ((ScFV)₂) cũng có thể được tạo thành bằng cách liên kết hai đơn vị ScFv bởi ba cầu liên kết peptit (xem, ví dụ, Kurucz et al., *J. Immunol.* 154:4576-4582 (1995)). Các diabody đặc hiệu kép có thể được tạo thành thông qua liên kết không cùng hóa trị của hai sản phẩm dung hợp chuỗi đơn chứa miền VH từ một kháng thể được nối bởi cầu liên kết ngắn với miền VL của kháng thể khác (xem, ví dụ, Kipriyanov et al., *Int. J. Can.* 77:763-772 (1998)). Khả năng của diabody đặc hiệu kép này có thể được làm tăng cường bằng cách đưa các cầu disulfua hoặc các đột biến “máu trong lỗ” hoặc bằng cách tạo thành các diabody chuỗi đơn (ScDb), trong đó hai mảnh ScFv lại được nối

thông qua cầu liên kết peptit (xem, ví dụ, Kontermann et al., J. Immunol. Methods 226:179-188 (1999)). Các phân tử đặc hiệu kép có hóa trị bốn là hiện có bằng cách, ví dụ, dung hợp mảnh ScFv với miền CH3 của phân tử IgG hoặc với mảnh Fab thông qua vùng khung (xem, ví dụ, Coloma et al., Nature Biotechnol. 15:159-163 (1997)). Theo cách khác, các phân tử đặc hiệu kép có hóa trị bốn là hiện có bằng cách dung hợp các diabody chuỗi đơn đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Alt et al., FEBS Letters 454:90-94 (1999)). Các phân tử đặc hiệu kép có hóa trị bốn nhỏ hơn cũng có thể được tạo thành bằng cách dime hóa trình tự ScFv-ScFv với cầu liên kết chứa motif xoắn-vòng-xoắn (DiBi miniantibody) (xem, ví dụ, Muller et al., FEBS Letters 432:45-49 (1998)) hoặc phân tử chuỗi đơn bao gồm bốn miền biến đổi kháng thể (VH và VL) theo hướng ngăn ngừa cặp đôi nội phân tử (trình tự diabody) (xem, ví dụ, Kipriyanov et al., J. Mol. Biol. 293:41-56 (1999)). Các mảnh $F(ab')_2$ đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách cặp đôi hóa học các mảnh Fab' bằng cách dime hóa khác loại thông qua khóa leuxin (xem, ví dụ, Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) và Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)). Cũng hiện có là các miền VH và VL được phân lập (xem, ví dụ, các patent Mỹ số 6,248,516; 6,291,158; và 6,172,197).

Dược phẩm

Chế phẩm điều trị bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó theo sáng chế có thể kết hợp với chất mang, tá dược hoặc chất làm ổn định sinh lý dụng ở dạng chế phẩm trong nước hoặc làm khô. Chất mang, tá dược hoặc chất làm ổn định sinh lý dụng bao gồm, ví dụ, nước muối; chất đệm, như phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa, bao gồm axit ascorbic; polypeptit trọng lượng phân tử thấp; protein (ví dụ, albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch); các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin; các monosacarit, disacarit và các hydrat cacbon khác, bao gồm glucoza, manosa hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; rượu đường, như manitol hoặc sorbitol; các counterion tạo muối, như natri; hoặc chất

có hoạt tính bề mặt không ion, như TWEEN™, PLURONICS™, hoặc PEG.

Các kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN của nó theo sáng chế có thể được bẫy trong vi nang, trong hệ phân phát được chất dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ hóa, hạt nano hoặc nang nano) hoặc trong đại nhũ hóa. Trong đó dùng giải phóng duy trì kháng thể được mong muốn trong chế phẩm với các đặc tính giải phóng thích hợp để điều trị rối loạn bất kỳ cần phải dùng kháng thể, vi nang của kháng thể có thể được bao gồm. Các ví dụ về chất nền giải phóng duy trì bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-methacrylat) hoặc poly(vinylalcohol)), polylactit (xem, ví dụ, patent Mỹ số 3,773,919), copolyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không thoái biến, copolyme của axit lactic - axit glycolic có thể thoái biến như LUPRON DEPOT™ (vi cầu có thể tiêm bao gồm copolyme của axit lactic – axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Các chế phẩm được sử dụng để dùng *in vivo* phải là tiệt trùng. Điều này đạt được bằng cách lọc qua màng lọc tiệt trùng.

Điều trị kết hợp

Các kháng thể điều trị hoặc mảnh gắn kết FKN của nó theo sáng chế có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các chế phẩm khác trong điều trị. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được cùng dùng với một hoặc nhiều kháng thể khác, các chất chống viêm, các chất độc tế bào, chất chống hình thành mạch, xytokin, chất ức chế sự phát triển hoặc điều trị kháng TNF- α . Các điều trị kết hợp này bao gồm dùng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất được bao gồm trong cùng chế phẩm hoặc chế phẩm riêng rẽ) và dùng riêng rẽ (ví dụ, đồng thời hoặc theo trình tự). Khi hai hoặc nhiều chất được dùng riêng rẽ, việc dùng kháng thể theo sáng chế có thể xảy ra trước hoặc sau khi dùng điều trị bổ sung.

Lượng hữu hiệu của các chất điều trị được dùng kết hợp với kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN của nó sẽ theo ý muốn của bác sỹ. Việc xác định liều được tính toán để đạt được việc quản lý tối đa tình trạng bệnh sẽ được điều trị. Liều sẽ còn phụ thuộc vào các yếu tố như loại chất điều trị sẽ được sử

dụng và đối tượng cụ thể sẽ được điều trị. Các liều thích hợp có thể được giảm do tác dụng kết hợp (hiệp đồng) của chất điều trị bổ sung và kháng thể kháng FKN hoặc mảnh gắn kết FKN của nó.

Chất chống viêm

Hợp chất chống viêm có thể được dùng kết hợp với các kháng thể hoặc mảnh gắn kết FKN theo sáng chế. Các chất chống viêm ví dụ bao gồm steroid, như glucocorticoid, dược chất chống viêm không steroid (ví dụ, ibuprofen hoặc tacrolimus), chất ức chế đặc hiệu xyclooxygenaza-2 như rofecoxib (Vioxx®) và celecoxib (Celebrex®), corticosteroid (ví dụ, prednison hoặc hydrocortison), xytokin đặc hiệu trực tiếp ở chức năng tế bào bạch huyết T, flubiprofen, diclofena và ketarolac. Xem, ví dụ, các patent Mỹ số 7,112,578 và 7,199,119.

Các chất khác

Các chất điều trị khác mà có thể được dùng bao gồm, ví dụ, aminosalixylat (ví dụ, axit 5-aminosalixylic), sulfasalazin (ví dụ, azulfadin), mesalamin (ví dụ, Asacol® hoặc Pentasa®), azathioprin (ví dụ, Imuran®), 6-mercaptopurin (ví dụ, Purinethol®), xyclosporin, methotrexat, infliximab (ví dụ, Remicade®), interferon (ví dụ, interferon- β), glatiram axetat (ví dụ, Copaxone®), natalizumab (Tysabri®) kháng integrin $\alpha 4$, axit ursodeoxycholic, tacrin hydroclorua, chất ức chế HMG CoA reductaza, lidocain, sulfonylure, xyclophosphamit, globulin miễn dịch trong tĩnh mạch, amitriptylin, opiat (ví dụ, morphin), diphenoxylat, atropin, vitamin D, canxi, lamotrigin, quetiapin, prostaglandin E1, nitroglycerin, pegaptanib, ranibizumab, isosorbit dinitrat, perospiron, topiramet, oxcarbazepin, dopamin, mycophenolat mofetil, mizoribin, levetiracetam, fentanyl, tramadol, digitalis, capsaixin, natriuretic peptit, cloridin, -dronat (ví dụ, alendronat), bezafibrat, mexiletin, glinit (ví dụ, nateglinit hoặc repaglinit), donepezil hydroclorua, leflunomit, pregabalin, rivastigmin tartrat, phentanyl, prostacyclin, procainamit, colchixin, chất ức chế α -glucosidaza, chất lợi tiểu (ví dụ, chất lợi tiểu thiazit hoặc chất lợi tiểu kháng aldosteron), tacrolimus, memantin hydroclorua, pentazoxin, clopidogrel, chất hoạt hóa

plasminogen mô, thalidomit, chất phong bế thụ thể angiotensin, thiazolidindion, metronidazol, spironolacton, duloxetine, paroxetine, clonidine, ticlopidine, heparin, chất chẹn kênh canxi, insulin, albumin, bucillamin, carbamazepin, risperidon, limaprost, warfarin, verteporfin, gabapentin, galantamin hydrobromua, aspirin, urokinaza, chlorambucil, chất ức chế enzym biến đổi angiotensin, biguanit, chất ức chế hoặc chất chủ vận thụ thể β -adrenergic, hydrochloroquin và mitoxantron.

Điều trị rối loạn được mô tả ở đây (ví dụ, rối loạn viêm) còn có thể bao gồm dùng các điều trị khác. Ví dụ, tách hồng huyết cầu khỏi dịch tương (ví dụ, điều trị trao đổi huyết thanh) có thể được sử dụng để điều trị, ví dụ, hội chứng Guillain-Barré, bệnh đa rễ thần kinh mất myelin (ví dụ, bệnh viêm đa rễ thần kinh mất myelin mạn tính), xuất huyết giảm tiểu cầu cục nghẽn (TTP), bệnh Behcet, hoặc đa xơ cứng.

Liều và dùng

Việc làm giảm hoặc điều trị rối loạn viêm thường bao gồm làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng hoặc biến chứng kết hợp với rối loạn. Trong trường hợp về các rối loạn viêm, lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể điều trị, mảnh gắn kết FKN, hoặc dược phẩm chứa chúng có thực hiện một hoặc kết hợp sau đây: giảm viêm; giảm đau bụng hoặc chuột rút; giảm sưng; giảm hoặc loại trừ bệnh tiêu chảy; giảm loét đường tiêu hóa; giảm sốt; giảm hoặc làm dịu sự buồn nôn; giảm mệt mỏi; giảm mất trọng lượng; giảm đau khớp; giảm sưng; giảm ngứa hoặc bài tiết da; loại bỏ vàng da; và/hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng kết hợp với rối loạn viêm. “Lượng hữu hiệu điều trị” của kháng thể sẽ được dùng là lượng tối thiểu cần để ngăn ngừa, cải thiện hoặc điều trị rối loạn viêm.

Các kháng thể, mảnh gắn kết FKN và dược phẩm được mô tả ở đây được dùng cho đối tượng theo các phương pháp đã biết, như dùng trong tĩnh mạch như truyền hoặc bằng cách truyền liên tục trong thời gian, khu trú, qua đường miệng, dưới da, bằng cách tiêm cuống phổi, trong não, trong mũi, qua da, trong màng bụng, trong cơ, trong phổi, trong âm đạo, trực tràng, trong động mạch, trong chỗ thương tổn, ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch trong não hoặc

trong mắt. Dùng khu trú có thể đặc biệt được mong muốn nếu các tác dụng phụ kéo dài hoặc độc tố kết hợp với điều trị.

Chế phẩm để dùng qua đường miệng cũng có thể được đề xuất như viên nén có thể nhai hoặc nang gelatin cứng, trong đó hoạt chất được trộn với chất pha loãng rắn tro hoặc nang gelatin mềm trong đó hoạt chất được trộn với nước hoặc môi trường có dầu.

Thử nghiệm *ex vivo* cũng có thể được sử dụng cho các ứng dụng điều trị. Các thử nghiệm *ex vivo* bao gồm các tế bào chuyển nhiễm hoặc truyền tính trạng thu được từ đối tượng với polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể. Các tế bào được chuyển nhiễm hoặc truyền tính trạng sau đó được cho quay trở lại đối tượng. Tế bào có thể là tế bào bất kỳ trong số nhiều loại tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, tế bào tạo huyết (ví dụ, tế bào tủy xương, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào hình cây, tế bào T hoặc tế bào B), nguyên bào sợi, tế bào biểu mô, tế bào màng trong, tế bào keratin hoặc tế bào cơ.

Liều và thời gian dùng chế phẩm theo sáng chế phụ thuộc vào nhiều yếu tố lâm sàng khác nhau, bao gồm sức khỏe của đối tượng và tính nguy kịch của triệu chứng rối loạn viêm. Điều trị có thể là liên tục trong khoảng thời gian nằm trong khoảng từ 1 ngày đến 4 năm, từ 1 ngày đến 3 năm, từ 1 ngày đến 2 năm, từ 1 ngày đến một năm, từ 1 đến 100 ngày, từ 1 đến 60 ngày, từ 1 đến 20 ngày, từ 1 đến 10 ngày hoặc cho đến khi rối loạn viêm hoặc triệu chứng rối loạn viêm được điều trị hoặc giảm. Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng bốn lần/ngày, ba lần/ngày, hai lần/ngày, hàng ngày, hàng tuần, hàng hai tháng, hàng tháng, cứ hàng hai tháng, hàng ba tháng hoặc hàng năm. Các liều phụ thuộc vào tính nguy kịch của tình trạng bệnh và được chuẩn độ để đạt được nồng độ huyết thanh máu ở trạng thái ổn định nằm trong khoảng từ 1ng/mL đến 10 μ g/mL, hoặc từ 1 đến 500ng/mL. Lượng kháng thể được dùng thường nằm trong khoảng từ 0,001 đến 30mg/kg trọng lượng đối tượng (ví dụ, từ 0,01 đến 10mg/kg trọng lượng đối tượng).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa theo các ví dụ sau đây, nhưng không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Điều chế kháng thể đơn dòng fractalkin chuột kháng người (hFKN)

Kháng thể đơn dòng chuột kháng hFKN (mAb) được tạo ra như được mô tả trên đây (xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,390,490). Thu được, các thể đơn dòng mAb 1F3-1, 3A5-2, 1F3, 1G1, 2B2, 3D5, 3H7, 6D1, 7F6, và 5H7-6 trung hòa.

Ví dụ 2. Chọn lọc mAb để làm giống người

Các thể đơn dòng 1F3-1, 3A5-2 và 5H7-6 được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa ứng động để xác định hoạt tính làm trung hòa, thử nghiệm BIACORE® để xác định ái lực gắn kết với hFKN, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) để xác định khả năng phản ứng ngang của các loài với FKN khi cynomolgus. Khả năng làm trung hòa, ái lực gắn kết và khả năng phản ứng ngang của các loài với FKN khi cynomolgus được tổng kết trong Fig.2. Thể đơn dòng 3A5-2 thể hiện hoạt tính làm trung hòa cao nhất và ái lực gắn kết cao nhất với hFKN. Thể đơn dòng 3A5-2 thể hiện khả năng phản ứng bằng với FKN khi cynomolgus và hFKN. Do đó, thể đơn dòng 3A5-2 được chọn làm đối tượng để làm giống người.

