



(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) 
1-0020335

(51)⁷ **C12N 15/09, A61K 39/395, C07K 16/28** (13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|---|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2010-03028 | (22) | 10.04.2009 | | |
| (86) | PCT/JP2009/057309 | 10.04.2009 | (87) | WO2009/125825 | 15.10.2009 |
| (30) | 2008-104147 | 11.04.2008 | JP | | |
| | 2008-247713 | 26.09.2008 | JP | | |
| | 2009-068744 | 19.03.2009 | JP | | |
| (45) | 25.01.2019 | 370 | (43) | 27.06.2011 | 279 |
| (73) | Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha (JP)
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan | | | | |
| (72) | IGAWA, Tomoyuki (JP), ISHII, Shinya (JP), MAEDA, Atsuhiko (JP), NAKAI, Takashi (JP) | | | | |
| (74) | Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.) | | | | |
-

(54) **DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ CÓ THỜI GIAN BÁN THẢI KÉO DÀI TRONG HUYẾT THANH**

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể có khả năng liên kết kháng nguyên yếu hơn ở độ pH thể nhân ban đầu so với hoạt tính ở độ pH của huyết tương, các kháng thể này có khả năng liên kết với nhiều phân tử kháng nguyên bằng phân tử kháng thể đơn, có thời gian bán thải lâu trong huyết tương và có khoảng thời gian liên kết với kháng nguyên được cải thiện. Cụ thể, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể có thời gian bán thải kéo dài trong huyết thanh này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện dược động học của phân tử liên kết kháng nguyên và phương pháp làm tăng số lần liên kết với kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên, cũng như đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên có dược động học được cải thiện, phân tử liên kết kháng nguyên có thời gian liên kết với kháng nguyên gia tăng và phương pháp sản xuất các phân tử này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kháng thể được sử dụng làm dược phẩm do chúng có tính ổn định cao trong huyết tương và ít có tác dụng phụ. Hiện nay, nhiều loại dược phẩm kháng thể kiểu IgG được bán trên thị trường và nhiều loại kháng thể khác đang được phát triển (các tài liệu phi sáng chế 1 và 2). Trong khi đó, các kỹ thuật khác nhau có thể áp dụng cho các dược phẩm chứa kháng thể thể hệ 2 đã được phát triển, bao gồm các kỹ thuật tăng cường chức năng tác động, khả năng liên kết với kháng nguyên, dược động học và tính ổn định, và các kỹ thuật làm giảm nguy cơ gây miễn dịch (Tài liệu phi sáng chế 3). Nói chung, liệu yêu cầu đối với dược phẩm chứa kháng thể là rất cao. Điều này dẫn đến nhiều vấn đề, như chi phí sản xuất cao cũng như khó sản xuất được các chế phẩm sử dụng qua đường dưới da. Về mặt lý thuyết, liệu dược phẩm chứa kháng thể có thể được làm giảm bằng cách cải thiện dược động học của kháng thể hoặc cải thiện ái lực giữa kháng thể và kháng nguyên.

Tài liệu chuyên ngành đã báo cáo các phương pháp cải thiện dược động học của kháng thể bằng cách thay thế nhân tạo các axit amin ở các vùng ổn định (Các tài liệu phi sáng chế 4 và 5). Tương tự, sự trưởng thành ái lực đã được báo cáo là kỹ thuật để tăng cường ái lực liên kết với kháng nguyên và hoạt tính trung hòa kháng nguyên (Tài liệu phi sáng chế 6). Kỹ thuật này cho phép tăng cường ái lực liên kết với kháng nguyên bằng cách đưa các đột biến axit amin vào vùng CDR (complementarity determining region -

vùng xác định tính hỗ trợ) của vùng biến đổi hoặc vùng tương tự. Việc tăng cường khả năng liên kết với kháng nguyên cho phép cải thiện hoạt tính sinh học *in vitro* hoặc làm giảm liều, và cũng cho phép cải thiện tác dụng *in vivo* (Tài liệu phi sáng chế 7).

Khả năng trung hòa kháng nguyên của phân tử kháng thể đơn phụ thuộc vào ái lực của nó. Bằng cách làm tăng ái lực, kháng nguyên có thể bị trung hòa bằng một lượng nhỏ hơn của kháng thể. Các phương pháp khác nhau có thể được sử dụng để tăng cường ái lực của kháng thể. Ngoài ra, nếu ái lực có thể được tạo ra vô hạn bằng cách liên kết cộng hóa trị kháng thể với kháng nguyên thì phân tử kháng thể đơn có thể trung hòa một phân tử kháng nguyên (kháng thể có hóa trị hai có thể trung hòa hai phân tử kháng nguyên). Tuy nhiên, việc trung hòa theo hệ số tỷ lệ lượng của một kháng thể đối với một kháng nguyên (một kháng thể có hóa trị hai đối với hai kháng nguyên) là giới hạn của các phương pháp có từ trước, và do đó không thể trung hòa hoàn toàn kháng nguyên bằng lượng kháng thể nhỏ hơn so với lượng kháng nguyên. Nói cách khác, tác dụng tăng cường ái lực là có hạn (Tài liệu phi sáng chế 9). Để kéo dài tác dụng trung hòa của kháng thể trung hòa trong khoảng thời gian nhất định, kháng thể phải được sử dụng với liều cao hơn so với lượng kháng nguyên được tạo ra trong cơ thể trong cùng một khoảng thời gian. Do đó, nếu chỉ bằng cách cải thiện được động học của kháng thể hoặc kỹ thuật trưởng thành ái lực được mô tả ở trên, thì việc làm giảm liều kháng thể yêu cầu sẽ bị hạn chế.

Do đó, để duy trì tác dụng trung hòa kháng nguyên của kháng thể trong khoảng thời gian đích với lượng kháng thể nhỏ hơn so với lượng kháng nguyên, kháng thể đơn phải trung hòa nhiều kháng nguyên. Phương pháp trung hòa nhiều kháng nguyên bằng kháng thể đơn bao gồm bước bất hoạt kháng nguyên sử dụng các kháng thể xúc tác - là các kháng thể được tạo ra có chức năng xúc tác. Khi kháng nguyên là protein, nó có thể bị làm bất hoạt bằng cách thủy phân các liên kết peptit của nó. Kháng thể có thể trung hòa lặp lại các kháng nguyên bằng cách xúc tác quá trình thủy phân này (Tài liệu phi sáng chế 8). Đã có nhiều báo cáo được công bố về các kháng thể xúc tác và các kỹ thuật để sản xuất chúng. Tuy nhiên, chưa có báo cáo nào về các kháng thể xúc tác có hoạt tính xúc tác đủ làm được chất. Cụ thể, trong nghiên cứu về kháng thể *in vivo* đối với kháng

nguyên nhất định, chưa có công bố nào về các kháng thể xúc tác mà có thể tạo ra tác dụng có thể so sánh được hoặc mạnh hơn ngay cả ở liều thấp hoặc tạo ra tác dụng kéo dài hơn ngay cả ở cùng liều so với kháng thể trung hòa không xúc tác thông thường.

Như được mô tả ở trên, chưa có báo cáo nào về các kháng thể có khả năng tạo ra tác dụng *in vivo* tốt hơn so với kháng thể trung hòa thông thường thông qua kháng thể đơn trung hòa nhiều phân tử kháng nguyên. Do đó, từ quan điểm về sự giảm liều và kéo dài thời gian tác dụng, cần có các kỹ thuật mới cho phép sản xuất các phân tử kháng thể mới có tác dụng *in vivo* mạnh hơn so với các phân tử kháng thể trung hòa thông thường bằng cách trung hòa riêng lẻ nhiều phân tử kháng nguyên.

Các tài liệu trong tình trạng kỹ thuật liên quan đến sáng chế được nêu dưới đây:

Tài liệu trong tình trạng kỹ thuật

Các tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073-1078 (2005)

Tài liệu phi sáng chế 2: Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market to 2008. Eur J Pharm Biopharm. 2005 Apr;59(3):389-96

Tài liệu phi sáng chế 3: Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Mol Cells. 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review

Tài liệu phi sáng chế 4: Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56

Tài liệu phi sáng chế 5: Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. Nat Biotechnol. 1997 Jul;15(7):637-40

Tài liệu phi sáng chế 6: Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8466-71. Epub 2005 Jun 6

Tài liệu phi sáng chế 7: Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. J Mol Biol. 2007, 368, 652-665

Tài liệu phi sáng chế 8: Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications. Curr Opin Biotechnol. 2005 Dec;16(6):631-6

Tài liệu phi sáng chế 9: Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Sep 9;334(4):1004-13

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các vấn đề cần được giải quyết bởi sáng chế

Các trường hợp được lưu ý trên đây dẫn đến các phát hiện của sáng chế. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp liên kết phân tử liên kết kháng nguyên với kháng nguyên nhiều lần và phương pháp cải thiện được động học của phân tử liên kết kháng nguyên, cũng như phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết nhiều lần với kháng nguyên, phân tử liên kết kháng nguyên có được động học được cải thiện, được phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên này, và phương pháp sản xuất phân tử và được phẩm này.