Thử nghiệm hóa ứng động được thực hiện như sau. Các tế bào được đặt vào các giếng phía trên của đĩa nuôi cấy transwell (MultiScreen-MIC Plate, 5,0µm, Millipore, Catalog No. MAMIC 5S10) với phổi tử trong giếng phía dưới. Thứ nhất, FKN của người tái tổ hợp (R&D Systems, Catalog No. 362-CX/CF) (nồng độ cuối cùng 33ng/ml) (Fig.1) được ủ trước với các kháng thể được tinh chế ở các nồng độ khác nhau (từ 0 đến 10µg/ml) ở nhiệt độ trong phòng. Chế phẩm chứa các hợp phần sau đây: 10x dung dịch chemokin, 15µl/giếng; 10x mAb được tinh chế, 15µl/giếng; và 1x chất đệm hóa ứng động (0,5% BSA, 0,5% FBS, 20mM HEPES (độ pH = 7,4), 50µM 2-mercaptoetanol trong RPMI1640 (Invitrogen)), 120µl/giếng. Sau 30 phút, tế bào B300.19 được chuyển nhiễm với CX3CR1 (2×10^5 tế bào/75µl) được áp dụng vào các giếng phía trên và được ủ

trong thiết bị ủ 5%-CO₂ ở 37°C trong 4 giờ. Sau khi ủ, thu hoạch 150µl dung dịch của các giếng phía dưới, cố định với 50µl 4% PFA/PBS, và 30µl mẫu được áp dụng vào thiết bị phân tích tế bào FACSCantoII để đếm các tế bào được di trú.

Các thử nghiệm BIACORE® được thực hiện như sau. Protein-A/G tái tổ hợp (Pierce Chemical) được làm cố định trên chip cảm biến BIACORE® (CM5) mà được hoạt hóa trước với chất phản ứng cặp đôi amin (GE Healthcare). Các mAb được tinh chế được bổ sung vào chip cảm biến ở nồng độ 0,2µg/ml. Các kháng nguyên có thể hòa tan (FKN có thể hòa tan được tiếp hợp với phosphatase kiềm được tiết (SEAP) hoặc SEAP protein đối chứng) được bổ sung vào các chip cảm biến ở các nồng độ khác nhau (từ 0 đến 200nM). Sự kết hợp của các kháng nguyên được bổ sung với các mAb được bắt trên các chip cảm biến được kiểm soát liên tục và đáp ứng gắn kết tương đối với các kháng nguyên được xác định bằng cách sử dụng hệ BIACORE® A100 (GE Healthcare).

ELISA được thực hiện như sau. Kháng thể đa dòng kháng IgG thỏ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Catalog No. 711-005-152) được phủ lên các giếng của đĩa 96 giếng (Nunc, Catalog No. 442402). Sau khi ủ qua đêm ở 4°C, phong bế các giếng với 1x Block-Ace (DainipponPharma) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa ba lần với 0,05% Tween 20/PBS, 10nM kháng thể đa dòng thỏ kháng PLAP (Biomeda) được bổ sung vào các giếng (50µl/giếng). Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và rửa ba lần như được mô tả trên đây, thêm dịch nổi môi trường nuôi cấy chứa hFKN-SEAP hoặc FKN-SEAP khỉ cynomolgus vào (nồng độ cuối cùng 1nM) các giếng và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa ba lần, thêm mAb kháng hFKN được tinh chế vào các giếng ở các nồng độ khác nhau (từ 0 đến 10µg/ml). Sau khi ủ trong 1 giờ và rửa ba lần, thêm kháng thể horseradish peroxidaza-được tiếp hợp kháng IgG chuột (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Catalog No. 715-036-151) vào ở 0,16µg/ml (50µl/giếng) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa ba lần, thêm dung dịch TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) vào các

giếng và cho phép ủ trong 15-30 phút. Thêm thể tích cân bằng của dung dịch làm ngừng ($2M\ H_2SO_4$) vào các giếng và mật độ tùy ý ở 450nm được đọc bằng thiết bị đọc vi đĩa (Arvo, PerkinElmer).

hFKN-SEAP có thể hòa tan được điều chế như sau. ADN bổ trợ mã hóa vùng ngoại bào của hFKN được khuếch đại với đoạn môi 5'-SalI-hFKN (CGCGTCGACGCCACCAT-GGCTCCGATATCTCTGTC; SEQ ID NO: 2) và đoạn môi 3'-NotI-hFKN (GCGGGCG-GCCGCCCTCCGGGTGGCAGCCTGGG; SEQ ID NO: 3) và được tạo đơn dòng vào vector pcDNA3.1 (+) dSalI SEAP chứa SEAP ADN bổ trợ. Vector biểu hiện chứa hFKN-SEAP được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293EBNA (HEK293E) (Invitrogen). Các tế bào HEK293E được ủ với DMEM (Invitrogen) được bổ sung với 10% huyết thanh bào thai bò vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Vào ngày chuyển nhiễm, môi trường được trao đổi với môi trường không huyết thanh OPTI-MEM II (Invitrogen). Vector biểu hiện được chuyển nhiễm với TransIT LT1 (TAKARA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau 3 ngày ủ ($5\%\ CO_2$ ở $37^\circ C$), thu hoạch dịch nổi môi trường nuôi cấy. Nồng độ SEAP protein được xác định bằng cách sử dụng Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Kit 2.0 (Clontech).

FKN-SEAP khỉ cynomolgus có thể hòa tan được điều chế như sau. ADN bổ trợ mã hóa vùng ngoại bào của FKN khỉ cynomolgus được khuếch đại với đoạn môi 5'-XhoI-FKN khỉ cynomolgus (GCGCTCGAGGCCACCATGGCTCCGATA-TCTCTGTCGTGG; SEQ ID NO: 4) và đoạn môi 3'-NotI- FKN khỉ cynomolgus (CGCGGCGGCCGCGGTGGCAGCCTGGGAGTCAGGGAC; SEQ ID NO: 5) và được tạo đơn dòng vào pENTR1A (Invitrogen) chứa SEAP ADN bổ trợ. Mảnh mã hóa FKN và SEAP khỉ cynomolgus được chuyển vào pcDNA3.1 chứa cắt xét B bằng cách sử dụng hệ GATEWAY (Invitrogen). Dịch nổi môi trường nuôi cấy chứa FKN-SEAP khỉ cynomolgus được điều chế như được mô tả trên đây.

Ví dụ 3. Tạo đơn dòng ADN bổ trợ vùng biến đổi của các chuỗi nặng và nhẹ của mAb thể đơn dòng 3A5-2 chuột kháng hFKN

Các ADN bổ trợ của các chuỗi nặng và nhẹ của thể đơn dòng 3A5-2 được khuếch đại bởi RT-PCR. Tổng ARN được chiết từ thể lai của thể đơn dòng 3A5-2 với RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Bằng cách sử dụng tổng ARN, các ADN bổ trợ được tổng hợp bằng cách sử dụng kit tổng hợp ADN bổ trợ (TAKARA) và được khuếch đại với đoạn mồi 5'-Mm-HC-Leader1 (GGGATGGRATGSAG-CTGKGT MATSCTCTT; SEQ ID NO: 6), đoạn mồi 5'- Mm-HC-Leader2 (GGGATGRA-CTTCGGGYTGAGCTKGGTTTT; SEQ ID NO: 7), hoặc đoạn mồi 5'- Mm-HC-Leader3 (GGGATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT; SEQ ID NO: 8) và đoạn mồi 3'- Mm-IgG2a-CH3-R (TCATT TACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTCTTAGTC; SEQ ID NO: 9) đối với chuỗi nặng và đoạn mồi 5'- Mm-LC-Leader1 (GGGATGGAGACAGACACA-CTCCTGCTAT; SEQ ID NO: 10) hoặc đoạn mồi 5'-Mm-LC-Leader2 (GGGATGGATTTT-CAGGTGCAGATTTTCAG; SEQ ID NO: 11) hoặc đoạn mồi 5'- Mm-LC-Leader3 (GGGATGRAGTCACAKACYCAGGTCTTYRTA; SEQ ID NO: 12) hoặc đoạn mồi 5'- Mm-LC-Leader4 (GGGATGAGGKCCCCWGCTCAGYTYCTKGGR; SEQ ID NO: 13) hoặc đoạn mồi 5'- Mm-LC-Leader5 (GGGATGAAGTTGGCTGTTAGGCTGTTG; SEQ ID NO: 14) và đoạn mồi 3'- Mm-Ckappa-R (CTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTC; SEQ ID NO: 15) đối với chuỗi nhẹ, tương ứng. Các ADN bổ trợ được khuếch đại được tạo dưới đơn dòng vào vector pCR2.1 (Invitrogen). Phân tích các trình tự này bằng cách sử dụng ABI3130XL. Toàn bộ chiều dài chuỗi nặng và phiên bản được cắt 5' của chuỗi L là thu được. Để khuếch đại vùng được cắt của chuỗi L và nhận biết chính xác các trình tự dẫn đầu, khuếch đại nhanh các đầu 5' của ADN bổ trợ (5'-RACE) được thực hiện. ADN sợi kép được điều chế bằng cách sử dụng kit tổng hợp ADN bổ trợ (TAKARA) và đầu thích hợp 5' (ad29S; ACATCACTC-CGT (SEQ ID NO: 16) và as29AS; ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGC-

GTTGATACTTCAGCGTAGCT (SEQ ID NO: 17) được nung) được bổ sung vào. ADN bổ trợ được khuếch đại với đoạn môi 5'-PCR1 (GTATCAACGCAGAGATACGTCGACGG; SEQ ID NO: 18) đối với PCR thứ nhất và đoạn môi 5'-PCR4 (AGCTACGCTGAAGTATCAACGC-AG-AG; SEQ ID NO: 19) đối với PCR thứ hai và đoạn môi 3' HC RACE _1 (GTACGGA-GTACTCCAAAAATGTTG; SEQ ID NO: 20) đối với PCR thứ nhất hoặc đoạn môi 3' HC RACE _2 (TCTTCAGGCTGCAGGCTGATGATC; SEQ ID NO: 21) đối với PCR thứ hai đối với chuỗi H, đoạn môi 3' LC RACE _3 (AAATCTTCAGGCTGCAGGCTGTTG; SEQ ID NO: 22) đối với PCR thứ nhất hoặc đoạn môi 3' LC RACE _4 (CTGTTGATCTTGAGAGAATAT-TGTG; SEQ ID NO: 23) đối với PCR thứ hai đối với chuỗi L, tương ứng. Các ADN bổ trợ được khuếch đại được tạo dưới đơn dòng và được tạo trình tự như được nêu trên đây. Các trình tự được nhận biết của vùng biến đổi là như sau.

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng (H):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTG
GGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACA
AACTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTG
AGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGTCCTAAGTTCAAT
GAGAGGTTCAAGGGCAAGACCACACTGACTGCAGACAAGTCCTCAA
ACACAGCCTACATGTTGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAAGACTCTGCG
ATCTATTTCTGTGCAACTGGGCCCACTGATGGCGACTACTTTGACTAC
TGGGGCCAGGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 24)

Trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (L):

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGT
GGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGCGGGAATATTCAC
AATTTTTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGTT
CCTGGTCTATAATGAAAAAACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGC
CTGCAGCCTGAAGATTTTGGGATTTATTTCTGTCAACAGTTTTGGAGT

ACTCCGTATACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 25)

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (H):

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQG
LEWIGWIYPGDGSPKFNERFKGKTTLTADKSSNTAYMLLSSLTSEDSAIY
FCATGPTDGDYFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 26)

Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (L):

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNFLAWYQQKQKGKSPQ
FLVYNEKTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGIYFCQQFWSTP
YTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 27)

Ví dụ 4. Xác định mAb kháng FKN được làm giống như của người từ thể đơn dòng 3A5-2

mAb chuột kháng hFKN, thể đơn dòng 3A5-2, được làm giống như của người theo phương pháp ghép vùng quyết định phân bù (CDR) (Kontermann and Dübel, Antibody Engineering, Springer Lab Manual (2001) và Tsurushita et al., Methods 36:69-83 (2005)). Trình tự axit amin của các CDR là như sau.

CDR-H1: NYYIH (SEQ ID NO: 28)

CDR-H2: WIYPGDGSPKFNERFKG (SEQ ID NO: 29)

CDR-H3: GPTDGDYFDY (SEQ ID NO: 30)

CDR-L1: RASGNIHNFLA (SEQ ID NO: 31)

CDR-L2: NEKTLAD (SEQ ID NO: 32)

CDR-L3: QQFWSTPYT (SEQ ID NO: 33)

Các khung thụ thể của người được chọn trong số các đoạn vùng biến đổi của người. Các CDR được nhận biết của 3A5-2 được ghép vào khung thụ thể của người được chọn. Các trình tự được làm giống như của người được xác định là như sau.

Chuỗi H (được xác định là H3; SEQ ID NO: 36)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVKQAPGQ
GLEWIGWIYPGDGSPKFNERFKGRTTTLADKSTNTAYMLLSSLRSDDTA
VYFCATGPTDGDYFDYWGQGTTVTVSS

Chuỗi H (được xác định là H3-2; SEQ ID NO: 37)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVKQAPGQ
GLEWIGWIYPGDGSPKFNERFKGRTTTLADKSTNTAYMLLSSLRSEDTA
VYFCATGPTDGDYFDYWGQGTTVTVSS

Chuỗi L (được xác định là L2; SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNFLAWYQQKPGKAPK
FLVYNEKTLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYFCQQFWSTP
YTFGGGTKVEIK

Chuỗi H (được xác định là H4; SEQ ID NO: 39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ
GLEWIGWIYPGDGSPKFNERFKGRTTLTRDKSTNTAYMELSSLRSDDTA
VYFCATGPTDGDYFDYWGQGTTVTVSS

Trình tự dòng mầm đối với chuỗi H (SEQ ID NO: 40)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTXXXXXWVRQAPGQ
GLEWMGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXRVMTMTRDTSTSTAYMELSSLRSE
DTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXWGQGTTVTVSS

Trình tự dòng mầm đối với chuỗi L (SEQ ID NO: 41)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCXXXXXXXXXXXXXWYQQKPGKAP
KLLIYXXXXXXXXXGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCXXXXXX
XXXFGGGGTKVEIK

Chuỗi H (được xác định là HK2; SEQ ID NO: 42)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ
GLEWIGWIYPGDGSPKFNERFKGRTTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTA
VYFCARGPTDGDYFDYWGQGTTVTVSS

Chuỗi H (được xác định là HK3; SEQ ID NO: 43)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ
GLEWIGWIYPGDGSPKFNERFKGRTTTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTA
VYFCARGPTDGDYFDYWGQGTTVTVSS

Chuỗi L (được xác định là L4; SEQ ID NO: 44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNFLAWYQQKPGKAPK
LLIYNEKTLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQFWSTPY
TFGGGTKVEIK

Chuỗi L (được xác định là L5; SEQ ID NO: 45)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNFLAWYQQKPGKAPK
LLIYNEKTLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYFCQQFWSTPY
TFGGGTKVEIK

Tất cả trình tự được làm giống như của người là được sắp xếp (các Fig.3 và Fig.4).