Các phương pháp giải quyết vấn đề

Các nghiên cứu chuyên ngành về phương pháp liên kết các polypeptit có khả năng liên kết kháng nguyên, như phân tử liên kết kháng nguyên, với kháng nguyên nhiều lần, và phương pháp cải thiện thời gian bán thải của các phân tử này trong huyết tương (máu) (cải thiện được động học của chúng) được thực hiện ở đây. Kết quả là đã phát hiện ra rằng nếu hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH thể nhân sớm là thấp hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó ở độ pH của huyết tương (máu), thì có thể liên kết nhiều lần với kháng nguyên và có thời gian bán thải trong huyết tương lâu hơn.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp liên kết phân tử liên kết kháng nguyên với kháng nguyên nhiều lần, phương pháp cải thiện dược động học của phân tử liên kết kháng nguyên và phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có dược động học được cải thiện; sáng chế cũng đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên mà có khả năng liên kết nhiều lần với kháng nguyên và phân tử liên kết kháng nguyên có dược động học được cải thiện. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất:

- (1) phân tử liên kết kháng nguyên có trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, được xác định là tỷ lệ của KD đối với kháng nguyên ở độ pH=5,8 và KD đối với kháng nguyên ở độ pH=7,4, bằng 2 hoặc lớn hơn;
- (2) phân tử liên kết kháng nguyên theo mục (1), trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ bằng 10 hoặc lớn hơn;
- (3) phân tử liên kết kháng nguyên theo mục (1), trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ bằng 40 hoặc lớn hơn;
- (4) phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên này đã được thay thế bằng histidin, hoặc ít nhất một histidin đã được cài vào phân tử liên kết kháng nguyên này;
- (5) phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này có hoạt tính đối kháng;
- (6) phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này liên kết với kháng nguyên màng hoặc kháng nguyên hòa tan;
- (7) phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể;
- (8) dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7);
- (9) phương pháp cải thiện dược động học của phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=5,8 so với hoạt tính ở độ pH=7,4;

- (10) phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên đối với phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=5,8 so với hoạt tính ở độ pH=7,4;
- (11) phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=5,8 so với hoạt tính ở độ pH=7,4;
- (12) phương pháp phân ly bên trong tế bào đối với kháng nguyên từ phân tử liên kết kháng nguyên đã được liên kết ngoại bào bằng cách làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=5,8 so với hoạt tính ở độ pH=7,4;
- (13) phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào bằng cách làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=5,8 so với hoạt tính ở độ pH=7,4;
- (14) phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=5,8 so với hoạt tính ở độ pH=7,4;
- (15) phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (9) đến (14), trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, được xác định là tỷ lệ của KD đối với kháng nguyên ở độ pH=5,8 và KD đối với kháng nguyên ở độ pH=7,4, bằng 2 hoặc lớn hơn;
- (16) phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (9) đến (14), trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ bằng 10 hoặc lớn hơn;
- (17) phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (9) đến (14), trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ bằng 40 hoặc lớn hơn;
- (18) phương pháp cải thiện dược động học của phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên này bằng histidin, hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên này;

- (19) phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên đối với phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên này bằng histidin, hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên này;
- (20) phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên có thể được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên này bằng histidin, hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên này;
- (21) phương pháp phân ly bên trong tế bào đối với kháng nguyên từ phân tử liên kết kháng nguyên đã được liên kết ngoại bào bằng cách thay thế ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên này bằng histidin, hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên này;
- (22) phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào trong tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào, bằng cách thay thế ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên này bằng histidin, hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên này;
- (23) phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương, bằng cách thay thế ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên này bằng histidin, hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên này;
- (24) phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (18) đến (23), trong đó việc thay thế hoặc cài histidin làm tăng trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, được xác định là tỷ lệ của hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ $pH=5,8$ và hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ $pH=7,4$, so với trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ trước khi thay thế hoặc cài histidin;
- (25) phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (9) đến (24), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính đối kháng;
- (26) phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (9) đến (25), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên màng hoặc kháng nguyên hòa tan;

(27) phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (9) đến (26), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể;

(28) phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;

(b) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5; và

(c) chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 lớn hơn hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(29) phương pháp sàng lọc theo mục (28), trong đó phương pháp này bao gồm bước lựa chọn kháng thể mà hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 gấp hai lần hoặc cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(30) phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho phân tử liên kết với kháng nguyên với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;

(b) đặt phân tử liên kết kháng nguyên mà liên kết với kháng nguyên nêu ở bước (a) trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5; và

(c) thu phân tử liên kết kháng nguyên mà được phân ly trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(31) phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;

(b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên mà liên kết với cột ở độ pH thứ nhất ra khỏi cột trong điều kiện độ pH thứ hai; và

(c) thu gom phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp;

(32) phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho thu viện phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;

(b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên ra khỏi cột trong điều kiện độ pH thứ hai;

(c) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp; và

(d) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp;

(33) phương pháp sàng lọc theo mục (31) hoặc (32), trong đó độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(34) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (33), trong đó ít nhất một hoặc nhiều axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên được thay thế bằng histidin, hoặc ít nhất một histidin được cài vào phân tử liên kết kháng nguyên;

(35) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (33), để thu phân tử liên kết kháng nguyên có thời gian lưu trong huyết thanh lâu hơn;

(36) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (33), để thu phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với kháng nguyên hai hoặc nhiều lần;

(37) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (33), để thu phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với nhiều kháng nguyên hơn so với nhiều vị trí liên kết kháng nguyên của nó;

(38) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (33), để thu phân tử liên kết kháng nguyên mà phân ly kháng nguyên được liên kết ngoại bào bên trong tế bào.

(39) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (33), để thu phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào trong tế bào, và được giải phóng ra khỏi tế bào dưới dạng không chứa kháng nguyên;

(40) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (33), để thu phân tử liên kết kháng nguyên được gia tăng khả năng loại bỏ kháng nguyên trong huyết thanh;

(41) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (40), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng làm được phẩm;

(42) phương pháp sàng lọc theo mục bất kỳ trong số các mục từ (28) đến (41), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể;

(43) phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;

(b) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(c) lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao hơn so với hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(d) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên được lựa chọn ở bước (c); và

(e) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (d);

(44) phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;

(b) để cho phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên nêu ở bước (a) trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(c) thu gom phân tử liên kết kháng nguyên đã phân ly trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

(d) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (c); và

(e) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (d);

(45) phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột đã được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;
- (b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên mà được liên kết với cột ở độ pH thứ nhất ra khỏi cột trong điều kiện độ pH thứ hai;
- (c) thu gom phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp;
- (d) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (c); và
- (e) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (d);

(46) phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho thu viên phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột đã được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;
- (b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên ra khỏi cột trong điều kiện độ pH thứ hai;
- (c) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp;
- (d) thu gom phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp;
- (e) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu gom được ở bước (d); và
- (f) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (e);

(47) phương pháp sản xuất theo mục (45) hoặc (46), trong đó độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5.

(48) phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (43) đến (47), trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thay thế ít nhất một axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên bằng histidin, hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết với kháng nguyên;

(49) phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (43) đến (48), trong đó phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể;

(50) được phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ (43) đến (49).

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra phân tử liên kết kháng nguyên để liên kết lặp lại với nhiều phân tử kháng nguyên. Khi phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với nhiều phân tử kháng nguyên, thì được động học của phân tử liên kết kháng nguyên có thể được cải thiện và phân tử này có thể tạo ra các tác dụng *in vivo* tốt hơn so với các tác dụng của các phân tử liên kết kháng nguyên thông thường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là sơ đồ thể hiện con đường phân hủy các kháng thể được liên kết với kháng nguyên liên kết màng.

FIG. 2 là sơ đồ thể hiện cơ chế mà các phân tử IgG được thu hồi bằng FcRn.

FIG. 3 là sơ đồ khái lược thể hiện việc liên kết lại của các phân tử IgG với kháng nguyên mới sau khi phân ly khỏi kháng nguyên liên kết màng bên trong các thể nhân.

FIG. 4 là sơ đồ khái lược thể hiện việc liên kết lại của các phân tử IgG với kháng nguyên mới sau khi phân ly khỏi kháng nguyên hòa tan bên trong các thể nhân.

FIG. 5 là sơ đồ thể hiện quy trình đãi mẫu bằng cách sử dụng cột được cố định kháng nguyên.

FIG. 6 là đồ thị thể hiện các kết quả ELISA thể thực khuẩn đối với các dòng vô tính thu được bằng cách đãi cột. Đồ thị phía trên thể hiện WT và đồ thị phía dưới thể hiện CL5.

FIG. 7 là đồ thị thể hiện hoạt tính trung hòa sinh học của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH.

FIG. 8 là đồ thị thể hiện các kết quả của cảm biến đồ Biacore đối với sự liên kết của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 hòa tan ở độ pH=7,4. Đồ thị trên cùng thể hiện WT; đồ thị thứ hai từ trên xuống thể hiện H3pI/L73; đồ thị thứ ba từ trên xuống thể hiện H170/L82; và đồ thị dưới cùng thể hiện CLH5/L73.

FIG. 9 là đồ thị thể hiện các kết quả của cảm biến đồ Biacore đối với sự liên kết của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 hòa tan ở độ pH=5,8. Đồ thị trên cùng thể hiện WT; đồ thị thứ hai từ trên xuống thể hiện H3pI/L73; đồ thị thứ ba từ trên xuống thể hiện H170/L82; và đồ thị dưới cùng thể hiện CLH5/L73.

FIG. 10 là đồ thị thể hiện các kết quả của cảm biến đồ Biacore đối với sự kết hợp (độ pH=7,4) và phân ly (độ pH=5,8) của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng. Đồ thị trên cùng thể hiện WT; đồ thị thứ hai từ trên xuống thể hiện H3pI/L73; đồ thị thứ ba từ trên xuống thể hiện H170/L82; và đồ thị dưới cùng thể hiện CLH5/L73.

FIG. 11 là cảm biến đồ Biacore thể hiện sự liên kết lặp lại của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH với SR344.

FIG. 12 là đồ thị thể hiện tổng lượng kháng nguyên được liên kết trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH với SR344.

FIG. 13 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ kháng thể trong huyết tương của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH ở chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người.

FIG. 14 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ kháng thể trong huyết tương của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH ở khi đầu chó.

FIG. 15 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ CRP ở khi đầu chó, liên quan đến các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH.

FIG. 16 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ của thụ thể IL-6 của khi đầu chó kiểu không được liên kết ở khi đầu chó, liên quan đến các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH.