Ví dụ 5. Cấu trúc của các vector biểu hiện của mAb kháng hFKN được làm giống như của người

Để chọn các trình tự dẫn đầu để biểu hiện mAb được làm giống như của người, các đoạn dòng mầm được tìm kiếm dựa trên sự tương tự với AAA68427.1 và ABU90602.1. Các đoạn VH1-1-18 và VKI-O12 là tương tự nhất với AAA68427.1 và ABU90602.1, tương ứng. Các trình tự dẫn đầu của chúng được sử dụng để biểu hiện mAb được làm giống như của người. Các trình tự dẫn đầu của chúng là như sau.

Trình tự axit amin chuỗi H (SEQ ID NO: 46)

MDWTWSILFLVAAPTGAHS

Trình tự nucleotit chuỗi H

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCACCAA
CAGGTGCCCACTCC (đối với H3 và H3-2; SEQ ID NO: 47)

ATGGACTGGACATGGTCCATCCTGTTCTTGGTGGCCGCTCCAAC
TGGCGCACACTCT (đối với HK2 và HK3; SEQ ID NO: 48)

Trình tự axit amin chuỗi L (SEQ ID NO: 49)

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARC

Trình tự nucleotit chuỗi L (SEQ ID NO: 50)

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTAC
TCTGGCTCCGAGGTGCCAGATGT

Vùng biến đổi của mAb kháng hFKN được làm giống như của người được xác định với trình tự dẫn đầu được mô tả trên đây được tạo ra bằng PCR với các đoạn mồi sau đây.

Đối với chuỗi nặng H3

Đoạn mồi h3A5-2_VH3-1 (SEQ ID NO: 51):

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCACCAA
CAGGTGC

Đoạn mồi h3A5-2_VH3-2R (SEQ ID NO: 52):

CCAGACTGCACCAGCTGCACCTGGGAGTGGGCACCTGTTGGTG
CTGCCAC

Đoạn mồi h3A5-2_VH3-3 (SEQ ID NO: 53):

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGG
CCTCAGT

Đoạn mồi h3A5-2_VH3-4R (SEQ ID NO: 54):

GTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAG
GCTTCTT

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-5 (SEQ ID NO: 55):

TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCAACTACTATATACTG
GGTGAA

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-6R (SEQ ID NO: 56):

ATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCCTGCTTCACCCAGTGTAT
ATAGTA

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-7 (SEQ ID NO: 57):

GGACAAGGGCTTGAGTGGATAGGATGGATTTATCCTGGAGATG
GTAGTCC

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-8R (SEQ ID NO: 58):

GTCCTGCCCTTGAACCTCTCATTGAACTTAGGACTACCATCTCC
AGGATA

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-9 (SEQ ID NO: 59):

GAGAGGTTCAAGGGCAGGACCACCCTGACCGCAGACAAGTCC
ACGAACAC

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-10R (SEQ ID NO: 60):

GATCTCAGGCTGCTCAGCAACATGTAGGCTGTGTTCGTGGACTT
GTCTGC

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-11 (SEQ ID NO: 61):

TTGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTTCT
GTGCGAC

Đoạn mỗi h3A5-2_VH3-12R (SEQ ID NO: 62):

TAGTCAAAGTAGTCGCCATCAGTGGGCCCTGTCGCACAGAAAT
ACACGGC

Đoạn mồi h3A5-2 VH3-13 (SEQ ID NO: 63):

GATGGCGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTC

Đoạn mồi h3A5-2_R (SEQ ID NO: 64):

GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAAGAGACGGTGACCGTG
GTCCC

Đối với chuỗi nhẹ L2

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-1 (SEQ ID NO: 65):

GCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCC
TGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGAT

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-2R (SEQ ID NO: 66):

TCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATGGAGACTGGGTCATCTGG
ATGTCACATCTGGCACCTCGGAGCCAG

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-3 (SEQ ID NO: 67):

CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCG
AGCAAGCGGGAATATTCACAATTTTTT

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-4R (SEQ ID NO: 68):

GAACTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTGTTGATACCATGCTAAAA
AATTGTGAATATTCCCGCTTGCTCGG

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-5 (SEQ ID NO: 69):

CAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGGTCTATAATGAAAAAACCTT
AGCAGATGGGGTCCCATCAAGGTTGAG

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-6R (SEQ ID NO: 70):

GTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTATATTGTGTCCCAGATCC
ACTGCCACTGAACCTTGATGGGACCCC

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-7 (SEQ ID NO: 71):

CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCGACCTACTTCT
GTCAACAGTTTTGGAGTACTCCGTAT

Đoạn mồi h3A5-2_VL2-8R (SEQ ID NO: 72):

TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAACGTATACGGAGTAC
TCCAAAACCTGTTGACAGAA

h3A5-2_VL-R (SEQ ID NO: 73):

GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

H3 và L2 được sinh ra được khuếch đại bởi PCR với đoạn mồi 5'-Eco-Sal-h3A5-2_VH_F

(GCGAATTCGTCGACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTT-
CTTG; SEQ ID NO: 74) và 3'-NheI-h3A5-2_VH_R

(CGCGCTAGCTGAAGAGAC-GGTGACCGTGGT-CCC; SEQ ID NO: 75)

đối với H3 và đoạn mồi 5'-h3A5-2_VL_SalI-kozac_F

(GCGGTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCC; SEQ ID NO: 76) và

đoạn mồi 3'-h3A5-2_VL-R

(GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATCTCCAC-
CTTGGTCCCTCC; SEQ ID NO: 77) đối với L2, tương ứng.

H4 được sinh ra bởi Genscript USA Inc. Trình tự của H4 là như sau.

H4 (SEQ ID NO: 78):

GAATTCGTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTGT
TCCTGGTGGCCGCTCCAACCTGGCGCACACTCTCAGGTGCAGCTGGTG
CAGAGTGGCGCTGAGGTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTGT
CCTGCAAAGCCAGCGGATACACCTTCACCAACTACTATATTCATTGG
GTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGATGGATCT
ACCCAGGGGACGGTTCCTAAGTTCAACGAAAGGTTTAAAGGCCGG
ACCACACTGACCAGGGATAAGTCAACCAATACAGCTTACATGGAAC
GTCCAGCCTGCGCTCTGACGATACAGCAGTGTATTTCTGTGCCACTG

GGCCAACCGACGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGAACTACC
GTGACCGTGTCTAGTGCTAGC

Vùng biến đổi của HK2 được sinh ra bằng cách đột biến điểm với PCR từ H4 với các đoạn mỗi sau đây.

Đoạn mỗi 3A5-2_HKG2_sal24F (SEQ ID NO: 79):

CGCGTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTG

Đoạn mỗi h3A5-2_HKG2_280F (SEQ ID NO: 80):

ATGACCGCCGATACCTCAACCTCCACAGCTTACATGGAA

Đoạn mỗi h3A5-2_HKG2_300R (SEQ ID NO: 81):

GGTTGAGGTATCGGCGGTCATTGTGGTCCG

Đoạn mỗi h3A5-2_HKG2_340F (SEQ ID NO: 82):

GAGGATACAGCAGTGTATTTCTGTGCCCCGGGGGCCAACC

Đoạn mỗi h3A5-2_HKG2_370R (SEQ ID NO: 83):

GGCACAGAAATACACTGCTGTATCCTCAGAGCGCAG

h3A5-2_HKG2_Nhe24R (SEQ ID NO: 84):

CGCGCTAGCACTAGACACGGTCACGGTAGTTCC

Vùng biến đổi của HK3 được sinh ra bằng cách đột biến điểm với PCR từ HK2 với các đoạn mỗi như sau.

Đoạn mỗi h3A5-2_HKG2_sal24F (SEQ ID NO: 85):

CGCGTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTG

Đoạn mỗi HKG3_R (SEQ ID NO: 86):

TTGACTTATCGGCGGTCAGTGTGGTCCGGCCTTTAAACCTTTC

Đoạn mỗi HKG3_F (SEQ ID NO: 87):

AACTGACCGCCGATAAGTCAACCTCCACAGCTTACATGGAA

Đoạn mỗi h3A5-2_HKG2_Nhe24R (SEQ ID NO: 88):

CGCGCTAGCACTAGACACGGTCACGGTAGTTCC

Vùng biến đổi của L4 được sinh ra bằng các đột biến điểm với PCR từ L2 với đoạn mỗi như sau.

Đoạn mỗi h3A5-2_VL4_sal24F (SEQ ID NO:89):

CGCGTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG

Đoạn mỗi h3A5-2_VL4_200R (SEQ ID NO: 90):

CAGCAGCTTAGGGGCTTTCCTGGTTTCTG

Đoạn mỗi h3A5-2_VL4_190F (SEQ ID NO: 91):

GGGAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTATAATGAAAAA

Đoạn mỗi h3A5-2_VL4_260R (SEQ ID NO: 92):

TGTCCCAGATCCACTGCCACTGAACCTTGA

Đoạn mỗi h3A5-2_VL4_250F (SEQ ID NO: 93):

AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGACTATACTCTCACC

Đoạn mỗi h3A5-2_VL4_BsiW24R (SEQ ID NO: 94):

CGCCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

Vùng biến đổi của L5 được sinh ra bằng các đột biến điểm với PCR từ L4 với các đoạn mỗi như sau.

Đoạn mỗi h3A5-2_VL4_sal24F (SEQ ID NO: 95):

CGCGTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG

Đoạn mỗi VL5_R (SEQ ID NO: 96):

GGTGAGAGTATACTGTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAAC

Đoạn mỗi VL5_F (SEQ ID NO: 97):

GGATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGCAGTCTG

h3A5-2_VL4_BsiW24R (SEQ ID NO: 98):

cgcCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

Các vùng cố định của IgG2 và Igk được khuếch đại với đoạn mồi 5'-NheI-IgG2_F (CGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC; SEQ ID NO: 99) và đoạn mồi 3'-EcoRV-IgG2_R (CGCGATATCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG; SEQ ID NO: 100) đối với IgG2 và đoạn mồi 5'-BsiWI-Igk_F (CGCCGTACGGTGGCTGCACCA-TCTGTCTTCATC; SEQ ID NO: 101) và đoạn mồi 3'-EcoRV-Igk_R (CGCGATATCCT-AACACTCTCCCCTGTTGAAGCT; SEQ ID NO: 102) đối với Igk, tương ứng. Các vùng cố định được khuếch đại được tạo dưới đơn dòng vào pENTR1A dNotI trong đó NotI được loại bỏ.

Các vùng biến đổi được sinh ra được tạo đơn dòng vào pENTR1A-IgG2 hoặc pENTR1A-Igk bằng cách sử dụng các vị trí SalI-NheI đối với chuỗi nặng hoặc vị trí SalI-BsiWI đối với chuỗi nhẹ, tương ứng. Trong trường hợp của L2, vùng cố định của Igk được khuếch đại với đoạn mồi 5'-hIGK_F (CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC; SEQ ID NO: 103) và đoạn mồi 3'-hIGK_NotI-R (CGCGCGGCCGCGCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT; SEQ ID NO: 104). Vùng cố định Igk được khuếch đại và L2 được sinh ra được kết hợp bởi PCR và được tạo đơn dòng vào pENTR1A. Vùng biến đổi được tạo dưới đơn dòng và vùng cố định được chuyển vào pEE6.4 hoặc pEE12.4 (Lonza) đối với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, tương ứng, bằng cách sử dụng hệ GATEWAY (Invitrogen).

H3-2 được sinh ra bằng đột biến điểm với GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System từ pENTR1A-H3-IgG2 với đoạn mồi 5'-h3A5-2_H3-2_300F (TTGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC; SEQ ID NO: 105) và đoạn mồi 3'-h3A5-2_H3-2_320R (AGATCTCAGGCTGCTCAGCAACATGTAGGC; SEQ ID NO: 106). GeneTailor Site-Directed Mutagenesis được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vùng biến đổi được đột biến và vùng cố định được chuyển vào pEE6.4 như được mô tả trên đây.

Ví dụ 6. Sản xuất mAb kháng hFKN được làm giống như của người

Các vector biểu hiện của các chuỗi nặng và nhẹ của các mAb kháng hFKN được làm giống như của người được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293E. Vào ngày chuyển nhiễm, các tế bào HEK293E được ghép vào DMEM (Invitrogen) với 10% huyết thanh bào thai bò. Sau khi ủ trong 5 giờ, chuyển nhiễm hỗn hợp gồm các vector biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ với Lipofectamine 2000 (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vào ngày chuyển nhiễm tiếp theo, môi trường được thay đổi thành 293 Serum-Free Media (SFM) II (Invitrogen). Sau khi ủ trong 5 ngày ở 37°C, thu hoạch dịch nổi môi trường nuôi cấy. Đối với các thử nghiệm BIACORE®, dịch nổi được thu hoạch được sử dụng trực tiếp. Đối với các thử nghiệm hóa ứng động, dịch nổi môi trường nuôi cấy được tinh chế với cột protein A Sepharose tái tổ hợp (Pharmacia).

Ví dụ 7. Sản xuất mAb 3A5-2 khảm chuột người

Vùng biến đổi của chuỗi nặng 3A5-2 của chuột được khuếch đại với đoạn môi 5'-EcoRI-SalI-3A5-2 VH (GCGGAATTCGTCGACGCCACCATGCGATGGAGCTGGA-TC; SEQ ID NO: 107) và đoạn môi 3'-IgG được gộp lên 3A5-2 VH (GACCGATGGGCC-CTTGGTGGAGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC; SEQ ID NO: 108). Vùng cố định IgG2 của người được khuếch đại với đoạn môi 5'-hIgG2 (GCCTCCACCA-AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG; SEQ ID NO: 109) và 3'-NotI-hIgG2 (CGCGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG; SEQ ID NO: 110). 3A5-2 VH được khuếch đại và vùng cố định IgG2 của người được kết hợp với PCR và được tạo đơn dòng vào pCX-IRES-bsr, mà có gen kháng blasticidin đối với sự chọn lọc tế bào. Vùng cố định chuỗi nhẹ của 3A5-2 chuột được khuếch đại với đoạn môi 5'-3A_VL-SalI-kozac_F (GCGGTCGACGCCACCATGAGTGTGCTCACTCAG; SEQ ID NO: 111) và đoạn môi 3'-3A-IgG1,2_VH-R (GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTT

ATTTCAGCTTGGTCCCCCCT; SEQ ID NO: 112). Vùng cố định Igk của người được khuếch đại với đoạn mồi 5'-hIGK_F (CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC; SEQ ID NO: 113) và 3'-hIGK_NotI-R (CGCGCGGCCGCCTAACACTCTCCCCTGTTGA-AGCTCTT; SEQ ID NO: 114). 3A5-2 VH được khuếch đại và vùng cố định IgG2 của người được kết hợp với PCR và được tạo đơn dòng vào pMX-IRES-puro, mà có gen kháng puromycin đối với sự chọn lọc tế bào.

Vector biểu hiện của chuỗi nhẹ khảm được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293E với pE-Eco và pGp (TAKARA) để đóng gói retrovirus. Các tế bào HEK293E được ghép với DMEM (Invitrogen) với 10% FBS vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Vào ngày chuyển nhiễm, các vector được chuyển nhiễm với TranIT LT1 (TAKARA). Sau khi ủ trong 3 ngày, dịch nổi môi trường nuôi cấy chứa retrovirus được thu hoạch và được bổ sung vào tế bào B300.19. Sau khi ủ trong 8 giờ, loại bỏ dịch nổi môi trường nuôi cấy và bổ sung RPMI1640 (Invitrogen) với 10% FBS vào. Sau khi nuôi cấy trong 2 ngày, thêm puromycin vào để chọn tế bào được nhiễm. Tế bào được chọn sau đó được làm nhiễm với retrovirus tái tổ hợp khác mang chuỗi nặng khảm, mà được tạo thành bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như được mô tả đối với chuỗi nhẹ. Sau khi chọn với blasticidin, tế bào được chọn kép được nuôi cấy với SF-O (Sanko Junyaku) chứa 8mM Glutamax, 55 μ M 2-mercaptoethanol, 1x cholesterol (Invitrogen) trong Integra CELLline (Integra Bioscience). Tinh chế dịch nổi môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng cột protein A Sepharose tái tổ hợp (Pharmacia) đối với thử nghiệm hóa ứng động và thử nghiệm BIACORE®.

Ví dụ 8. Phân tích mAb kháng hFKN được làm giống như của người

Các mAb kháng hFKN được làm giống như của người được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa ứng động để xác định hoạt tính làm trung hòa và thử nghiệm BIACORE® để xác định ái lực gắn kết với hFKN và FKN khi cynomolgus. Các dữ liệu và kết quả đại diện từ ba thử nghiệm hóa ứng động độc lập được tổng kết trong Fig.5 và được thể hiện trong các Fig.6A đến Fig.6B,

Fig.7A đến Fig.7D, và Fig.8A đến Fig.8F. Tất cả kết hợp của H3 và H3-2 đối với chuỗi nặng với L2 và L4 đối với chuỗi nhẹ được làm giống như của người một cách thành công như các mAb thể hiện hoạt tính làm trung hòa tương tự với mAb khảm. Tuy nhiên, HK2, mà được điều chế bằng cách sử dụng các gốc khóa chặt chẽ, thể hiện hoạt tính làm trung hòa giảm kết hợp với L2 hoặc L4. Các kết quả của thử nghiệm BIACORE[®] được tổng kết trong Fig.9 và Fig.10A đến Fig.10C. Tất cả kết hợp của H3 và H3-2 đối với chuỗi nặng với L2 và L4 đối với chuỗi nhẹ thể hiện các mức độ tương tự của ái lực so với mAb khảm. Mặt khác, HK2L4 thể hiện ái lực gắn kết thấp hơn so với các kháng thể khác. Các kết quả này đề xuất rằng 3A5-2 không được làm giống như của người một cách hiệu quả theo phương pháp chung bằng cách sử dụng sự giống nhau của gốc khóa thông thường, đặc biệt là trong trường hợp chuỗi nặng.

Các thử nghiệm hóa ứng động được thực hiện như sau. Đặt các tế bào vào các giếng phía trên của đĩa nuôi cấy transwell (MultiScreen-MIC Plate, 5,0µm, Millipore, Catalog No. MAMIC 5S10) với phối tử trong các giếng phía dưới. Thứ nhất, FKN người tái tổ hợp (R&D Systems, Catalog No. 362-CX/CF) (10ng/ml nồng độ cuối cùng) được bổ sung với các kháng thể được tinh chế ở các nồng độ khác nhau (từ 0 đến 10 µg/ml) vào các giếng phía dưới. Chế phẩm chứa các hợp phần sau đây: 3x dung dịch chemokin, 50µl/giếng; 1,5x mAb được tinh chế, 100µl/giếng; chemokin và các kháng thể được tinh chế được pha loãng với 1x chất đệm hóa ứng động (được mô tả trên đây). Các tế bào B300.19 được chuyển nhiễm với CX3CR1 (2×10^5 tế bào/75µl) được áp dụng cùng với kháng thể được tinh chế ở các nồng độ khác nhau (từ 0 đến 10µg/ml) vào các giếng phía trên. Chế phẩm chứa các hợp phần sau đây: 3x huyền phù tế bào, 25µl/giếng; 1,5x dung dịch mAb được tinh chế, 50µl/giếng; tế bào và kháng thể được tinh chế được pha loãng với 1x chất đệm hóa ứng động. Thử nghiệm hóa ứng động được thực hiện trong thiết bị ủ 5%-CO₂ ở 37°C trong 4 giờ. Sau khi ủ, thu hoạch 150µl giếng phía dưới, cố định với 50µl 4% PFA/PBS, và 30µl mẫu được áp dụng vào thiết bị phân tích tế bào FACSCantoII để đếm tế bào được di trú.

Thử nghiệm BIACORE® được thực hiện như được mô tả trên đây. Tuy nhiên, đối với các mAb được làm giống như của người và khảm, mAb của chuột kháng IgG của người (GE Healthcare) được sử dụng làm kháng thể bắt trên chip điện tử.

Ví dụ 9. Tạo bản đồ epitop bằng cách sử dụng các peptit tổng hợp từ miền FKN chemokine

Tạo bản đồ epitop bằng cách sử dụng thư viện peptit tổng hợp xếp chồng từ miền FKN chemokine được thực hiện. Hai mươi một loại 15 peptit gốc được tổng hợp bởi Sigma Genosys. Hòa tan peptit thành 10mg/ml với DMSO. Bao ngoài các peptit này (50 µg/ml) trên đĩa ELISA (Nunc) qua đêm ở 4°C. Loại bỏ dung dịch peptit và thêm dung dịch PBS chứa 1% BlockAce (Dainippon Pharma) vào mỗi giếng, ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và rửa với nước muối đệm Tris (độ pH = 7,4) chứa 0,05% Tween 20 (dung dịch rửa). Dung dịch kháng thể H3-2L4 (50µg/ml) được bổ sung vào các giếng và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ dung dịch kháng thể và rửa với dung dịch rửa. Dung dịch kháng thể kháng IgG của người được đánh dấu peroxidaza (Zymed; 400 ng/ml) được bổ sung vào các giếng và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ dung dịch kháng thể và rửa với dung dịch rửa. Dung dịch TMBZ (Sigma) được bổ sung vào mỗi giếng và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Kết thúc phản ứng với 1N dung dịch H₂SO₄ và xác định sự hấp thụ ở 450-650 nm.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.11. Kháng thể H3-2L4 được cho phản ứng với các peptit từ vùng tận cùng N và ở giữa của FKN người.

Ví dụ 10. Tạo đột biến thay thế alanin hoặc serin

Các đột biến alanin hoặc serin của hFKN-SEAP được tạo thành như sau. ADN bổ trợ mã hóa vùng ngoại bào của hFKN được phân lập từ vector biểu hiện của hFKN-SEAP, pcDNA3.1 (+) hFKN-SEAP, bằng cách sử dụng enzym giới hạn SalI/NotI và được tạo đơn dòng vào vector pENTR1A_dSEAP-(His)10 chứa SEAP ADN bổ trợ (pENTR1A được mua của Invitrogen). Các đột biến thay thế

alanin hoặc serin được thực hiện bằng cách sử dụng GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mảnh ADN bổ trợ được gây đột biến của hFKN-SEAP được chuyển nhiễm vào vector pcDNA3.1 (+)_cát xét B (cát xét B được mua của Invitrogen) bằng cách sử dụng hệ Gateway (Invitrogen). Các vector biểu hiện của đột biến thay thế alanin hoặc serin của hFKN-SEAP được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293EBNA (HEK293E) (Invitrogen). Tế bào HEK293E được ghép với DMEM (Invitrogen) được bổ sung với 10% huyết thanh bào thai bò vào ngày trước khi chuyển nhiễm. Các vector biểu hiện được chuyển nhiễm với TransIT LT1 (Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau 3 ngày ủ (5% CO₂ ở 37°C), thu hoạch dịch nuôi môi trường nuôi cấy. Xác định nồng độ của SEAP protein bằng cách sử dụng Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Kit 2.0 (Clontech).

Ví dụ 11. ELISA đối với tạo bản đồ epitop của hFKN

Mỗi kháng thể đa dòng kháng hFKN (eBioscience) và H3-2L4 được phủ lên các giếng của đĩa ELISA (Nunc) qua đêm ở 4°C. Đối với mỗi giếng, loại bỏ dung dịch kháng thể và PBS chứa 1% albumin huyết thanh bò được bổ sung vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó rửa với nước muối đệm Tris (độ pH = 7,4) chứa 0,05% Tween20 (dung dịch rửa). Đột biến thay thế alanin hoặc serin được pha loãng thành 0,13nM với PBS chứa 1% BSA và 50µl dung dịch được bổ sung vào các giếng của đĩa ELISA và ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ dung dịch đột biến và rửa với dung dịch rửa. Thêm dung dịch p-Nitrophenyl phosphat (Thermo Scientific) vào mỗi giếng và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Kết thúc phản ứng với 1N dung dịch NaOH và xác định sự hấp thụ ở 405 nm. Kết quả được thể hiện trong Fig.12. Đột biến R68A mất khả năng phản ứng đặc hiệu với H3-2L4. Các đột biến khác mà mất khả năng phản ứng với H3-2L4 cũng mất khả năng phản ứng với kháng thể đa dòng. Các kết quả này thể hiện rằng R68 là epitop tối ưu đối với H3-2L4.

Ví dụ 12. Tạo bản đồ epitop của hFKN bằng cách sử dụng BIACORE®

Kháng thể kháng histidin-tag (Betyl) được làm cố định trên chip cảm biến CM5 (GE Healthcare). Pha loãng dung dịch đột biến được thay thế alanin hoặc serin 10 lần với chất đệm HBS-EP (GE Healthcare), nạp vào chip, rửa với HBS-EP, và xác định mức độ gắn kết kháng nguyên. Nạp dung dịch kháng thể đa dòng H3-2L4 và kháng FKN vào chip gắn kết kháng nguyên, rửa với HBS-EP, và xác định mức độ gắn kết kháng nguyên. [Mức độ gắn kết kháng nguyên/Mức độ gắn kết kháng nguyên] được tính toán và giá trị được tính toán đối với mỗi đột biến được so với giá trị của kiểu đại. Các kết quả được thể hiện trong Fig.13.

Ví dụ 13. Khả năng phản ứng của các kháng thể khác với đột biến R68A

Các kháng thể đơn dòng của chuột kháng FKN của người (1F3, 1G1, 2B2, 3D5, 6D1, 7F6) và kháng thể H3-2L4 được phủ lên đĩa ELISA (Nunc) qua đêm ở 4°C. Loại bỏ dung dịch kháng thể. Thêm dung dịch PBS chứa 1% BSA vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và rửa các giếng với nước muối đệm Tris (độ pH = 7,4) chứa 0,05% Tween 20. Dung dịch kiểu đại và R68A đột biến FKN-SEAP-His (1, 0,5, 0,25, 0,125nM) được bổ sung vào các giếng và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Loại bỏ dung dịch kháng nguyên và rửa với dung dịch rửa. Thêm dung dịch p-Nitrophenyl phosphat (Thermo Scientific) vào mỗi giếng và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Kết thúc phản ứng với 1N dung dịch NaOH và xác định sự hấp thụ ở 405nm.

Hoạt tính làm trung hòa của các kháng thể được thử nghiệm dựa trên thử nghiệm hóa ứng động, như được mô tả trên đây. 10nM FKN của người và các nồng độ khác nhau của các kháng thể này được bổ sung vào các giếng phía dưới của đĩa transwell. Trong các giếng phía trên của đĩa, thêm tế bào biểu hiện CX3CR1 vào. Sau khi ủ trong 4 giờ ở 37°C, thu hồi môi trường của các giếng phía dưới và cố định các giếng bằng cách sử dụng 4% dung dịch formaldehyt. Số lượng tế bào được đếm bằng cách sử dụng thiết bị phân tích FACS. Mối quan hệ giữa hoạt tính làm trung hòa và khả năng phản ứng với đột biến R68A được thể hiện trong bảng 1. Các kháng thể mà làm trung hòa mạnh hoạt tính CTX làm mất khả năng phản ứng của chúng với đột biến R68A. Kết quả này thể hiện rằng

R68 của FKN người là vị trí nhận biết khóa đối với các kháng thể mà có thể làm trung hòa hiệu quả chức năng FKN.

Bảng 1. Mối quan hệ giữa gắn kết với đột biến R68A và hoạt tính làm trung hòa

Kháng thể	R68A/kiểu đại (%)	CTX (IC ₅₀ , nM)
1F3	131	12,7
1G1	39	80<
2B2	51	80<
3D5	0	4,09
3H7	0	19,1
6D1	58	80<
7F6	56	80<
H3-2L4	0	0,2

Ví dụ 14. Tạo bản đồ epitop của hFKN bởi NMR

Tinh chế Fab từ kháng thể H3-2L4

100mg dung dịch kháng thể H3-2L4 được tinh chế (20mg/ml dung dịch PBS) được thẩm tách đối với chất đệm 0,1M phosphat (độ pH = 7,0) chứa 2 mM EDTA. Điều chỉnh nồng độ kháng thể đến 15mg/ml với chất đệm thẩm tách và thêm 30mM cystein vào. Thêm 0,2mg papain (Sigma) vào dung dịch kháng thể và ủ trong 14 giờ ở 37°C. Thêm iodoacetamid vào dung dịch để kết thúc phản ứng enzym. Thẩm tách dung dịch kháng thể được tiêu hóa papain đối với dung dịch PBS qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Áp dụng dung dịch này vào cột ProSep vA (Millipore) và gom phân đoạn thông qua dòng chảy. Áp dụng phân đoạn thông qua dòng chảy vào kháng thể kháng IgG Fc người (Jackson ImmunoResearch Laboratories) cố định cột và gom thông qua dòng chảy. Cô đặc phân đoạn thông qua dòng chảy và áp dụng vào Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare) và các phân đoạn chứa mảnh Fab được gom lại. Việc tinh chế

các phân đoạn này được phân tích bởi SDS PAGE và gom các phân đoạn miền Fab.