FIG. 17 là đồ thị thể hiện các kết quả của cảm biến đồ Biacore đối với sự kết hợp (độ pH=7,4) và phân ly (độ pH=5,8) của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ

thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng. Theo thứ tự từ trên xuống, các kết quả đối với WT, H3pI/L73-IgG1, Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 lần lượt được thể hiện.

FIG. 18 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ của kháng thể trong huyết tương của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH (WT, H3pI/L73-IgG1, Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1) ở chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người.

FIG. 19 là đồ thị thể hiện các kết quả của cảm biến đồ Biacore đối với sự kết hợp (độ pH=7,4) và phân ly (độ pH=5,8) của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng. Theo thứ tự từ trên xuống, các kết quả đối với WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 và Fv4-M58 lần lượt được thể hiện.

FIG. 20 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ của kháng thể trong huyết tương của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH (WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 và Fv4-M58) ở chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người.

FIG. 21 là đồ thị thể hiện các kết quả của cảm biến đồ Biacore đối với sự kết hợp (độ pH=7,4) và phân ly (độ pH=5,8) của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng. Theo thứ tự từ trên xuống, các kết quả đối với Fv1-M71, Fv1-M73, Fv3-M71 và Fv3-M73 lần lượt được thể hiện.

FIG. 22 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ của kháng thể trong huyết tương của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH ở khi đầu chó, trong quá trình sử dụng H3pI/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 và Fv4-M73 ở liều 0,5mg/kg và trong quá trình sử dụng Ab có ái lực cao ở liều 1,0mg/kg.

FIG. 23 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ của CRP ở khi đầu chó, liên quan đến các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH (các nhóm được sử dụng H3pI/L73-IgG1-, Fv1-M71-, Fv1-M73-, Fv2-IgG1-, Fv3-M73-, Fv4-M73- và Ab có ái lực cao).

FIG. 24 là đồ thị thể hiện các khoảng thời gian theo nồng độ của thụ thể IL-6 của khi đầu chó kiểu không được liên kết ở khi đầu chó, liên quan đến các kháng thể kháng

thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH (các nhóm được sử dụng H3pI/L73-IgG1-, Fv1-M71-, Fv1-M73-, Fv2-IgG1-, Fv3-M73-, Fv4-M73- và Ab có ái lực cao).

FIG. 25 là đồ thị thể hiện FR1, FR2, FR3 và FR4 cùng với CDR1, CDR2 và CDR3 của các chuỗi nặng (VH1, VH2, VH3, VH4) và các chuỗi nhẹ (VL1, VL2, VL3). Các dấu hoa thị dùng để chỉ các vị trí xảy ra đột biến axit amin trong trình tự được sắp hàng.

FIG. 26 là cảm biến đồ Biacore thể hiện sự liên kết phụ thuộc độ pH của kháng thể kháng IL-6, kháng-IL6 dòng 2, với IL-6 ở độ pH=7,4 và độ pH=5,5. Các đường cong trong cảm biến đồ ở độ pH=7,4 tương ứng với 100, 50, 25, 12,5 và 6,25ng/mL IL-6, tính từ trên xuống.

FIG. 27 là cảm biến đồ Biacore thể hiện sự liên kết phụ thuộc độ pH của kháng thể kháng thụ thể IL-31, kháng-IL31R dòng 1, với thụ thể IL-31 ở độ pH=7,4 và độ pH=5,5. Các đường cong trong cảm biến đồ ở độ pH=5,5 tương ứng với 100, 50, 25 và 12,5ng/mL thụ thể IL-31, tính từ trên xuống.

FIG. 28 thể hiện khoảng thời gian theo nồng độ của kháng thể trong huyết tương sau khi cho chuột nhất sử dụng qua đường trong tĩnh mạch dung dịch hỗn hợp chứa SR344 và kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người.

FIG. 29 thể hiện khoảng thời gian theo nồng độ của SR344 trong huyết tương sau khi cho chuột nhất sử dụng qua đường trong tĩnh mạch dung dịch hỗn hợp chứa SR344 và kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên trong các phân tử liên kết kháng nguyên. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên trong các phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với ở độ pH trung tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên trong các phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế histidin bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài ít nhất một histidin

vào phân tử liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên trong các phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài các axit amin trong vùng ổn định của kháng thể của phân tử liên kết kháng nguyên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế histidin bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài các axit amin ở vùng ổn định của kháng thể của phân tử liên kết kháng nguyên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phân ly bên trong tế bào đối với kháng nguyên từ phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết ngoại bào. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp phân ly bên trong tế bào đối với kháng nguyên từ phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết ngoại bào bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết với kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phân ly bên trong tế bào đối với kháng nguyên từ phân tử liên kết với kháng nguyên được liên kết ngoại bào bằng cách thay thế histidin bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết với kháng nguyên hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp phân ly bên trong tế bào đối với kháng nguyên từ phân tử liên kết kháng nguyên đã được liên kết ngoại bào bằng cách thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài các axit amin ở vùng ổn định của kháng thể của phân tử liên kết kháng nguyên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào. Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết với kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào bằng cách thay thế histidin bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào bằng cách thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài các axit amin ở vùng ổn định của kháng thể của phân tử liên kết kháng nguyên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách thay thế histidin bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên để loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài các axit amin ở vùng ổn định của kháng thể của phân tử liên kết kháng nguyên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp cải thiện dược động học của phân tử liên kết kháng nguyên. Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện dược động học của

phân tử liên kết kháng nguyên (kéo dài thời gian lưu trong huyết tương) bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện được động học của phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế histidin bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp cải thiện được động học của phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài các axit amin ở vùng ổn định của kháng thể của phân tử liên kết kháng nguyên.

Sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên để loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên để loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết với kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính. Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên để loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách thay thế ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên bằng histidin hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên để loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài các axit amin ở vùng ổn định của kháng thể của phân tử liên kết kháng nguyên

Ở đây, “cải thiện được động học”, “làm giảm được động học”, “được động học tốt hơn” lần lượt có thể thay thế bằng “cải thiện thời gian lưu trong huyết tương (máu)”, “làm giảm thời gian lưu trong huyết tương (máu)” và “thời gian lưu tốt hơn trong huyết tương (máu)”, một cách tương ứng, và các cụm từ này là đồng nghĩa với nhau.

Ở đây, làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính có nghĩa là khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 được làm suy giảm so với khả năng liên kết ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7

đến 10,0, tốt hơn là khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 được làm suy giảm so với khả năng liên kết ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, và tốt hơn là khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 được làm suy giảm so với khả năng liên kết ở độ pH=7,4. Do đó, theo sáng chế, độ pH axit nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, và tốt hơn nữa là ở độ pH=5,8. Theo cách khác, theo sáng chế, độ pH trung tính nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, và tốt hơn là ở độ pH=7,4.

Ở đây, cụm từ "làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng liên kết ở độ pH trung tính" có thể thay thế bằng cụm từ "làm tăng khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH trung tính so với khả năng liên kết ở độ pH axit". Nói cách khác, theo sáng chế, sự khác biệt về khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên nên được làm tăng giữa độ pH axit và độ pH trung tính. Ví dụ, trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ nên được làm tăng, như được mô tả dưới đây. Sự khác biệt về khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên giữa độ pH axit và độ pH trung tính có thể được làm tăng, ví dụ, bằng một trong hai cách hoặc cả hai cách, làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên ở độ pH axit và làm tăng khả năng liên kết kháng nguyên ở độ pH trung tính.

Các điều kiện không phải độ pH để xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được lựa chọn thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và các điều kiện này không được giới hạn cụ thể. Hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được xác định, ví dụ, trong các điều kiện dung dịch đệm MES và nhiệt độ 37°C như được mô tả ở đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn nữa, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có thể được xác định bằng các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng Biacore (GE Healthcare) hoặc phương pháp tương tự, như được mô tả ở đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Khi kháng nguyên là kháng nguyên hòa tan, thì hoạt tính liên kết kháng nguyên hòa tan này có thể được đánh giá bằng cách tiêm kháng

nguyên này dưới dạng chất phân tích lên chip được cố định bằng phân tử liên kết kháng nguyên. Theo cách khác, khi kháng nguyên là kháng nguyên màng, thì hoạt tính liên kết với màng này có thể được đánh giá bằng cách tiêm phân tử liên kết kháng nguyên dưới dạng chất phân tích lên chip được cố định kháng nguyên.

Theo sáng chế, sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên giữa độ pH axit và độ pH trung tính không bị giới hạn cụ thể miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH axit là thấp hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH trung tính. Tuy nhiên, trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, là tỷ lệ giữa hằng số phân ly (dissociation constant - KD) đối với kháng nguyên ở độ pH=5,8 và hằng số phân ly đối với kháng nguyên ở độ pH=7,4, tốt hơn là bằng 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là bằng 10 hoặc lớn hơn, và tốt hơn là bằng 40 hoặc lớn hơn. Giới hạn trên của trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ không bị giới hạn cụ thể, và có thể là trị số bất kỳ, ví dụ, 400, 1000 hoặc 10000, miễn là phân tử này có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Khi kháng nguyên này là kháng nguyên hòa tan, thì hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được thể hiện theo hằng số phân ly (KD). Theo cách khác, khi kháng nguyên này là kháng nguyên màng, thì hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được thể hiện theo hằng số phân ly biểu kiến. Hằng số phân ly (KD) và hằng số phân ly biểu kiến (KD biểu kiến) có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng Biacore (GE healthcare), đồ thị Scatchard, hoặc FACS.

Theo cách khác, có thể sử dụng, ví dụ, k_d , hằng số tốc độ phân ly, làm yếu tố chỉ thị đối với sự khác biệt về hoạt tính liên kết kháng nguyên giữa độ pH axit và độ pH trung tính. Khi hằng số tốc độ phân ly (k_d) được sử dụng làm yếu tố chỉ thị đối với sự khác biệt về hoạt tính liên kết thay vì hằng số phân ly (KD), thì trị số $k_d(pH=5,8)/k_d(pH=7,4)$, là tỷ lệ giữa hằng số tốc độ phân ly (k_d) đối với kháng nguyên ở độ pH=5,8 so với ở độ pH=7,4, tốt hơn là bằng 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là bằng 5 hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là bằng 10 hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là bằng 30 hoặc lớn hơn. Giới hạn trên của trị số $k_d(pH=5,8)/k_d(pH=7,4)$ không được giới hạn cụ thể và có thể là trị số bất kỳ, ví dụ, 50, 100 hoặc 200, miễn là phân tử này có thể sản xuất

được bằng các kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Khi kháng nguyên này là kháng nguyên hòa tan thì hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được thể hiện theo hằng số tốc độ phân ly (k_d). Theo cách khác, khi kháng nguyên này là kháng nguyên màng thì hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể được thể hiện theo hằng số tốc độ phân ly biểu kiến. Hằng số tốc độ phân ly (k_d) và hằng số tốc độ phân ly biểu kiến (k_d biểu kiến) có thể xác định được bằng các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng Biacore (GE healthcare) hoặc FACS.

Theo sáng chế, khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên được xác định ở các độ pH khác nhau, ưu tiên các điều kiện đo ngoại trừ độ pH là không đổi.

Phương pháp làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 so với hoạt tính liên kết ở độ pH=7,4 (phương pháp tạo ra khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH) không được giới hạn cụ thể và có thể là phương pháp bất kỳ. Ví dụ, các phương pháp này bao gồm các phương pháp làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 so với hoạt tính liên kết ở độ pH=7,4 bằng cách thay thế histidin bằng các axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên. Đã biết rằng kháng thể có thể được tạo ra với khả năng liên kết kháng nguyên phụ thuộc vào độ pH bằng cách thay thế histidin bằng các axit amin trong kháng thể này (FEBS Letter, 309(1), 8588 (1992)). Các vị trí đột biến (thay thế) hoặc cài histidin này không được giới hạn cụ thể, và vị trí bất kỳ có thể chấp nhận được miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH=7,4 (trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ lớn hơn) so với trước khi đột biến hoặc cài. Khi phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể, thì các vị trí này bao gồm, ví dụ, các vị trí nằm trong vùng biến đổi của kháng thể. Số lượng thích hợp của các vị trí đột biến hoặc cài histidin có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này xác định một cách thích hợp. Histidin có thể được thay thế hoặc cài ở vị trí duy nhất hoặc hai hoặc nhiều vị trí. Đồng thời, có thể đưa vào đột biến

không phải histidin (đột biến bằng các axit amin không phải histidin). Ngoài ra, đột biến histidin có thể được đưa vào đồng thời với cái histidin. Có thể thay thế hoặc cái histidin một cách ngẫu nhiên bằng cách sử dụng phương pháp quét histidin, phương pháp này sử dụng histidin thay cho alanin trong phương pháp quét alanin mà đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Theo cách khác, phân tử liên kết kháng nguyên có KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4) tăng so với trước khi đột biến có thể được lựa chọn từ thư viện phân tử liên kết kháng nguyên với việc đột biến hoặc cái histidin ngẫu nhiên.

Khi histidin được thay thế bằng các axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên hoặc được cái giữa các axit amin của phân tử này, tốt hơn là, nhưng không nhất thiết, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=7,4 sau khi thay thế hoặc cái histidin tương đương so với hoạt tính ở độ pH=7,4 trước khi thay thế hoặc cái histidin. "Hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH=7,4 sau khi thay thế hoặc cái histidin tương đương với hoạt tính ở độ pH=7,4 trước khi thay thế hoặc cái histidin" có nghĩa là ngay cả sau khi thay thế hoặc cái histidin, phân tử liên kết kháng nguyên này vẫn giữ được 10% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 50% hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là 90% hoặc nhiều hơn, hoạt tính liên kết kháng nguyên trước khi thay thế hoặc cái histidin. Khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên được làm suy giảm do thay thế hoặc cái histidin, hoạt tính liên kết kháng nguyên này có thể được điều chỉnh bằng cách đưa đột biến thay thế, đột biến khuyết, đột biến thêm và/hoặc đột biến cái của một hoặc nhiều axit amin vào phân tử liên kết kháng nguyên để cho hoạt tính liên kết kháng nguyên có thể so sánh được với hoạt tính liên kết trước khi thay thế hoặc cái histidin. Sáng chế cũng đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết so sánh được do thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cái một hoặc nhiều axit amin trước khi thay thế hoặc cái histidin.

Các phương pháp khác làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 so với hoạt tính liên kết ở độ pH=7,4 bao gồm các phương pháp thay thế các axit amin không có trong tự nhiên bằng các axit amin trong

phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài các axit amin không có trong tự nhiên vào các axit amin của phân tử liên kết kháng nguyên. Đã biết rằng pKa có thể kiểm soát được theo cách nhân tạo sử dụng các axit amin không có trong tự nhiên (Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34; Chem Soc Rev. 2004 Sep 10;33(7):422-30; Amino Acids. 1999;16(3-4):345-79). Do đó, theo sáng chế, các axit amin không có trong tự nhiên có thể được sử dụng thay cho histidin được mô tả ở trên. Việc thay thế và/hoặc cài axit amin không có trong tự nhiên có thể được đưa vào đồng thời với việc thay thế và/hoặc cài histidin được mô tả ở trên. Các axit amin không có trong tự nhiên bất kỳ có thể được sử dụng theo sáng chế. Có thể sử dụng các axit amin không có trong tự nhiên đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Hơn nữa, khi phân tử liên kết kháng nguyên là chất có vùng ổn định kháng thể, các phương pháp khác làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 so với hoạt tính liên kết ở độ pH=7,4 bao gồm các phương pháp cải biến vùng ổn định kháng thể chứa trong phân tử liên kết kháng nguyên này. Ví dụ, các phương pháp cải biến vùng ổn định kháng thể bao gồm các phương pháp thay thế vùng ổn định được mô tả ở đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Ví dụ, các phương pháp khác cải biến vùng ổn định kháng thể bao gồm các phương pháp đánh giá các isotyp của vùng ổn định khác nhau (IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4) và lựa chọn isotyp làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 (làm tăng tốc độ phân ly ở độ pH=5,8). Theo cách khác, các phương pháp này bao gồm các phương pháp làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 (làm tăng tốc độ phân ly ở độ pH=5,8) bằng cách thay thế các axit amin trong trình tự axit amin của isotyp kiểu đại (trình tự axit amin của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 kiểu đại). Trình tự vùng bản lề của vùng ổn định kháng thể có sự khác biệt đáng kể giữa các isotyp (IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4), và sự khác biệt về trình tự axit amin của vùng bản lề này có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính liên kết kháng nguyên. Do đó, có thể lựa chọn các isotyp thích hợp để làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 (để làm tăng tốc độ phân ly ở độ pH=5,8) bằng cách xem xét loại kháng nguyên hoặc epitop. Hơn nữa, do sự khác biệt về trình tự axit amin của vùng bản lề có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính

liên kết kháng nguyên, nên các vị trí thay thế axit amin được ưu tiên trong trình tự axit amin của isotyp kiểu đại được cho là nằm trong vùng bản lề.

Khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của chất liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 được làm suy giảm so với hoạt tính liên kết ở độ pH=7,4 (khi trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ tăng) bằng các phương pháp được mô tả ở trên và các phương pháp tương tự, trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ tốt hơn là cao gấp hai lần hoặc nhiều hơn, tốt hơn là cao gấp năm lần hoặc nhiều hơn, tốt hơn là cao gấp 10 lần hoặc nhiều hơn, so với trị số KD của kháng thể ban đầu, mặc dù sáng chế không bị giới hạn cụ thể ở các giới hạn này.

Ở đây, "cải thiện được động học" có nghĩa là kéo dài thời gian cần để loại bỏ phân tử liên kết kháng nguyên ra khỏi huyết tương (ví dụ, đạt tới trạng thái mà ở đó phân tử liên kết kháng nguyên không thể trở lại huyết tương do sự phân hủy trong tế bào, hoặc các lý do khác) sau khi sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt, chuột thường, khỉ, thỏ hoặc chó, cũng như kéo dài thời gian lưu trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên ở dạng có khả năng liên kết với các kháng nguyên (ví dụ, ở dạng không chứa kháng nguyên) trong suốt khoảng thời gian này cho đến khi nó được loại bỏ ra khỏi huyết tương sau khi sử dụng. Thậm chí nếu phân tử liên kết kháng nguyên được tuần hoàn trong huyết tương, nó không thể liên kết với kháng nguyên khi nó đã liên kết với kháng nguyên khác. Do đó, khoảng thời gian mà phân tử liên kết kháng nguyên có thể vừa mới liên kết với kháng nguyên khác sẽ được kéo dài (cơ hội liên kết với kháng nguyên khác gia tăng) bằng cách kéo dài khoảng thời gian mà phân tử liên kết kháng nguyên ở dạng không chứa kháng nguyên. Điều này có thể rút ngắn khoảng thời gian mà kháng nguyên không liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên *in vivo* (nói cách khác, để kéo dài khoảng thời gian mà kháng nguyên được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên). Ví dụ, tỷ lệ của các kháng nguyên được liên kết với các phân tử liên kết kháng nguyên và các kháng nguyên trong cơ thể trong huyết tương (tổng số các phân tử kháng nguyên được liên kết và không liên kết với các phân tử liên kết với kháng nguyên) thường làm giảm trong khoảng thời gian nhất định sau khi sử dụng các phân tử liên kết kháng nguyên này.

Tuy nhiên, việc làm giảm như vậy có thể bị ức chế (ví dụ, mức độ giảm có thể được tiến hành ít hơn) bằng cách kéo dài thời gian lưu của phân tử liên kết kháng nguyên ở dạng có khả năng liên kết với kháng nguyên. Kết quả này làm tăng tỷ lệ của kháng nguyên liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên so với kháng nguyên trong cơ thể trong khoảng thời gian nhất định sau khi sử dụng kháng thể.