Nhận biết vị trí gắn kết Fab trên fractalkin

Để nhận biết vị trí gắn kết của Fab trên fractalkin, fractalkin được đánh dấu đồng vị phóng xạ (^2H , ^{15}N và ^2H , ^{13}C , ^{15}N) được điều chế (Mizoue, L et al., *Biochemistry*, 38: 1402-1414 (1999)) và ^{15}N -Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) dựa trên thử nghiệm NMR là được thực hiện. Điều chế các mẫu NMR trong 20mM chất đệm axetat (độ pH = 5,0) và 80% D_2O (thử nghiệm bão hòa ngang) hoặc 5% D_2O (các thử nghiệm khác). Tất cả thử nghiệm NMR được thực hiện trên quang phổ kế 700 MHz Bruker Avance được lắp đặt với đầu dò đông lạnh dưới nhiệt độ 45°C .

Việc bổ sung Fab không được đánh dấu làm thay đổi quang phổ của fractalkin, cho biết sự tương tác giữa fractalkin được đánh dấu và Fab. Các đánh giá sau đó về ^{15}N và $^1\text{H}_\text{N}$ khung của fractalkin được tạo phức hợp với Fab được hoàn thành từ quang phổ 3D HNCA.

Thử nghiệm bão hòa ngang là một trong số các phương pháp NMR chính xác nhất để xác định bề mặt chung gắn kết của các tương tác protein-protein (Takahashi, H et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 7: 220-223 (2000)). Như kết quả của thử nghiệm, cường độ tín hiệu của vài gốc là được giảm theo bức xạ chọn lọc của Fab (Fig.14). Các gốc này được đặt ở hai vùng kề nhau riêng rẽ. Một vùng bao gồm E66-Q69, và vùng khác bao gồm W81-Q87. Hơn nữa, sự thay đổi hóa học của các gốc này bị tác động lớn ngay khi bổ sung Fab, mang các dữ liệu bão hòa ngang (Fig.14). Từ các kết quả này, tác giả sáng chế đã kết luận rằng các vùng này được bao gồm trong bề mặt chung với Fab.

Phương án khác

Từ phần mô tả trên đây, đã rõ ràng rằng các thay đổi và biến đổi có thể được thực hiện theo sáng chế được mô tả ở đây để chấp nhận nó với các ứng dụng và điều kiện khác nhau. Các phương án này cũng nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng fractalkin được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm:

- (a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28;
- (b) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29;
- (c) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30;
- (d) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31;
- (e) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32; và
- (f) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33.

2. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể là kháng thể nguyên vẹn.

3. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin được làm giống như của người.

4. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể này hoặc mảnh gắn kết fractalkin bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 42, hoặc SEQ ID NO: 43, và trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể này hoặc mảnh gắn kết fractalkin bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44, hoặc SEQ ID NO: 45.

5. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin là khảm.

6. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 5, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26, và trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể này bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27.

7. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm vùng cố định của người.
8. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 7, trong đó kháng thể này bao gồm vùng cố định của IgG isotyp.
9. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 8, trong đó kháng thể này bao gồm vùng cố định của IgG2 isotyp.
10. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm vùng Fc đột biến sao cho kháng thể này có tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc hoạt tính phân bù giảm.
11. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 10, trong đó vùng Fc được đột biến ở một hoặc nhiều V234, G237, C131, hoặc C219.
12. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1, trong đó mảnh gắn kết fractalkin được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, và trong đó mảnh gắn kết fractalkin giữ lại tính đặc hiệu gắn kết với fractalkin.
13. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể ức chế sự gắn kết giữa fractalkin và thụ thể chemokin 1 CX3C (CX3CR1).
14. Dược phẩm bao gồm kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1.
15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất mang.
16. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất điều trị bổ sung.
17. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 1.

18. Axit nucleic được phân lập theo điểm 17, trong đó axit nucleic này mã hóa tất cả hoặc một phần chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó.

19. Axit nucleic được phân lập theo điểm 17, trong đó axit nucleic này mã hóa tất cả hoặc một phần chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó.

20. Vector bao gồm axit nucleic được phân lập theo điểm 17.

21. Vector theo điểm 20, trong đó vector này là vector biểu hiện.

22. Tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector theo điểm 20.

23. Tế bào chủ theo điểm 22, trong đó tế bào chủ này bao gồm vector thứ nhất và vector thứ hai, vector thứ nhất bao gồm axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và vector thứ hai bao gồm axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng fractalkin hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó bao gồm:

- (a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28;
- (b) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29;
- (c) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30;
- (d) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31;
- (e) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32; và
- (f) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33.

24. Tế bào chủ theo điểm 23, trong đó sự biểu hiện của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở tế bào chủ này tạo ra kháng thể kháng fractalkin hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó bao gồm:

- (a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28;
- (b) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29;
- (c) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30;
- (d) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32; và

(f) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33.

25. Tế bào chủ theo điểm 22, trong đó tế bào chủ là tế bào chưa có nhân thật.

26. Tế bào chủ theo điểm 22, trong đó tế bào chủ là tế bào có nhân thật.

27. Tế bào chủ theo điểm 26, trong đó tế bào chủ là động vật có vú.

28. Tế bào chủ theo điểm 27, trong đó tế bào này là tế bào CHO hoặc tế bào NS0.

29. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng fractalkin hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó, phương pháp này bao gồm (a) biểu hiện vector theo điểm 20 ở tế bào chủ thích hợp và (b) thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó được tiết bởi tế bào chủ vào môi trường nuôi cấy.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó được tinh chế đến ít nhất là 95% hoặc lớn hơn so với môi trường nuôi cấy chứa kháng thể.

32. Kháng thể kháng fractalkin được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44.

33. Kháng thể được phân lập theo điểm 32, trong đó kháng thể này là kháng thể nguyên vẹn.

34. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin được làm giống như của người.

35. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin là khảm.

36. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32, trong đó kháng thể này bao gồm vùng cố định của người.
37. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 36, trong đó kháng thể này bao gồm vùng cố định của IgG isotyp.
38. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 37, trong đó kháng thể này bao gồm vùng cố định của IgG2 isotyp.
39. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32, trong đó kháng thể này bao gồm vùng Fc đột biến sao cho kháng thể này có tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc hoạt tính phần bù giảm.
40. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 39, trong đó vùng Fc được đột biến ở một hoặc nhiều V234, G237, C131, hoặc C219.
41. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32, trong đó mảnh gắn kết fractalkin được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, và trong đó mảnh gắn kết fractalkin giữ lại tính đặc hiệu gắn kết với fractalkin.
42. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32, trong đó kháng thể ức chế sự gắn kết giữa fractalkin và thụ thể chemokin 1 CX3C (CX3CR1).
43. Dược phẩm bao gồm kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32.
44. Dược phẩm theo điểm 43, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất mang.
45. Dược phẩm theo điểm 43, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất điều trị bổ sung.
46. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó theo điểm 32.

47. Axit nucleic được phân lập theo điểm 46, trong đó axit nucleic này mã hóa tất cả hoặc một phần chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó.

48. Axit nucleic được phân lập theo điểm 46, trong đó axit nucleic này mã hóa tất cả hoặc một phần chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó.

49. Vector bao gồm axit nucleic được phân lập theo điểm 46.

50. Vector theo điểm 49, trong đó vector này là vector biểu hiện.

51. Tế bào chủ bao gồm một hoặc nhiều vector theo điểm 49.

52. Tế bào chủ theo điểm 51, trong đó tế bào chủ này bao gồm vector thứ nhất và vector thứ hai, vector thứ nhất bao gồm axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và vector thứ hai bao gồm axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng fractalkin hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó bao gồm:

- (a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28;
- (b) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29;
- (c) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30;
- (d) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31;
- (e) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32; và
- (f) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33.

53. Tế bào chủ theo điểm 23, trong đó sự biểu hiện của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở tế bào chủ này tạo ra kháng thể kháng fractalkin hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó bao gồm:

- (a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28;
- (b) CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 29;
- (c) CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30;
- (d) CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 32; và

(f) CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33.

54. Tế bào chủ theo điểm 51, trong đó tế bào chủ là tế bào chưa có nhân thật.

55. Tế bào chủ theo điểm 51, trong đó tế bào chủ là tế bào có nhân thật.

56. Tế bào chủ theo điểm 55, trong đó tế bào chủ là động vật có vú.

57. Tế bào chủ theo điểm 56, trong đó tế bào này là tế bào CHO hoặc tế bào NS0.

58. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng fractalkin hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó, phương pháp này bao gồm (a) biểu hiện vector theo điểm 49 ở tế bào chủ thích hợp và (b) thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó.

59. Phương pháp theo điểm 58, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó được tiết bởi tế bào chủ vào môi trường nuôi cấy.

60. Phương pháp theo điểm 59, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết fractalkin của nó được tinh chế đến ít nhất là 95% hoặc lớn hơn so với môi trường nuôi cấy chứa kháng thể.

Danh mục trình tự

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

<120> Kháng thể kháng Fractalkin, phương pháp sản xuất và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> 50549/006001

<150> 61/256,521

<151> 2009-10-30

<160> 135

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 397

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Pro Ile Ser Leu Ser Trp Leu Leu Arg Leu Ala Thr Phe Cys
1 5 10 15

His Leu Thr Val Leu Leu Ala Gly Gln His His Gly Val Thr Lys Cys
20 25 30

Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu
35 40 45

Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile
50 55 60

Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln
65 70 75 80

Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu
85 90 95

Thr Arg Asn Gly Gly Thr Phe Glu Lys Gln Ile Gly Glu Val Lys Pro
100 105 110

Arg Thr Thr Pro Ala Ala Gly Gly Met Asp Glu Ser Val Val Leu Glu
115 120 125

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

Gln Glu Ala Gln Arg Ala Leu Gly Thr Ser Pro Glu Leu Pro Thr Gly
145 150 155 160

19761

Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Arg Leu Pro Pro Thr Pro Lys Ala Gln
165 170 175

Asp Gly Gly Pro Val Gly Thr Glu Leu Phe Arg Val Pro Pro Val Ser
180 185 190

Thr Ala Ala Thr Trp Gln Ser Ser Ala Pro His Gln Pro Gly Pro Ser
195 200 205

Leu Trp Ala Glu Ala Lys Thr Ser Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro
210 215 220

Ser Thr Gln Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Ala Pro Glu Glu Asn Ala
225 230 235 240

Pro Ser Glu Gly Gln Arg Val Trp Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro
245 250 255

Glu Asn Ser Leu Glu Arg Glu Glu Met Gly Pro Val Pro Ala His Thr
260 265 270

Asp Ala Phe Gln Asp Trp Gly Pro Gly Ser Met Ala His Val Ser Val
275 280 285

Val Pro Val Ser Ser Glu Gly Thr Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala Ser
290 295 300

Gly Ser Trp Thr Pro Lys Ala Glu Glu Pro Ile His Ala Thr Met Asp
305 310 315 320

Pro Gln Arg Leu Gly Val Leu Ile Thr Pro Val Pro Asp Ala Gln Ala
325 330 335

Ala Thr Arg Arg Gln Ala Val Gly Leu Leu Ala Phe Leu Gly Leu Leu
340 345 350

Phe Cys Leu Gly Val Ala Met Phe Thr Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Cys
355 360 365

Pro Arg Lys Met Ala Gly Glu Met Ala Glu Gly Leu Arg Tyr Ile Pro
370 375 380

Arg Ser Cys Gly Ser Asn Ser Tyr Val Leu Val Pro Val
385 390 395

<210> 2
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 2
 cgcgctcgacg ccaccatggc tccgatatct ctgtc
 35

<210> 3
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 3
 gcggggcgcc gccctccggg tggcagcctg gg
 32

<210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 4
 gcgctcgagg ccaccatggc tccgatatct ctgtcgtgg
 39

<210> 5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 5
 gcgggcggcc gcggtggcag cctgggagtc agggac
 36

<210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 6
 gggatggrat gsagctgkgt matsctctt
 29

<210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 7
 gggatgract tcgggytgag ctkggtttt
 29

<210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 8
 gggatggctg tcttggggct gctcttct
 28

<210> 9
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 9
 tcatttaccg ggaagtcggg agaagctctt agtc
 34

<210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 10
 gggatggaga cagacacact cctgctat
 28

<210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 11
 gggatggatt ttcaggtgca gattttcag
 29

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 12
 gggatgragt cacakacyca ggtcttyrta
 30

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 13
 gggatgaggk ccccgctca gytyctkggr
 30

<210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 14
 gggatgaagt tggctgtag gctgttg
 27

<210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 15
 ctaacactca ttctgttga agctc
 25

<210> 16
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 16
 acatcactcc gt
 12

<210> 17
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 17
 acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct
 50

<210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 18
 gtatcaacgc agagatacgt cgacgg
 26

<210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 19
 agctacgctg aagtatcaac gcagag
 26

<210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 20

gtacggagta ctccaaaaat gttg
24

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 21
tcttcaggct gcaggctgat gatc
24

<210> 22
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 22
aaatcttcag gctgcaggct gttg
24

<210> 23
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 23
ctgttgatct tgagagaata ttgtg
25

<210> 24
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 24
cagggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg gagatggtag tcctaagttc
180

19761

aatgagaggt tcaagggcaa gaccacactg actgcagaca agtcctcaaa cacagcctac
240

atgttgctca gcagcctgac ctctgaagac tctgcgatct atttctgtgc aactggggccc
300

actgatggcg actactttga ctactggggc cagggcacca ctctcacagt ctctctca
357

<210> 25

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 25

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc
60

atcacatgtc gagcaagcgg gaatattcac aatttttttag catggtatca gcagaaacag
120

ggaaaatctc ctcagttcct ggtctataat gaaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc aggaacacaa tattctctca agatcaacag cctgcagcct
240

gaagattttg ggatttatct ctgtcaacag ttttggagta ctccgtatac gttcggaggg
300

gggaccaagc tggaataaaa a
321

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 26

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

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

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

Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Pro	Lys	Phe	Asn	Glu	Arg	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

19761

50

55

60

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

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 27

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Phe
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Trp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp
 <400> 28

Asn Tyr Tyr Ile His
 1 5

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp
 <400> 29

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp
 <400> 30

Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp
 <400> 31

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

19761

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 32

Asn Glu Lys Thr Leu Ala Asp
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 33

Gln Gln Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Pro Asn Arg Gly Ala Thr Arg Phe Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Val Ile
 85 90 95