Cụ thể, theo sáng chế, "cải thiện được động học" không nhất thiết có nghĩa là kéo dài khoảng thời gian cần để loại bỏ phân tử liên kết kháng nguyên sau khi sử dụng. Thậm chí nếu thời gian cần để loại bỏ phân tử liên kết kháng nguyên sau khi sử dụng vẫn không thay đổi, thì được động học này có thể coi là "được cải thiện" theo sáng chế nếu:

thời gian lưu trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên ở dạng có khả năng liên kết với kháng nguyên (ví dụ, phân tử liên kết với kháng nguyên ở dạng không chứa kháng nguyên) được kéo dài;

khoảng thời gian mà kháng nguyên không liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên trong cơ thể được rút ngắn (nói cách khác, khoảng thời gian mà phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên được kéo dài); và

tỷ lệ của các kháng nguyên được liên kết với các phân tử liên kết kháng nguyên đối với các kháng nguyên trong cơ thể được gia tăng. Do đó, theo sáng chế, "cải thiện được động học" ít nhất là bao gồm các bước:

(1) kéo dài thời gian cần để loại bỏ phân tử liên kết kháng nguyên ra khỏi huyết tương sau khi sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên;

(2) kéo dài thời gian lưu trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên ở dạng có khả năng liên kết với kháng nguyên sau khi sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên;

(3) rút ngắn khoảng thời gian mà kháng nguyên không liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên trong cơ thể sau khi sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên (kéo dài khoảng thời gian mà phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên trong cơ thể); và

(4) làm gia tăng tỷ lệ của các kháng nguyên được liên kết với các phân tử liên kết kháng nguyên và kháng nguyên trong cơ thể.

Khi kháng nguyên này là kháng nguyên hòa tan có trong huyết tương, thì thậm chí nếu được động học của phân tử liên kết kháng nguyên (tốc độ loại bỏ ra khỏi huyết tương) là tương đương, thì có nhiều trường hợp mà việc loại bỏ kháng nguyên được liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên được gia tăng. Việc làm giảm được động học của kháng nguyên (gia tăng việc loại bỏ khỏi huyết tương) dẫn đến việc cải thiện tương đối được động học của phân tử liên kết kháng nguyên, và do đó, dẫn đến việc kéo dài thời gian phân tử liên kết kháng nguyên có ở dạng có khả năng liên kết với các kháng nguyên. Do đó, theo một phương án, "cải thiện được động học" của các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm việc làm tăng tốc độ loại bỏ các kháng nguyên hòa tan ra khỏi huyết tương sau khi sử dụng các phân tử liên kết kháng nguyên (khả năng phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ các kháng nguyên ra khỏi huyết tương).

Theo sáng chế, khi kháng nguyên này là kháng nguyên màng, thì liệu việc phân tử liên kết kháng nguyên đơn liên kết với nhiều kháng nguyên có thể đánh giá được bằng cách kiểm tra xem liệu được động học của phân tử liên kết kháng nguyên có được cải thiện hay không. “Được động học được cải thiện” có thể đánh giá được bằng phương pháp sau. Ví dụ, liệu thời gian cần để loại bỏ phân tử liên kết kháng nguyên sau khi sử dụng được kéo dài có thể đánh giá được bằng cách xác định một trong các thông số bất kỳ trong số các thông số đối với phân tử liên kết kháng nguyên này, như thời gian bán thải trong huyết tương, thời gian lưu trung bình trong huyết tương và mức thanh thải trong huyết tương (“Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice)” Nanzando). Ví dụ, thời gian bán thải trong huyết tương hoặc thời gian lưu trung bình trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng cho chuột nhắt, chuột thường, khỉ, thỏ, chó, người hoặc các động vật khác, được kéo dài, được động học của phân tử liên kết với kháng nguyên này được đánh giá là được cải thiện. Các thông số này có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các thông số này có thể được đánh giá một cách thích hợp bằng phép phân tích không phân ô bằng cách sử dụng phần mềm phân tích được động học WinNonlin (Pharsight) theo sổ tay hướng dẫn kèm theo.

Theo cách khác, liệu thời gian lưu trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên ở dạng có khả năng liên kết với các kháng nguyên sau khi sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên này được kéo dài có thể đánh giá được bằng cách đo nồng độ trong huyết tương của phân tử liên kết kháng nguyên không chứa kháng nguyên và xác định một thông số bất kỳ trong số các thông số của phân tử liên kết kháng nguyên không chứa kháng nguyên, như thời gian bán thải trong huyết tương, thời gian lưu trung bình trong huyết tương và mức thanh thải trong huyết tương. Nồng độ của phân tử liên kết kháng nguyên không chứa kháng nguyên trong huyết tương có thể đo được bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các phép đo này được mô tả trong ấn phẩm Clin Pharmacol. 2008 Apr;48(4):406-17.

Ngoài ra, liệu khoảng thời gian mà kháng nguyên không liên kết với liên kết kháng nguyên trong cơ thể sau khi sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên được rút ngắn (khoảng thời gian mà phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên trong cơ thể được kéo dài) có thể đánh giá được bằng cách xác định nồng độ trong huyết tương của kháng nguyên không được liên kết mà không liên kết với các phân tử liên kết kháng nguyên, và xem xét khoảng thời gian mà nồng độ của kháng nguyên tự do trong huyết tương hoặc tỷ lệ về lượng của kháng nguyên tự do đối với tổng lượng kháng nguyên vẫn ở mức thấp. Nồng độ của kháng nguyên tự do trong huyết tương hoặc tỷ lệ về lượng của kháng nguyên tự do và tổng lượng kháng nguyên có thể xác định được bằng các phương pháp đã biết rõ người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các phép đo này được mô tả trong ấn phẩm Pharm Res. 2006 Jan;23(1):95-103. Theo cách khác, khi kháng nguyên có chức năng xác định *in vivo*, kháng nguyên này có được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên mà trung hòa chức năng của kháng nguyên (phân tử đối kháng) có thể đánh giá được bằng cách kiểm tra xem chức năng của kháng nguyên có được trung hòa hay không. Chức năng của kháng nguyên được trung hòa có thể đánh giá được bằng cách thử nghiệm *in vivo* chất chỉ thị phản ánh chức năng của kháng nguyên này. Liệu kháng nguyên này có được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên hoạt hóa chức năng của kháng nguyên này (phân tử chủ vận) có thể đánh

giá được bằng cách thử nghiệm *in vivo* chất chỉ thị phản ánh chức năng của kháng nguyên này.

Không có giới hạn cụ thể đối với việc xác định nồng độ trong huyết tương của kháng nguyên tự do và tỷ lệ về lượng của kháng nguyên tự do đối với tổng lượng kháng nguyên, và thử nghiệm chất chỉ thị *in vivo*, nhưng việc xác định này tốt hơn là được thực hiện sau khoảng thời gian nhất định sau khi sử dụng chất liên kết kháng nguyên. Theo sáng chế, khoảng thời gian sau khi sử dụng chất liên kết kháng nguyên không được giới hạn cụ thể, và khoảng thời gian thích hợp có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này xác định dựa trên các đặc tính của chất liên kết kháng nguyên và chất tương tự được sử dụng. Ví dụ về khoảng thời gian này là: 1 ngày sau khi sử dụng chất liên kết kháng nguyên; 3 ngày sau khi sử dụng chất liên kết kháng nguyên; 7 ngày sau khi sử dụng chất liên kết kháng nguyên; 14 ngày sau khi sử dụng chất liên kết kháng nguyên; và 28 ngày sau khi sử dụng chất liên kết kháng nguyên.

Theo sáng chế, tốt hơn là cải thiện được động học ở người. Ngay cả khi thời gian lưu trong huyết tương là rất khó xác định ở người, có thể được dự đoán dựa trên thời gian lưu trong huyết tương ở chuột nhắt (ví dụ, chuột nhắt bình thường, chuột nhắt chuyển gen biểu hiện kháng nguyên ở người và chuột nhắt chuyển gen biểu hiện FcRn ở người) hoặc khỉ (ví dụ, khỉ đầu chó).

Các phương pháp xác định thời gian lưu trong huyết tương không được giới hạn cụ thể. Việc xác định này có thể được thực hiện, ví dụ, theo các phương pháp được mô tả ở đây trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Liệu phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết nhiều lần với kháng nguyên có thể đánh giá được bằng cách kiểm tra xem kháng nguyên có được liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên trong cùng điều kiện trung tính hay không khi huyết tương phân ly trong cùng điều kiện axit giống như thể nhân hay không và phân tử liên kết với kháng nguyên có thể liên kết lại với bao nhiêu kháng nguyên trong điều kiện trung tính. Cụ thể, việc đánh giá này có thể thực hiện được bằng cách cho phép phân tử liên kết kháng nguyên và kháng nguyên tạo thành phức hợp trong điều kiện trung tính, cho phức hợp này tiếp xúc với điều kiện axit trong khoảng thời gian định trước, và sau

đó kiểm tra xem liệu phân tử liên kết kháng nguyên có thể liên kết lại với kháng nguyên trong điều kiện trung tính hay không, bằng cách sử dụng thiết bị để thử nghiệm các phản ứng của phân tử liên kết kháng nguyên-kháng nguyên, như Biacore. Khi khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH đã được cải thiện gấp hai lần so với khả năng liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên trước khi cải biến, thì thời gian liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH có thể được xác nhận là được gia tăng gấp hai lần so với khả năng liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên trước khi cải biến. Theo cách khác, khi kháng nguyên là kháng nguyên màng và do đó phân tử liên kết kháng nguyên được loại bỏ ra khỏi huyết tương thông qua sự hấp thụ và phân hủy qua trung gian kháng nguyên trong lysosom, thời gian liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH có được gia tăng so với trước khi cải biến hay không có thể đánh giá được bằng cách so sánh được động học hoặc khoảng thời gian liên kết với kháng nguyên giữa phân tử liên kết với kháng nguyên có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH và phân tử liên kết với kháng nguyên trước khi cải biến. Ví dụ, khi khoảng thời gian liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH được kéo dài gấp hai lần so với khoảng thời gian liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên trước khi cải biến, thời gian liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH được xác định là được gia tăng hai lần so với thời gian liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên trước khi cải biến. Theo cách khác, khi nồng độ trong huyết tương của kháng nguyên không được liên kết, tức là kháng nguyên không liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên, được xác định và khoảng thời gian mà nồng độ trong huyết tương của kháng nguyên tự do hoặc tỷ lệ về lượng giữa kháng nguyên tự do và tổng lượng kháng nguyên vẫn thấp được kéo dài gấp hai lần, thì thời gian liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH được xác định là được gia tăng hai lần so với thời gian liên kết của phân tử liên kết với kháng nguyên trước khi cải biến.

Khi kháng nguyên là kháng nguyên hòa tan, nếu kháng nguyên này được liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên trong điều kiện trung tính trong huyết tương phân

ly trong thể nhân, và phân tử liên kết kháng nguyên quay trở lại huyết tương, thì phân tử liên kết kháng nguyên này có thể liên kết lại với kháng nguyên trong điều kiện trung tính trong huyết tương. Do đó, phân tử liên kết kháng nguyên mà có các đặc tính phân ly kháng nguyên trong điều kiện axit của thể nhân có khả năng liên kết với các kháng nguyên nhiều lần. So với khi kháng nguyên được liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên không phân ly trong thể nhân (kháng nguyên này vẫn được liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên khi trở lại huyết tương), khi kháng nguyên được liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên phân ly trong thể nhân thì kháng nguyên này được phân phối tới lysosom và tiếp theo được phân hủy, và do đó, tốc độ loại bỏ kháng nguyên ra khỏi huyết tương tăng lên. Có nghĩa là cũng có thể xác định được phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với các kháng nguyên nhiều lần hay không bằng cách sử dụng tốc độ loại bỏ kháng nguyên ra khỏi huyết tương dưới dạng chỉ số. Tốc độ loại bỏ kháng nguyên khỏi huyết tương có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng các kháng nguyên (ví dụ, kháng nguyên màng) và các phân tử liên kết kháng nguyên *in vivo*, và tiếp theo đo nồng độ của các kháng nguyên trong huyết tương. Khi kháng nguyên (ví dụ, kháng nguyên màng) được sản sinh hoặc tiết ra *in vivo*, nồng độ kháng nguyên trong huyết tương sẽ giảm nếu tốc độ loại bỏ kháng nguyên ra khỏi huyết tương tăng lên. Do đó, cũng có thể xác định được phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với các kháng nguyên nhiều lần hay không bằng cách sử dụng nồng độ kháng nguyên trong huyết tương làm chỉ số.

Ở đây, “làm tăng số lần liên kết với kháng nguyên của phân tử liên kết với kháng nguyên” có nghĩa là số chu kỳ được tăng lên khi thực hiện dưới dạng quy trình một chu kỳ mà ở đó phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng cho người, chuột nhắt, khỉ hoặc loài tương tự, hoặc liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào. Cụ thể, ở đây, “phân tử liên kết kháng nguyên liên kết hai lần với kháng nguyên” có nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết bằng kháng nguyên được hấp thụ vào tế bào và giải phóng ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào, và phân tử liên kết kháng nguyên được giải phóng này liên kết lại với kháng nguyên khác và được hấp thụ lại vào tế bào.

Khi phân tử liên kết với kháng nguyên được hấp thụ vào tế bào, nó có thể ở dạng được liên kết bằng một kháng nguyên, hoặc hai hoặc nhiều kháng nguyên.

Ở đây, “số lần liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên được tăng lên” không nhất thiết có nghĩa là số lần liên kết kháng nguyên tăng lên ở mọi phân tử liên kết kháng nguyên. Ví dụ, trong số các phân tử liên kết kháng nguyên trong chế phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên, tỷ lệ của các phân tử liên kết kháng nguyên mà liên kết với kháng nguyên hai lần hoặc nhiều lần có thể tăng lên, hoặc số lượng trung bình của các trường hợp liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên trong chế phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên có thể tăng lên.

Theo sáng chế, tốt hơn nếu số lần liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên tăng lên khi phân tử này được sử dụng cho người. Tuy nhiên, rất khó xác định số lần liên kết với kháng nguyên ở người, số lần này ở người có thể được dự đoán dựa trên các kết quả thu được bằng thử nghiệm *in vitro* hoặc phép đo bằng cách sử dụng chuột nhắt (ví dụ, chuột nhắt chuyển gen biểu hiện kháng nguyên và chuột nhắt chuyển gen biểu hiện FcRn của người) hoặc khỉ (ví dụ, khỉ đầu chó).

Theo sáng chế, tốt hơn nếu phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên hai lần hoặc nhiều lần. Ví dụ, được ưu tiên rằng các phân tử liên kết kháng nguyên trong chế phẩm phân tử liên kết kháng nguyên, ít nhất là 10% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 30% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 50% hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là 80% hoặc lớn hơn (ví dụ, 90% hoặc lớn hơn, 95% hoặc lớn hơn, v.v...) liên kết với các kháng nguyên hai lần hoặc nhiều lần.

Ở đây, "làm tăng số lượng kháng nguyên mà có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên" có nghĩa là làm tăng số lượng kháng nguyên mà có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên trong suốt khoảng thời gian cho đến khi phân tử liên kết kháng nguyên này bị phân hủy trong lysosom của tế bào sau khi sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ.

Nói chung, các kháng thể như IgG có hai miền liên kết, và do đó một kháng thể liên kết với tối đa hai kháng nguyên. Kháng thể được liên kết với (các) kháng nguyên được hấp thụ vào tế bào, và kháng thể và (các) kháng nguyên được phân hủy trong

lysosom. Nói chung, các kháng thể như IgG có thể liên kết tối đa với hai kháng nguyên. Khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên như kháng thể ở độ pH thể nhân bị suy giảm so với hoạt tính ở độ pH huyết tương bằng các phương pháp theo sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên như kháng thể được hấp thụ vào tế bào làm phân ly kháng nguyên và được giải phóng ra khỏi tế bào, và do đó có thể liên kết lại với một kháng nguyên khác. Nói cách khác, các phương pháp theo sáng chế cho phép phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với nhiều kháng nguyên hơn so với nhiều vị trí liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, bằng cách sử dụng các phương pháp theo sáng chế, ví dụ, IgG có hai vị trí liên kết kháng nguyên có thể liên kết với ba kháng nguyên hoặc nhiều hơn, tốt hơn là bốn kháng nguyên hoặc nhiều hơn, trong suốt khoảng thời gian cho đến khi kháng thể này bị phân hủy sau khi sử dụng. Ví dụ, khi kháng thể là kháng thể trung hòa, "làm tăng số lượng kháng nguyên mà có thể được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên" có thể thay thế bằng "làm tăng số lượng kháng nguyên mà phân tử liên kết kháng nguyên có thể trung hòa". Do đó, "liên kết" có thể được thay bằng "trung hòa" khi kháng thể là kháng thể trung hòa.

Theo sáng chế, "làm tăng số lượng kháng nguyên mà có thể được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên" không nhất thiết phải có nghĩa là làm tăng số lượng kháng nguyên mà có thể được liên kết bởi mọi phân tử liên kết kháng nguyên. Ví dụ, số lượng kháng nguyên trung bình mà có thể được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên trong chế phẩm phân tử liên kết kháng nguyên có thể tăng lên, hoặc tỷ lệ của các phân tử liên kết kháng nguyên mà có thể liên kết với nhiều kháng nguyên hơn so với nhiều vị trí liên kết kháng nguyên của nó có thể tăng lên.

Theo sáng chế, tốt hơn nếu số lượng các kháng nguyên mà có thể được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên tăng lên khi phân tử này được sử dụng cho người. Tuy nhiên, khi rất khó xác định được số lượng này ở người, có thể được dự đoán dựa trên các kết quả thu được bằng thử nghiệm *in vitro* hoặc phép đo bằng cách sử dụng chuột nhắt (ví dụ, chuột nhắt chuyển gen biểu hiện kháng nguyên hoặc chuột nhắt chuyển gen biểu hiện FcRn của người) hoặc khi (ví dụ, khi đầu chó). Khi kháng thể là kháng thể trung hòa, thời gian liên kết với kháng nguyên được mô tả ở trên của phân tử liên kết với