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

<210> 36
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<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 Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

19761

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<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 Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38

<211> 107

19761

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 38

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 39

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe
50 55 60

19761

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(35)
<223> Axit amin bất kỳ

<220>
<221> MOD_RES
<222> (50)..(66)
<223> Axit amin bất kỳ

<220>
<221> MOD_RES
<222> (99)..(108)
<223> Axit amin bất kỳ

<400> 40

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

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

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

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

19761

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(34)
<223> Axit amin bất kỳ

<220>
<221> MOD_RES
<222> (50)..(56)
<223> Axit amin bất kỳ

<220>
<221> MOD_RES
<222> (89)..(97)
<223> Axit amin bất kỳ

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

85

90

95

Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 42

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Thr Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 43

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 44

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Trp Ser Thr Pro Tyr

85

90

95

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 45

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 46

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 46

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

Ala His Ser

<210> 47
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 47
 atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggtgc ccactcc
 57

<210> 48
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 48
 atggactgga catggtccat cctgttcctg gtggccgctc caactggcgc acactct
 57

<210> 49
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 49

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

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
 20

<210> 50
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 50
 atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc
 60

agatgt
 66

<210> 51
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 51
 atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggtgc
 50

<210> 52
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 52
 ccagactgca ccagctgcac ctgggagtgg gcacctgttg gtgctgccac
 50

<210> 53
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 53
 gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt
 50

<210> 54
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 54
 gtgtatccag aagccttgca ggagaccttc actgaggccc caggcttctt
 50

<210> 55
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 55
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccaac tactatatac actgggtgaa
 50

<210> 56
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 56
 atccactcaa gcccttgtcc aggggcctgc ttcacccagt gtatatagta
 50

<210> 57
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 57
 ggacaagggc ttgagtggat aggatggatt taccctggag atggtagtcc
 50

<210> 58
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 58
 gtcctgccct tgaacctctc attgaactta ggactaccat ctccaggata
 50

<210> 59
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 59
 gagaggttca agggcaggac caccctgacc gcagacaagt ccacgaacac
 50

<210> 60
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 60

gatctcaggc tgctcagcaa catgtaggct gtgttcgtgg acttgtctgc
50

<210> 61

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 61

ttgctgagca gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt tctgtgcgac
50

<210> 62

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 62

tagtcaaagt agtcgccatc agtggggcct gtcgcacaga aatacacggc
50

<210> 63

<211> 50

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 63

gatggcgact actttgacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc
50

<210> 64

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 64

gaccgatggg cccttggtgg aggctgaaga gacggtgacc gtgggtccc
48

<210> 65
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 65
 gccacatgg acatgaggg ccccgctcag ctctggggc tcctgctact ctggctccga
 60
 ggtgccagat
 70

<210> 66
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 66
 tcctacagat gcagacagg aggatggaga ctgggtcatc tggatgtcac atctggcacc
 60
 tcggagccag
 70

<210> 67
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 67
 ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatacttg ccgagcaagc gggaatatcc
 60
 acaatttttt
 70

<210> 68
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 68
 gaacttaggg gctttccctg gtttctgttg ataccatgct aaaaaattgt gaatatccc
 60

gcttgctcgg
70

<210> 69
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 69
cagggaaagc ccctaagttc ctggtctata atgaaaaaac cttagcagat ggggtcccat
60

caaggttcag
70

<210> 70
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 70
gttgacagact gctgatggtg agagtatatatt gtgtcccaga tccactgcca ctgaaccttg
60

atgggacccc
70

<210> 71
<211> 70
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 71
caccatcagc agtctgcaac ctgaagattt tgcgacctac ttctgtcaac agttttggag
60

tactccgtat
70

<210> 72
<211> 63
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 72

tttgatctcc accttgggtcc ctccgccgaa cgtatacgga gtactccaaa actgttgaca
60

gaa
63

<210> 73
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 73
gacagatggt gcagccacag ttcgtttgat ctccaccttg gtccctcc
48

<210> 74
<211> 50
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 74
gcgaattcgt cgacgccacc atggactgga cctggagcat ccttttcttg
50

<210> 75
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 75
cgcgctagct gaagagacgg tgaccgtggt ccc
33

<210> 76
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 76
gcggtcgacg ccacatgga catgagggtc ccc
33

<210> 77
<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 77

gacagatggt gcagccacag ttcgtttgat ctccaccttg gtccctcc
48

<210> 78

<211> 438

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polynucleotit tổng hợp

<400> 78

gaattcgtcg acgccacat ggactggaca tggatccatcc tgttcctggt ggccgctcca
60

actggcgcac actctcaggt gcagctggtg cagagtggcg ctgaggtgaa gaaacccgga
120

gcatacgtga aggtgtcctg caaagccagc ggatacacct tcaccaacta ctatattcat
180

tgggtgaggc aggtccttg acagggactg gagtggatcg gatggatcta cccaggggac
240

ggttccccta agttcaacga aaggtttaaa ggccggacca cactgaccag ggataagtca
300

accaatacag cttacatgga actgtccagc ctgcgctctg acgatacagc agtgtatttc
360

tgtgccactg ggccaaccga cggcgactac ttgtattatt ggggccaggg aactaccgtg
420

accgtgtcta gtgctagc
438

<210> 79

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 79

cgcgtcgacg ccacatgga ctggacatgg tccatcctg
39

<210> 80

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 80

atgaccgccg atacctcaac ctccacagct tacatggaa
39

<210> 81

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 81

ggttgaggta tcggcgggtca ttgtgggtccg
30

<210> 82

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 82

gaggatacag cagtgtattt ctgtgcccgg gggccaacc
39

<210> 83

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 83

ggcacagaaa tacactgctg taccctcaga gcgcag
36

<210> 84

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 84

cgcgctagca ctagacacgg tcacggtagt tcc
33

<210> 85
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 85
 cgcgctcgacg ccaccatgga ctggacatgg tccatcctg
 39

 <210> 86
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 86
 ttgacttatc ggcggtcagt gtgggtccggc ctttaaacct ttc
 43

 <210> 87
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 87
 acactgaccg ccgataagtc aacctccaca gcttacatgg aa
 42

 <210> 88
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 88
 cgcgctagca ctagacacgg tcacggtagt tcc
 33

 <210> 89
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 89
 cgcgtcgacg ccaccatgga catgaggggc cccgctcag
 39

<210> 90
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 90
 cagcagctta ggggctttcc ctggtttctg
 30

<210> 91
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 91
 gggaaagccc ctaagctgct gatctataat gaaaaa
 36

<210> 92
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 92
 tgtcccagat ccactgccac tgaaccttga
 30

<210> 93
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 93
 agtggcagtg gatctgggac agactatact ctcacc
 36

<210> 94
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 94
 cgccgtacgt ttgatctcca ccttggtccc tcc
 33

<210> 95
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 95
 cgcgtcgacg ccaccatgga catgagggtc cccgctcag
 39

<210> 96
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 96
 ggtgagagta tactgtgtcc cagatccact gccactgaac
 40

<210> 97
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 97
 ggatctggga cacagtatac tctcaccatc agcagtctg
 39

<210> 98
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 98
 cgccgtacgt ttgatctcca ccttggtccc tcc
 33

<210> 99
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 99
 cgcgctagca ccaagggcc atcgggtcttc ccc
 33

 <210> 100
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 100
 cgcgatatct catttaccgc gagacaggga gag
 33

 <210> 101
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 101
 cgccgtacgg tggctgcacc atctgtcttc atc
 33

 <210> 102
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 102
 cgcgatatcc taacactctc ccctgttgaa gct
 33

 <210> 103
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

 <400> 103

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc
24

<210> 104
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 104
cgcgcgggccg cctaacactc tcccctgttg aagctctt
38

<210> 105
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 105
ttgctgagca gcctgagatc tgaggacacg gcc
33

<210> 106
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 106
agatctcagg ctgctcagca acatgtaggc
30

<210> 107
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 107
gcggaattcg tcgacgccac catgcgatgg agctggatc
39

<210> 108
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 108

gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtgcc
48

<210> 109

<211> 41

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 109

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct g
41

<210> 110

<211> 35

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 110

cgcgcggccg ctcatttacc cggagacagg gagag
35

<210> 111

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 111

gcggtcgacg ccacatgag tgtgctcact cag
33

<210> 112

<211> 49

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 112

gacagatggg gcagccacag ttcgttttat ttccagcttg gtccccct
49

<210> 113

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 113
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc
 24

<210> 114
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mỗi tổng hợp

<400> 114
 cgcgcgggcgc cctaacactc tccccctgttg aagctctt
 38

<210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 115

Gln	His	His	Gly	Val	Thr	Lys	Cys	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met
1				5					10					15

<210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 116

Gly	Val	Thr	Lys	Cys	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys
1				5					10					15

<210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

19761

<400> 117

Lys	Cys	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val
1				5					10					15

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 118

Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15

<210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 119

Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Tyr
1				5					10					15

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 120

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

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 121

Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Gln	Ala	Ser
1				5					10					15

<210> 122
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 122

Ala	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Gln	Ala	Ser	Cys	Gly	Lys
1				5				10						15

<210> 123
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 123

Ile	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Gln	Ala	Ser	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Ile
1				5				10						15

<210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 124

Gln	Gln	Asn	Gln	Ala	Ser	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu
1				5				10						15

<210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 125

Gln	Ala	Ser	Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu	Thr	Arg	Gln
1				5				10						15

<210> 126
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 126

Cys	Gly	Lys	Arg	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu	Thr	Arg	Gln	His	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 127

Arg	Ala	Ile	Ile	Leu	Glu	Thr	Arg	Gln	His	Arg	Leu	Phe	Cys	Ala
1				5					10					15

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 128

Ile	Leu	Glu	Thr	Arg	Gln	His	Arg	Leu	Phe	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys
1				5					10					15

<210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 129

Thr	Arg	Gln	His	Arg	Leu	Phe	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Trp
1				5					10					15

<210> 130

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 130

19761

His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp
1 5 10 15

<210> 131

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 131

Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln
1 5 10 15

<210> 132

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 132

Asp Pro Lys Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His Leu Asp
1 5 10 15

<210> 133

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 133

Glu Gln Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His Leu Asp Arg Gln Ala
1 5 10 15

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 134

Val Lys Asp Ala Met Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu
1 5 10 15

19761

<210> 135

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 135

Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Arg	Asn	Gly
1				5				10						15	

Fig.1

MAPISLWLLRLATFCHLTVLLAGQHHGVTKCNITCSKMTSKIPVALLIHYQQNQ
ASCGKRAIILETRQHRLFCADPKEQWVKDAMQHILDRQAAALTRNGGTFEKQIGE
VKPRTPAAAGGMDESVVLEPEATGESSLEPTPSSQEAQRALGTSPELPTGVTGSS
GTRLPPTPKAQDGGPVGTLELFRVPPVSTAAWQSSAPHQPGPSLWAEAKTSEAPS
TQDPSTQASTASSPAPEENAPSEGQRVWGGQQSPRPENSLEEREEMGPVPAHTDAF
QDWGPGSMAHVSVPVSSEGTSPSREPVASGSWTPKAEPIHAATMDPQRLGVLITP
VPDAQAAATTRQAVGLLAFLGLLFCLGVAMFTYQSLQGCPRKMAGEMAEGRLRYIP
RSCGSNSYVLVPV (SEQ ID NO: 1)

Fig.2

	1F3-1	3A5-2	3H7-6
Thử nghiệm hóa ứng động IC ₅₀ (nM)	Chuột -	-	-
	Người 12,67 (± 5,07)	4,80 (± 1,33)	19,07 (± 5,13)
Ái lực (BIACORE) KD (nM)	Chuột -	-	-
	Người 0,66	0,60	0,83
Khả năng phản ứng với FKN khí cynomolgus (ELISA)	Không bằng với người	Bằng với người	Bằng với người

- : không có hoạt tính

Fig.3

	CDR1										CDR2															
m3A5-2_VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTF	TNY	I	H	V	K	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	M	I	Y	P	G	D	G	S	P	K
H3	--Q-VQ--A-VK--	--V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
H3-2	--Q-VQ--A-VK--	--V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HK2	--Q-VQ--A-VK--	--V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HK3	--Q-VQ--A-VK--	--V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Dòng mầm Ig	--Q-VQ--A-VK--	--V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
AAA68427.1	--K-LE--A-VK--	--V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	CDR2										CDR3																																																
m3A5-2_VH	FNERFKG	K	T	T	L	T	A	D	K	S	S	N	T	A	Y	M	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	I	Y	F	C	A	T	G	P	T	D	G	D	Y	F	D	Y	M	G	Q	G	T	T	L	T	V	S							
H3	-----	RT-L	-A	-K	-TN	-A	-L	-S	-RSD	-T	-V	-F	-T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
H3-2	-----	RT-L	-A	-K	-TN	-A	-L	-S	-RSE	-T	-V	-F	-T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----					
HK2	-----	RT-M	-A	-T	-TS	-A	-E	-S	-RSE	-T	-V	-F	-R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----					
HK3	-----	RT-L	-A	-K	-TS	-A	-E	-S	-RSE	-T	-V	-F	-R	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
Dòng mầm Ig	XXXXXXXXRV	-M	-R	-T	-TS	-A	-E	-S	-RSE	-T	-V	-Y	-R	XXXXXXXXXX	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
AAA68427.1	FAQK	FQGRV	-M	-S	-T	-IN	-V	-E	-G	-RFD	-T	-V	-Y	-T	T	R	T	A	Y	Y	G	M	D	V	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

● Các gốc khóa chặt chẽ

Fig.4

	CDR1			CDR2		
m3A5-2_VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR	RASGNIHNFLAM	YQQKQKSPQFLVYNEKTLAD	GVP	S	
L2	---	S---	DR---	KP---	A-KF-V---	
L4	---	S---	DR---	KP---	A-KL-I---	
L5	---	S---	DR---	KP---	A-KL-I---	
Dòng mầm Ig	---	S---	DR---	KP---	A-KL-I-XXXXXXX	
ABU90602.1	---	S---	DR---	RASQNIIDNYLN	QPA-KF-I-EASSLRS	
	CDR3					
m3A5-2_VL	RFSGSGGTQYSLKINS	LPEDFGIYFC	QQFWSTPYTFGGG	TKLEIK		
L2	---	QYT-T-S---	AT-F---	V---		
L4	---	DYT-T-S---	AT-F---	V---		
L5	---	QYT-T-S---	AT-F---	V---		
Dòng mầm Ig	---	DFT-T-S---	AT-Y-XXXXXXX	V---		
ABU90602.1	---	EFT-T-S---	AT-Y-QQSYTTVIT	V---		