kháng nguyên thường được cho là tương quan với số lượng kháng nguyên mà có thể được trung hòa bởi phân tử liên kết kháng nguyên. Do đó, số lượng kháng nguyên mà có thể được trung hòa bởi phân tử liên kết kháng nguyên có thể xác định được bằng cùng phương pháp được mô tả ở trên để xác định số lần liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp liên kết phân tử liên kết kháng nguyên với các kháng nguyên hai lần hoặc nhiều lần trong cơ thể, bằng cách sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH axit thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH trung tính.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp trung hòa các kháng nguyên với số lượng lớn hơn so với nhiều vị trí liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính trung hòa, bằng cách sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH axit thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH trung tính. Tốt hơn nếu sáng chế đề cập đến phương pháp trung hòa ba kháng nguyên hoặc nhiều hơn, tốt hơn là bốn kháng nguyên hoặc nhiều hơn bằng cách sử dụng IgG có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH axit thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH trung tính.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân ly kháng nguyên trong tế bào ra khỏi phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết ngoại bào bằng cách làm suy giảm hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với hoạt tính ở độ pH trung tính. Theo sáng chế, kháng nguyên này có thể được phân ly ra khỏi phân tử liên kết kháng nguyên ở vị trí bất kỳ bên trong tế bào; tuy nhiên, tốt hơn là kháng nguyên được phân ly bên trong thể nhân sớm. Theo sáng chế, "kháng nguyên được phân ly bên trong tế bào ra khỏi phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết ngoại bào" không nhất thiết phải có nghĩa là mọi kháng nguyên được hấp thụ vào tế bào thông qua việc liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên được phân ly khỏi phân tử liên kết với kháng nguyên này bên trong tế bào. Có thể chấp nhận rằng tỷ lệ của kháng nguyên được phân ly khỏi phân tử liên kết kháng nguyên bên trong tế bào tăng lên so với trước khi làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng cường sự liên kết nội bào của phân tử liên kết kháng nguyên không chứa kháng nguyên với FcRn bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính. Nói chung, fcRn liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên bên trong thể nhân. Tuy nhiên, phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên màng được cho là không liên kết với FcRn. Do đó, theo phương án được ưu tiên, khi kháng nguyên là kháng nguyên liên kết màng, sáng chế bao gồm phương pháp tăng cường sự phân ly trong thể nhân của các kháng nguyên ra khỏi các phân tử liên kết kháng nguyên và do đó tăng cường sự liên kết với FcRn của các phân tử liên kết kháng nguyên, bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH thể nhân (độ pH axit) so với khả năng ở độ pH huyết tương (độ pH trung tính). Khi kháng nguyên là kháng nguyên hòa tan, phân tử liên kết kháng nguyên có thể liên kết với FcRn với sự có mặt hoặc không có mặt của kháng nguyên này. Nếu sự phân ly kháng nguyên ra khỏi phân tử liên kết kháng nguyên bên trong thể nhân có thể được thúc đẩy bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nội thể nhân (axit) so với khả năng ở độ pH huyết tương (trung tính), sự liên kết với FcRn của phân tử liên kết kháng nguyên mà "không chứa kháng nguyên" có thể được tăng cường bằng các phương pháp theo sáng chế.

Bất kể kháng nguyên là kháng nguyên liên kết màng hoặc hòa tan, nếu phân tử liên kết kháng nguyên mà không chứa kháng nguyên có thể quay trở lại huyết tương có FcRn, thì phân tử liên kết kháng nguyên này có thể liên kết lại với kháng nguyên. Bằng cách lặp lại quy trình này, phân tử liên kết kháng nguyên có thể liên kết với kháng nguyên nhiều lần. Theo sáng chế, "tăng cường sự liên kết với FcRn của phân tử liên kết kháng nguyên bên trong tế bào" không nhất thiết phải có nghĩa là mọi phân tử liên kết kháng nguyên đều liên kết với FcRn. Có thể chấp nhận rằng tỷ lệ phân tử liên kết kháng nguyên không chứa kháng nguyên mà liên kết với FcRn bên trong tế bào tăng lên so với trước khi làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH thể nhân so với khả năng ở độ pH huyết tương. Các phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên trong phương pháp theo sáng chế để tăng cường liên kết nội

bào giữa phân tử liên kết kháng nguyên và FcRn bao gồm, ví dụ, các phân tử liên kết kháng nguyên mà liên kết với các kháng nguyên được liên kết với màng (các kháng nguyên màng) như các protein màng. Các phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên khác bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với các kháng nguyên hòa tan như các protein tan.

Phương pháp tăng cường sự liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên và FcRn bên trong tế bào còn được thể hiện dưới dạng phương pháp thúc đẩy sự liên kết với FcRn của phân tử liên kết kháng nguyên bên trong tế bào, ví dụ, bên trong thể nhân.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào, bằng cách làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên này ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính. Theo sáng chế, "giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào" không nhất thiết phải có nghĩa là mọi phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, đều được giải phóng ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào. Có thể chấp nhận rằng tỷ lệ của phân tử liên kết kháng nguyên được giải phóng ra khỏi tế bào tăng lên so với trước khi làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính. Tốt hơn nếu phân tử liên kết kháng nguyên được giải phóng ra khỏi tế bào vẫn giữ được khả năng liên kết kháng nguyên. Hơn nữa, phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào, cũng có thể được gọi là phương pháp tạo ra cho phân tử liên kết kháng nguyên một đặc tính mà phân tử liên kết kháng nguyên trở nên được giải phóng dễ dàng ra khỏi tế bào ở dạng không chứa kháng nguyên khi phân tử liên kết kháng nguyên này được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng khả năng các phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ các kháng nguyên trong huyết tương bằng cách làm suy giảm

khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính. Theo sáng chế, “khả năng loại bỏ các kháng nguyên trong huyết tương” dùng để chỉ khả năng loại bỏ ra khỏi huyết tương các kháng nguyên có mặt trong huyết tương, khi các phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng *in vivo* hoặc được tiết ra *in vivo*. Do đó, theo sáng chế, “làm tăng khả năng các phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ các kháng nguyên trong huyết tương” có nghĩa là tốc độ loại bỏ các kháng nguyên ra khỏi huyết tương khi các phân tử liên kết kháng nguyên được sử dụng *in vivo* được gia tăng so với tốc độ trước khi làm giảm khả năng liên kết kháng nguyên của các phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính. Khả năng các phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ các kháng nguyên trong huyết tương có được tăng lên hay không có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng các kháng nguyên hòa tan và các phân tử liên kết kháng nguyên *in vivo*, và tiếp theo đo nồng độ các kháng nguyên hòa tan trong huyết tương. Khi nồng độ của các kháng nguyên hòa tan trong huyết tương sau khi sử dụng các kháng nguyên hòa tan và các phân tử liên kết kháng nguyên được làm giảm bằng cách làm giảm khả năng liên kết kháng nguyên của các phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính, có thể xác định được rằng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên để loại bỏ các kháng nguyên trong huyết tương được tăng lên.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải thiện động học của phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào phân tử này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào phân tử này.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên có thể được liên kết bởi phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách thay thế histidin hoặc axit

amin không có trong tự nhiên bằng ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào phân tử này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phân ly kháng nguyên trong tế bào ra khỏi phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết ngoại bào bằng cách thay thế ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào phân tử này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên mà được liên kết với kháng nguyên và được hấp thụ vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào bằng cách thay thế ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào phân tử này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên để loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng cách thay thế ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào phân tử này.

Vị trí của đột biến histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên (thay thế, cài, v.v.) không bị giới hạn cụ thể. Histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên có thể được thay thế hoặc cài ở vị trí bất kỳ. Các vị trí thay thế hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên được ưu tiên bao gồm, ví dụ, các vị trí nằm trong vùng có ảnh hưởng đến khả năng liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên. Ví dụ, khi phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể, thì các vị trí này bao gồm vùng biến đổi kháng thể hoặc CDR. Số lượng của đột biến histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên không bị giới hạn cụ thể. Histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên có thể được thay thế hoặc cài ở một vị trí, hoặc ở hai hoặc nhiều vị trí. Ngoài ra, việc làm khuyết, thêm, cài và/hoặc thay thế các axit amin khác có thể được đưa vào đồng thời với việc thay thế hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên.

Theo sáng chế, khi phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể, các vị trí thay thế histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên có thể có bao gồm, ví dụ, các vị trí nằm trong trình tự CDR hoặc trình tự đảm nhiệm cấu trúc CDR của kháng thể. Các vị trí

này bao gồm, ví dụ, các vị trí được nêu dưới đây. Các vị trí axit amin được đánh số dựa trên cách đánh số Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Chuỗi nặng: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b và H102

Chuỗi nhẹ: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 và L94

Trong số các vị trí trên đây, H32, H61, L53, L90 và L94 có thể là các vị trí cải biến phổ biến.

Khi kháng nguyên là thụ thể IL-6 (ví dụ, thụ thể IL-6 của người), các vị trí cải biến được ưu tiên bao gồm các vị trí sau đây. Tuy nhiên, các vị trí cải biến bị được giới hạn cụ thể ở các vị trí này.

Chuỗi nặng: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b và H102

Chuỗi nhẹ: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 và L94

Khi histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên được thay thế ở nhiều vị trí, các tổ hợp vị trí thay thế được ưu tiên bao gồm, ví dụ, tổ hợp gồm H27, H31 và H35; tổ hợp gồm H27, H31, H32, H35, H58, H62 và H102; tổ hợp gồm L32 và L53; và tổ hợp gồm L28, L32 và L53. Ngoài ra, các tổ hợp vị trí thay thế được ưu tiên gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm tổ hợp gồm H27, H31, L32 và L53.

Khi kháng nguyên là IL-6 (ví dụ, IL-6 của người), các vị trí cải biến được ưu tiên bao gồm các vị trí sau đây. Tuy nhiên, các vị trí cải biến không được giới hạn cụ thể ở các vị trí này.

Chuỗi nặng: H32, H59, H61 và H99

Chuỗi nhẹ: L53, L54, L90 và L94

Khi kháng nguyên là thụ thể IL-31 (ví dụ, thụ thể IL-31 của người), các vị trí cải biến được ưu tiên bao gồm H33. Tuy nhiên, các vị trí cải biến không được giới hạn cụ thể ở vị trí này.

Liên quan đến các vị trí nêu trên, một vị trí duy nhất có thể được thay thế bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên. Theo cách khác, nhiều vị trí có thể được thay thế bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên.

Các phương pháp theo sáng chế có thể áp dụng cho phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ, không kể loại kháng nguyên đích.

Các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng có hoạt tính liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đang nói đến. Các phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các chất có miền liên kết kháng nguyên của kháng thể. Miền liên kết kháng nguyên của kháng thể bao gồm, ví dụ, CDR và vùng biến đổi. Khi miền liên kết kháng nguyên của kháng thể là CDR, phân tử liên kết kháng nguyên có thể bao gồm cả 6 CDR của kháng thể nguyên vẹn, hoặc một, hai hoặc nhiều CDR trong số các CDR này. Theo cách khác, khi phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm CDR dưới dạng miền liên kết của kháng thể, CDR này có thể bao gồm làm khuyết, thay thế, thêm và/hoặc cài axit amin, hoặc có thể là CDR một phần.