● Các gốc khóa chặt chẽ

Fig.5

		1 st	2 nd	3 rd	Av.	SD
Chuột	IC50	0,52	0,61	0,54	0,55	0,05
	IC90	4,08	4,24	3,23	3,85	0,55
	IC95	8,61	10,84	6,66	8,70	2,09
Khảm	IC50	0,34	0,29	0,43	0,35	0,07
	IC90	3,36	2,21	1,66	2,41	0,87
	IC95	7,07	5,24	3,15	5,15	1,96
H3L2	IC50	0,47	0,26	0,29	0,34	0,12
	IC90	2,94	2,25	1,34	2,18	0,80
	IC95	5,61	4,69	2,91	4,40	1,37
H3L4	IC50	0,44	0,91	0,44	0,60	0,27
	IC90	8,34	5,11	4,43	5,96	2,09
	IC95	15,92	50,26	10,46	25,54	21,58
H3-2L2	IC50	0,25	0,23	0,27	0,25	0,02
	IC90	2,23	2,13	2,67	2,34	0,29
	IC95	4,25	5,28	5,59	5,04	0,70
H3-2L4	IC50	0,20	0,65	0,45	0,43	0,23
	IC90	2,71	3,01	2,98	2,90	0,17
	IC95	6,36	7,00	5,92	6,43	0,54
H3-2L5	IC50	0,13	0,46	0,57	0,39	0,23
	IC90	1,97	4,92	3,84	3,58	1,49
	IC95	5,81	17,47	6,68	9,99	6,50
HK2L2	IC50	16,49	27,86	ND		
	IC90	>66,67	>66,67	ND		
	IC95	>66,67	>66,67	ND		
HK2L4	IC50	16,87	19,59	ND		
	IC90	>66,67	>66,67	ND		
	IC95	>66,67	>66,67	ND		
HK3L2	IC50	1,65	8,50	9,63	6,59	4,32
	IC90	>66,67	>66,67	>66,67		
	IC95	>66,67	>66,67	>66,67		
HK3L4	IC50	0,42	25,25	>66,67	12,84	17,56
	IC90	>66,67	>66,67	>66,67		
	IC95	>66,67	>66,67	>66,67		
HK3L5	IC50	1,10	14,17	13,50	9,59	7,36
	IC90	>66,67	>66,67	>66,67		
	IC95	>66,67	>66,67	>66,67		

Fig.6

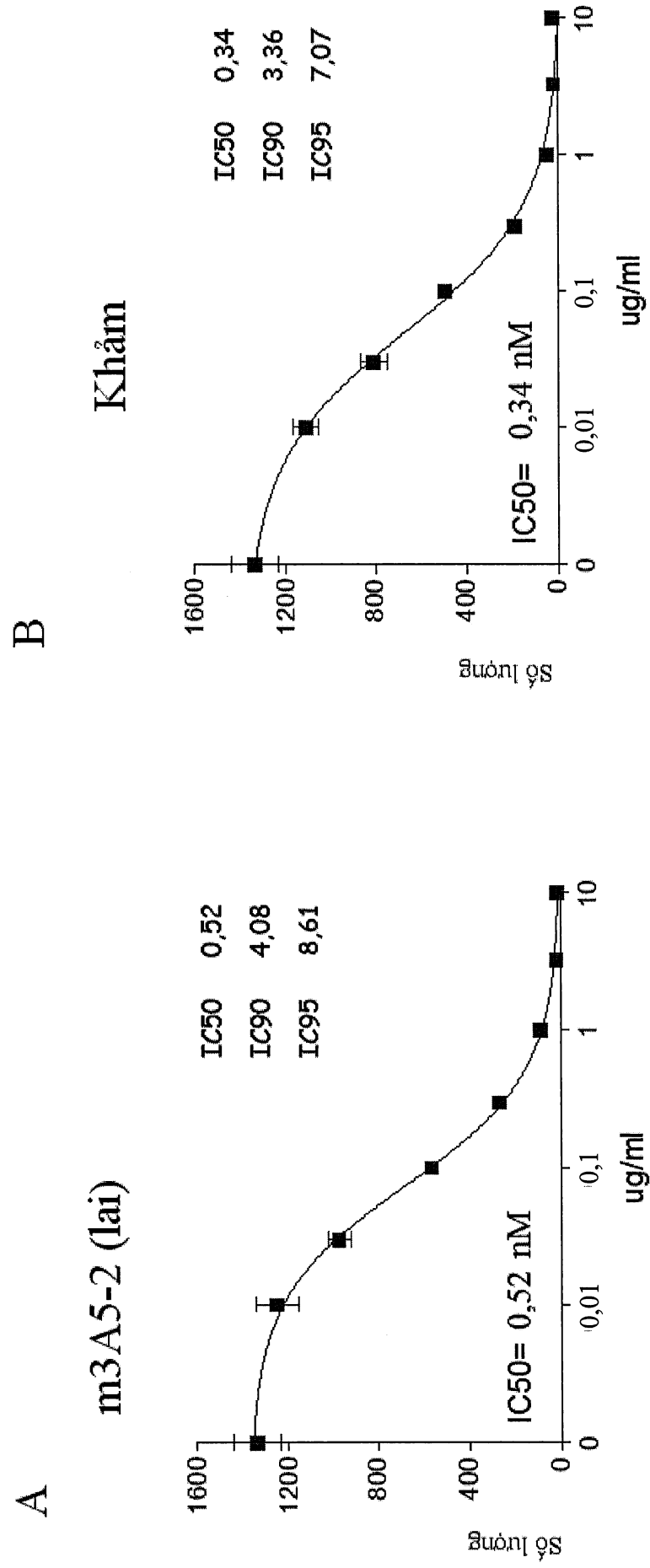


Fig.7

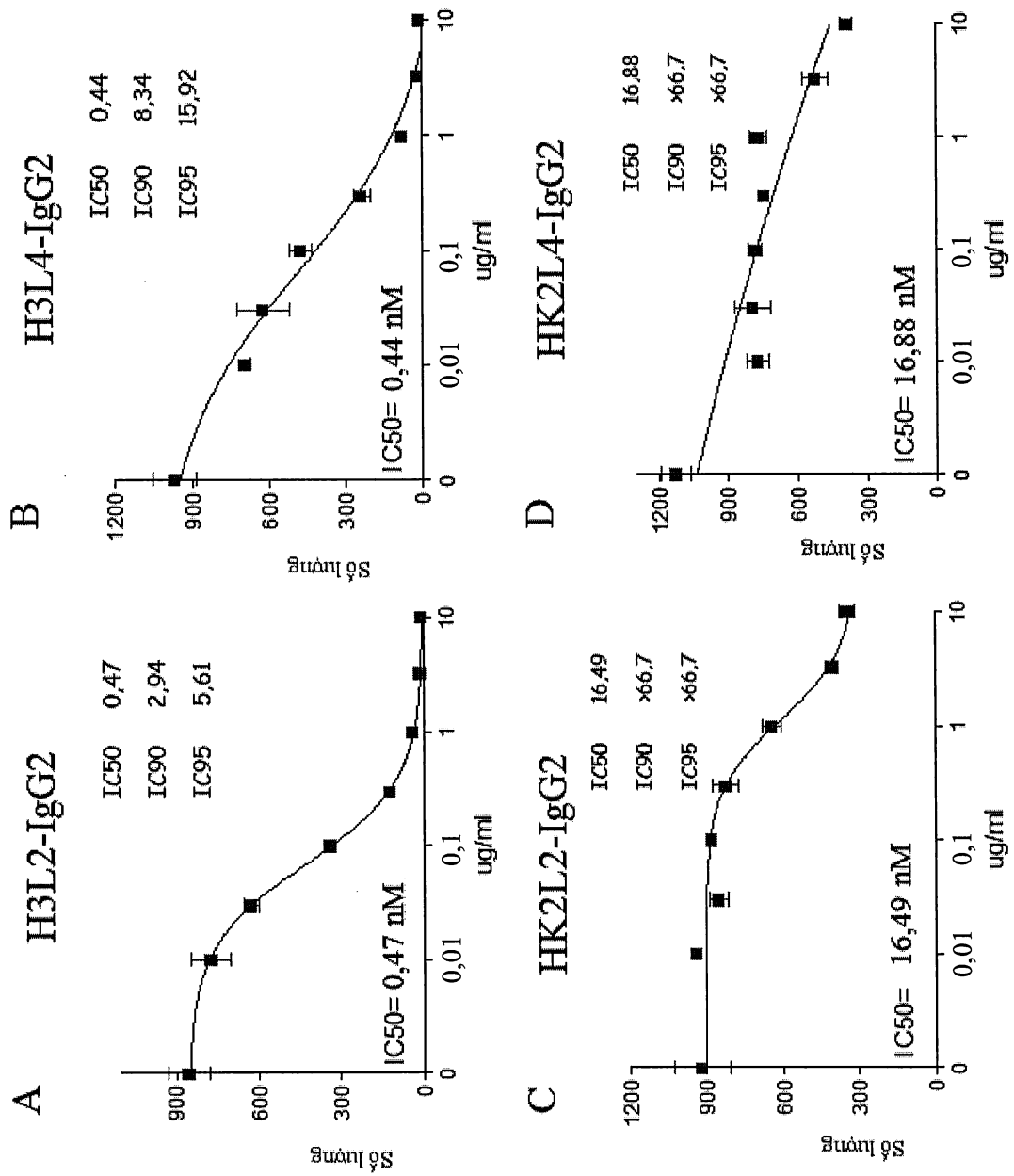


Fig.8

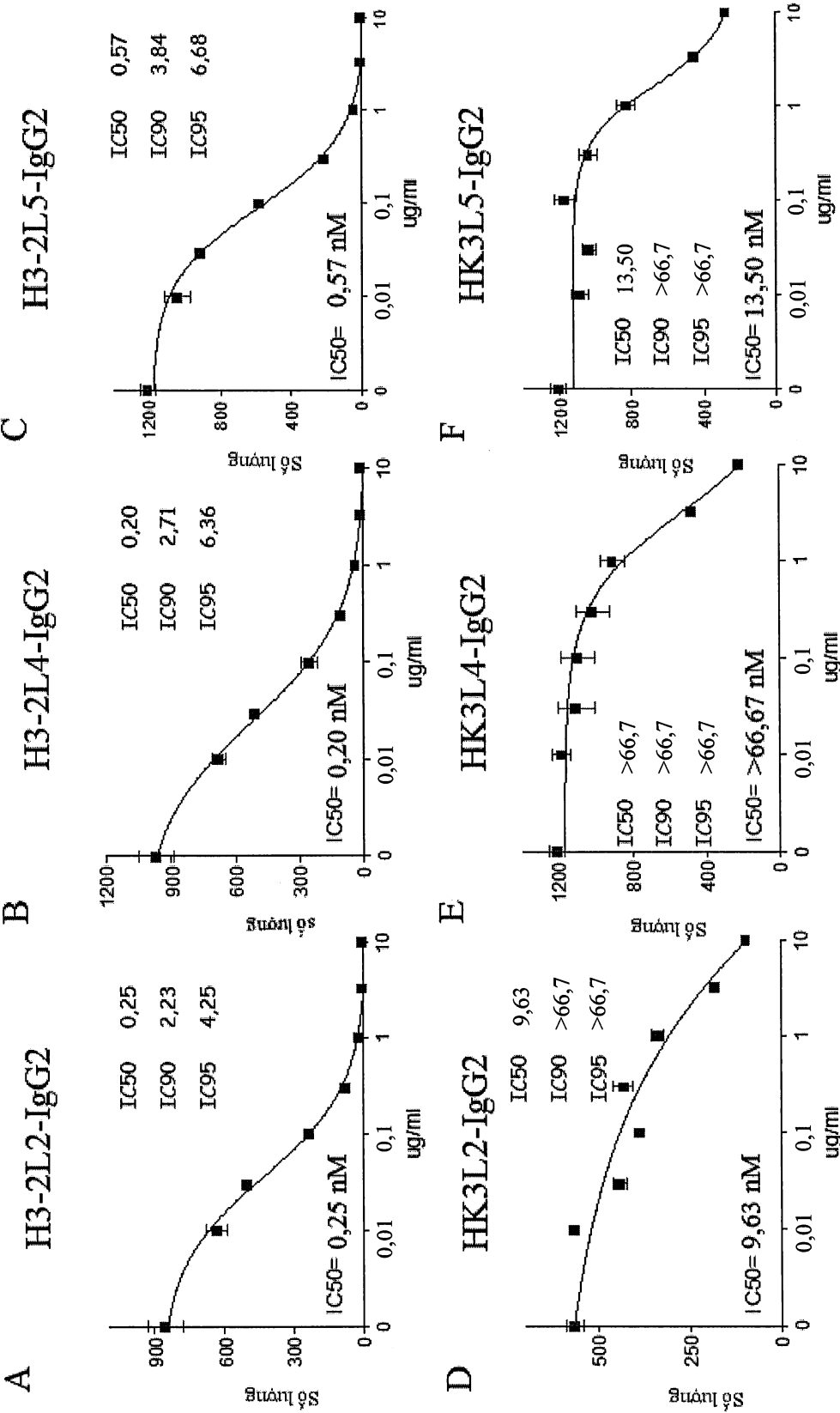


Fig.9

mAbs	FKN-SEAP người			Cynomolgus FKN-SEAP		
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
Khảm	1,34E+07	9,58E-05	7,13E-12	1,43E+07	9,54E-05	6,62E-12
H3L2	1,32E+07	1,16E-04	8,84E-12	1,26E+07	1,22E-04	9,62E-12
H3-2L2	1,50E+07	8,83E-05	5,92E-12	1,39E+07	9,43E-05	6,75E-12
H3L4	1,56E+07	1,05E-04	6,43E-12	1,61E+07	1,87E-04	1,20E-11
H3-2L4	1,88E+07	1,01E-04	5,34E-12	1,49E+07	1,15E-04	7,71E-12
HK2L4	1,83E+07	6,14E-04	3,40 E-11	2,49E+07	6,35E-04	2,60E-11

19761

Fig.10

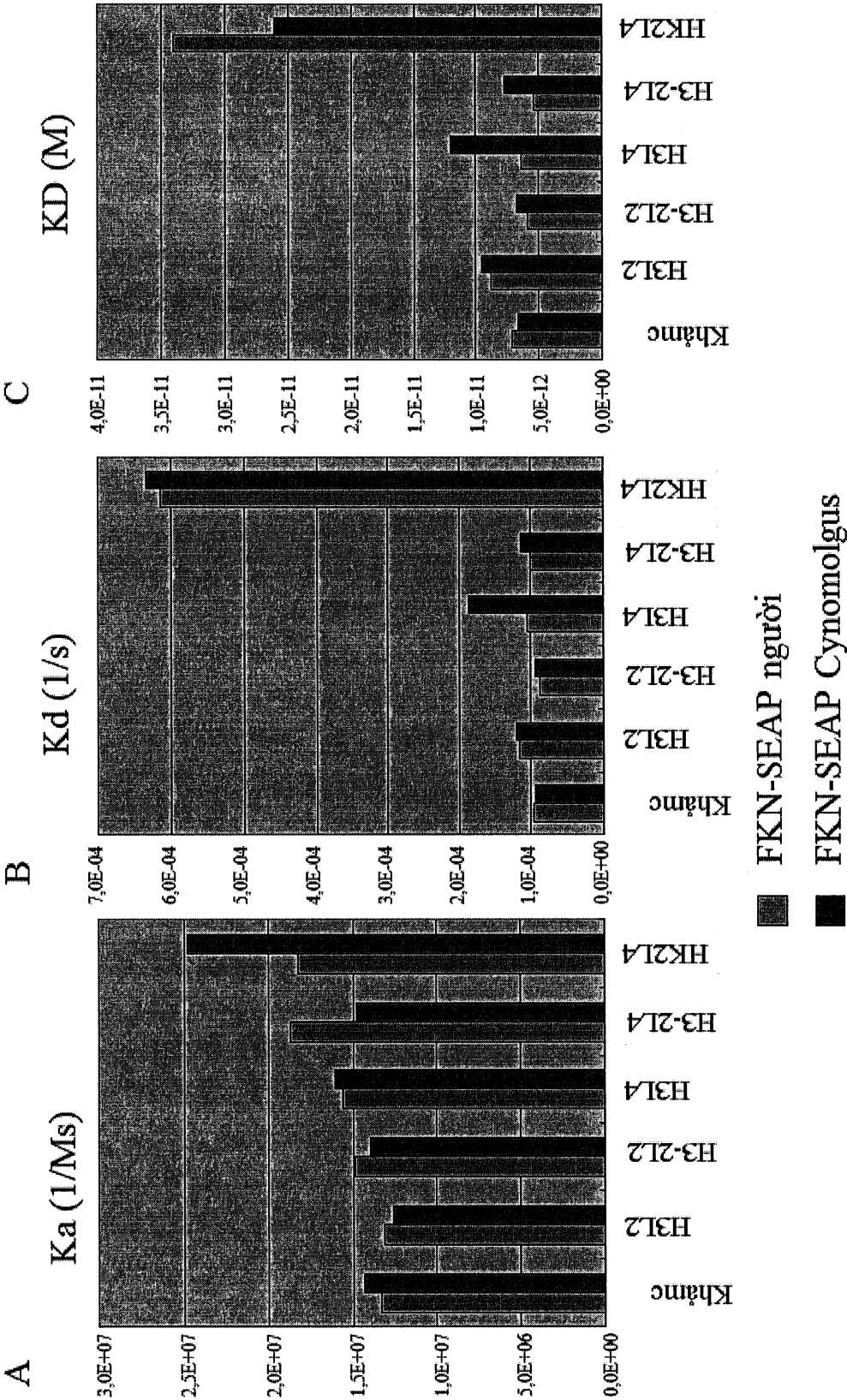


Fig.11

Tạo bản đồ epitop (Peptit ELISA)

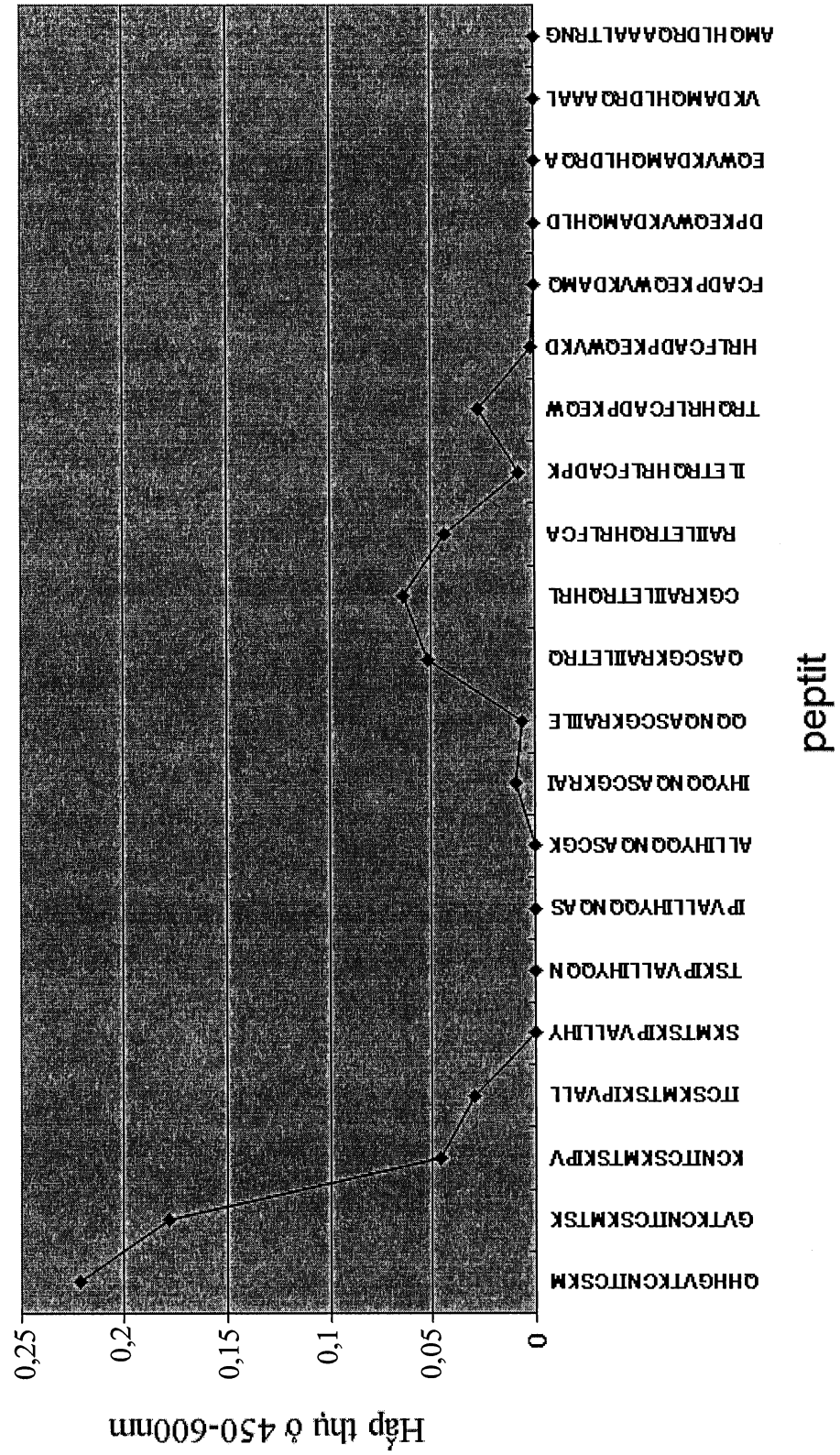
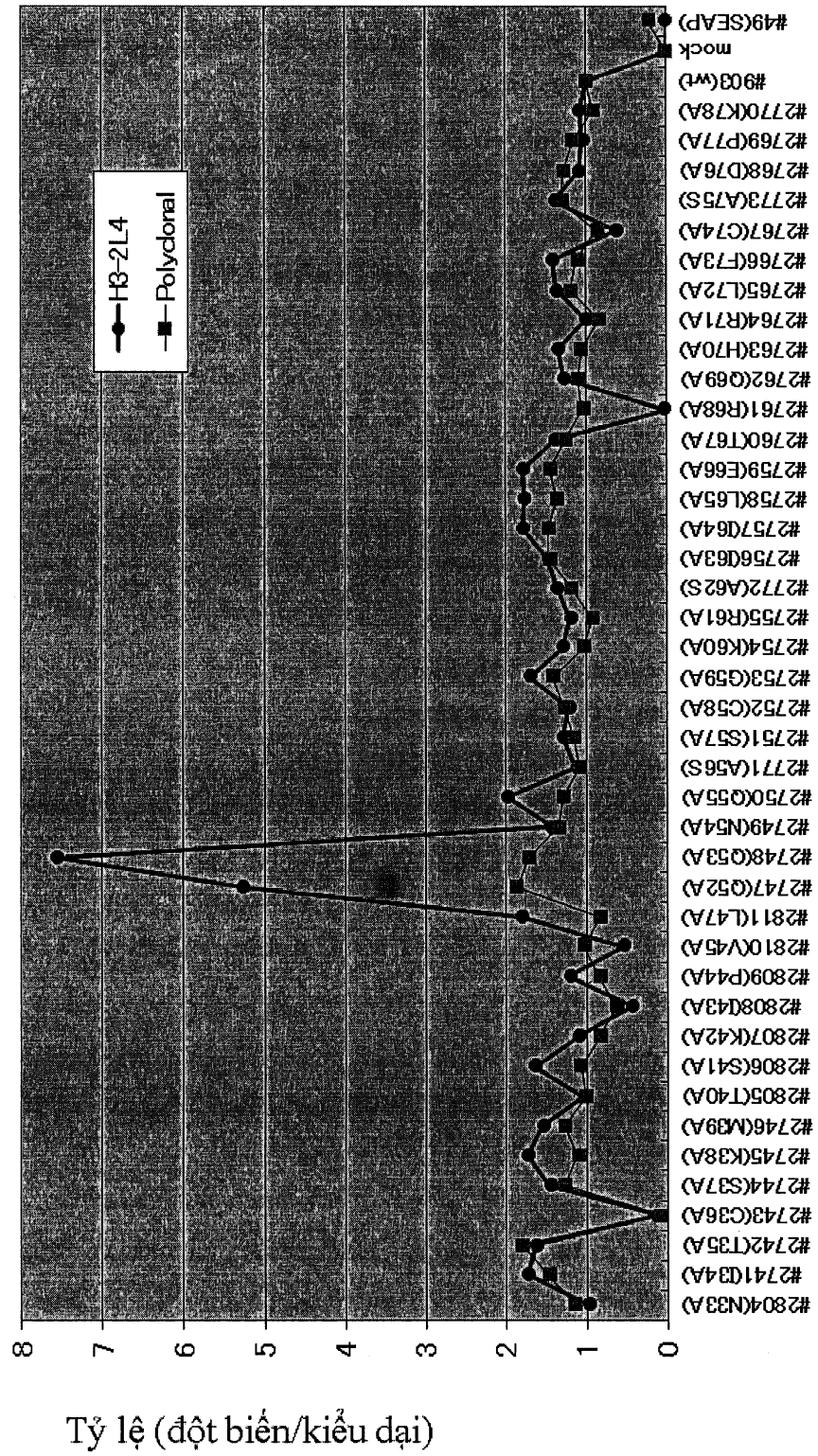


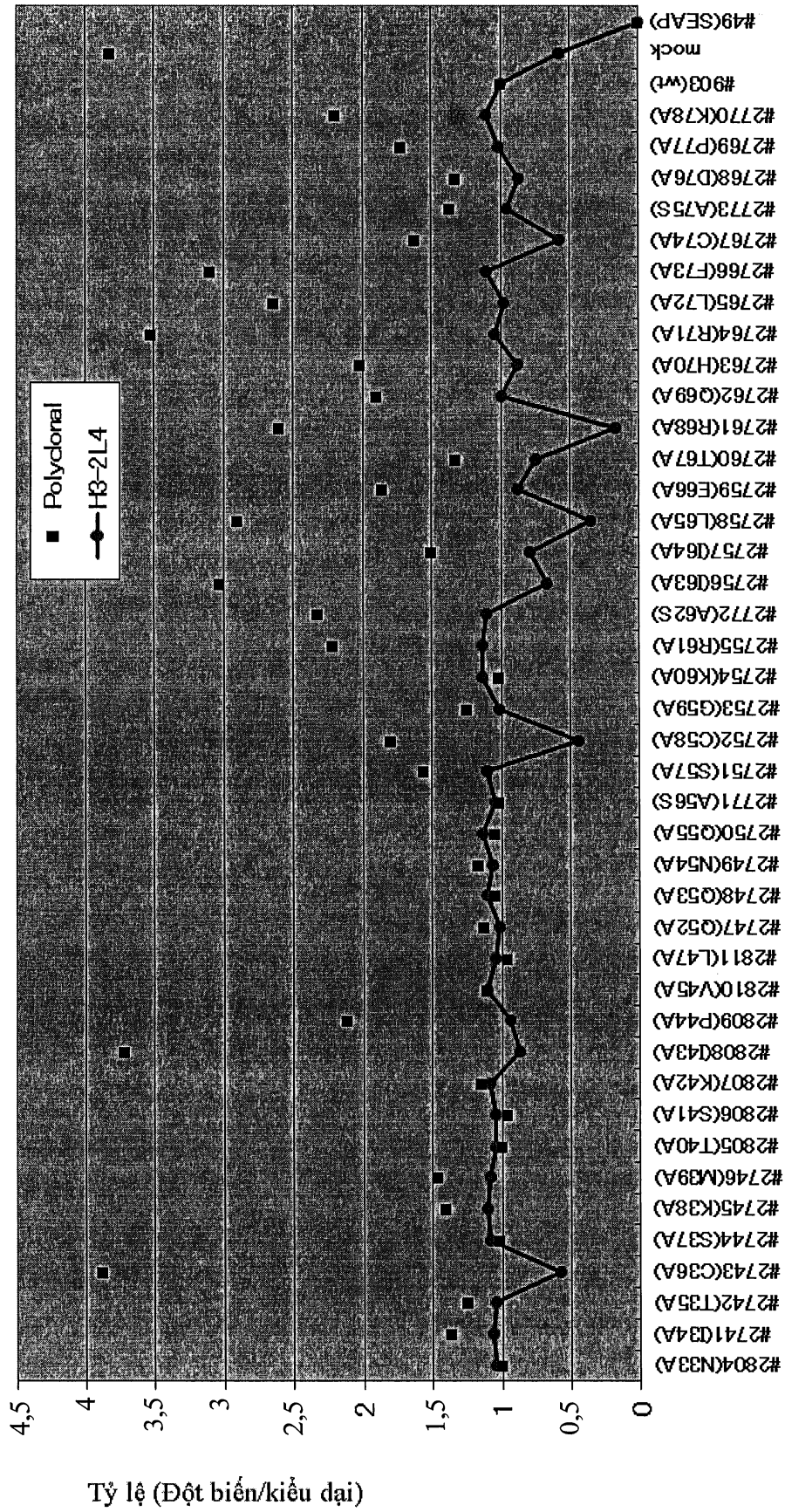
Fig.12

Tạo bản đồ epitop ELISA



Đột biến alanin

Fig.13
Tạo bản đồ epitop BIACORE



Độ biến alanin

Fig.14

Màu xám: bão hòa ngang
 Màu đen: tạo bản đồ thay đổi hóa học