Hơn nữa, khi phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng ổn định kháng thể, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện dược động học của phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách cải biến (ví dụ, thay thế, khuyết, thêm và/hoặc cài axit amin) vùng ổn định của kháng thể trong phân tử liên kết kháng nguyên này.

Ngoài ra, khi phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng ổn định kháng thể, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng số lần liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên bằng sự cải biến (ví dụ, thay thế, khuyết, thêm và/hoặc cài axit amin) vùng ổn định của kháng thể trong phân tử liên kết kháng nguyên này.

Hơn nữa, khi phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng ổn định kháng thể, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng số lượng kháng nguyên mà có thể được liên kết bằng phân tử liên kết kháng nguyên bằng sự cải biến (ví dụ, thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài axit amin) vùng ổn định kháng thể trong phân tử liên kết kháng nguyên này.

Hơn nữa, khi phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng ổn định kháng thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân ly kháng nguyên trong tế bào ra khỏi phân tử liên

kết kháng nguyên mà được liên kết ngoại bào bằng sự cải biến (ví dụ, thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài axit amin) vùng ổn định kháng thể trong phân tử liên kết kháng nguyên này.

Hơn nữa, khi phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng ổn định kháng thể, sáng chế đề cập đến phương pháp giải phóng phân tử liên kết kháng nguyên mà được liên kết với kháng nguyên và được nội hóa vào tế bào, ở dạng không chứa kháng nguyên ra khỏi tế bào, bằng sự cải biến (ví dụ, thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài axit amin) vùng ổn định kháng thể trong phân tử liên kết kháng nguyên này.

Hơn nữa, khi phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm vùng ổn định kháng thể, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng khả năng phân tử liên kết kháng nguyên loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương bằng sự cải biến (ví dụ, thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài axit amin) vùng ổn định kháng thể trong phân tử liên kết kháng nguyên này.

Theo phương án được ưu tiên, chất liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các chất liên kết kháng nguyên bao gồm vùng liên kết với FcRn. Sau khi được hấp thụ vào tế bào, các chất liên kết kháng nguyên bao gồm vùng liên kết với FcRn có thể quay trở lại huyết tương bằng con đường thu hồi FcRn. Tốt hơn nếu vùng liên kết với FcRn là miền liên kết trực tiếp với FcRn. Vùng liên kết với FcRn được ưu tiên gồm, ví dụ, các vùng Fc của kháng thể. Tuy nhiên, vùng liên kết với FcRn theo sáng chế có thể là vùng mà có thể liên kết với polypeptit có khả năng liên kết với FcRn như albumin hoặc IgG, do vùng này có thể liên kết với polypeptit có khả năng liên kết với FcRn có thể liên kết gián tiếp với FcRn thông qua albumin, IgG, v.v..

Các kháng nguyên được nhận diện bởi các phân tử liên kết kháng nguyên như các kháng thể đang nói đến trong các phương pháp theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể. Các kháng thể đang nói đến này có thể nhận diện kháng nguyên bất kỳ. Các kháng thể có được động học cần được cải thiện bằng các phương pháp theo sáng chế gồm, ví dụ, các kháng thể nhận diện các kháng nguyên màng như các protein thụ thể (các thụ thể liên kết màng và các thụ thể hòa tan) và các chất chỉ thị bề mặt tế bào và các kháng thể nhận diện các kháng nguyên hòa tan như các xytokin. Các ví dụ được ưu tiên về kháng nguyên màng theo sáng chế bao gồm các protein màng. Các ví dụ về kháng nguyên hòa

tan theo sáng chế bao gồm protein hòa tan. Các kháng nguyên được nhận diện bởi các kháng thể có được động học cần được cải thiện bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm, ví dụ, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, thụ thể IL-2, thụ thể IL-6, thụ thể OSM, gp130, thụ thể IL-5, CD40, CD4, Fas, osteopontin, CRTH2, CD26, PDGF-D, CD20, yếu tố hóa hướng động bạch cầu đơn nhân, CD23, TNF- α , HMGB-1, α 4 integrin, ICAM-1, CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BLYS, HLA-DR, TGF- β , CD52, và thụ thể IL-31. Các kháng nguyên được ưu tiên đặc biệt bao gồm thụ thể IL-6.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên đang nói đến trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính đối kháng (các phân tử liên kết kháng nguyên đối kháng) và các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính chủ vận (các phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận). Theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên đối kháng, cụ thể là các phân tử liên kết kháng nguyên đối kháng nhận diện các kháng nguyên màng như thụ thể, hoặc các kháng nguyên hòa tan như xytokin. Ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên đối kháng mà nhận diện thụ thể ức chế sự liên kết phối tử - thụ thể bằng cách liên kết với thụ thể này, và do đó ức chế sự truyền tín hiệu được trung gian thông qua thụ thể này.

Theo sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên đang nói đến không bị giới hạn cụ thể, và có thể là phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ. Tốt hơn nếu phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm cả hoạt tính liên kết kháng nguyên (vùng liên kết kháng nguyên) và vùng liên kết với FcRn. Cụ thể, phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên theo sáng chế bao gồm vùng liên kết với FcRn ở người. Phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm cả hoạt tính liên kết kháng nguyên và vùng liên kết với FcRn bao gồm, ví dụ, các kháng thể. Các kháng thể được ưu tiên trong trường hợp của sáng chế bao gồm, ví dụ, các kháng thể IgG. Khi kháng thể được sử dụng là kháng thể IgG, typ IgG này không được giới hạn; IgG này thuộc isotyp (lớp phụ) bất kỳ như IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 có thể được sử dụng. Hơn nữa, các đột biến axit amin (như M73) có thể được đưa vào vùng ổn định của isotyp bất kỳ trong số các isotyp IgG này. Các đột biến axit

amin được đưa vào bao gồm, ví dụ, các đột biến làm tăng cường hoặc làm suy giảm sự liên kết với thụ thể Fcγ (Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10) và các đột biến làm tăng cường hoặc làm suy giảm sự liên kết với FcRn (J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604), nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này. Theo cách khác, cũng có thể làm biến đổi sự liên kết phụ thuộc vào độ pH bằng cách lựa chọn vùng ổn định thích hợp như vùng ổn định của IgG2.

Khi phân tử liên kết kháng nguyên đang nói đến theo sáng chế là kháng thể, thì nó có thể là kháng thể có nguồn gốc từ động vật, như kháng thể chuột nhắt, kháng thể người, kháng thể chuột thường, kháng thể thỏ, kháng thể dê hoặc kháng thể lạc đà. Hơn nữa, kháng thể này có thể là kháng thể được cải biến, ví dụ, kháng thể khảm, và cụ thể là kháng thể được cải biến bao gồm đột biến thay thế axit amin trong trình tự của kháng thể được làm giống như của người, v.v.. Các kháng thể này cũng bao gồm kháng thể đặc hiệu kép, các sản phẩm cải biến của kháng thể được liên kết với các phân tử khác nhau, và các polypeptit bao gồm các mảnh kháng thể.

“Kháng thể khảm” là các kháng thể được tạo ra bằng cách kết hợp các trình tự thu được từ các động vật khác nhau. Cụ thể, kháng thể khảm bao gồm, ví dụ, kháng thể có các vùng biến đổi (V) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ kháng thể chuột nhắt và các vùng ổn định (C) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ kháng thể người.

“Kháng thể được làm giống như của người”, còn được gọi là kháng thể người được tạo lại hình dạng, là kháng thể trong đó các vùng quyết định bổ thể (complementarity determining region (CDR)) của kháng thể thu được từ động vật có vú không phải người, ví dụ, chuột nhắt, được ghép vào các CDR của kháng thể người. Các phương pháp nhận biết các CDR đã được biết (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia *et al.*, Nature (1989) 342:877). Các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền nói chung thích hợp cho mục đích này cũng đã được biết (xem đơn xin cấp patent châu Âu số EP 125023; và WO 96/02576).

Kháng thể đặc hiệu kép dùng để chỉ kháng thể có, trong cùng phân tử kháng thể, các vùng biến đổi nhận diện các epitop khác nhau. Kháng thể đặc hiệu kép có thể là

kháng thể nhận diện hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau, hoặc kháng thể nhận diện hai hoặc nhiều epitop khác nhau trên cùng kháng nguyên.

Hơn nữa, các polypeptit bao gồm các mảnh kháng thể bao gồm, ví dụ, các mảnh Fab, các mảnh F(ab')₂, scFv (Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126-36), các kháng thể miền (dAb) (WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv-Fc (WO 2005/037989), dAb-Fc, và các protein dung hợp với Fc. Trong đó, các phân tử chứa miền Fc có hoạt tính liên kết với FcRn, và do đó thích hợp để sử dụng trong các phương pháp được phát hiện theo sáng chế.

Ngoài ra, phân tử liên kết kháng nguyên khả thi theo sáng chế có thể là phân tử giống kháng thể. Phân tử giống kháng thể là phân tử có thể biểu hiện các chức năng bằng cách liên kết với phân tử đích (Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:653-658; Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:1-10; Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:463-469; Protein Science 2006, 15:14-27), và bao gồm, ví dụ, DARPs (WO 2002/020565), Affibody (WO 1995/001937), Avimer (WO 2004/044011; WO 2005/040229), và Adnectin (WO 2002/032925). Nếu các phân tử giống kháng thể này có thể liên kết với các phân tử đích theo cách phụ thuộc vào độ pH, thì một phân tử đơn có thể liên kết với nhiều phân tử đích.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên có thể là protein thụ thể hoặc thụ thể-protein dung hợp với Fc liên kết với đích, bao gồm, ví dụ, TNFR- protein dung hợp với Fc, IL1R- protein dung hợp với Fc, VEGFR- protein dung hợp với Fc, và CTLA4-protein dung hợp với Fc (Nat Med. 2003 Jan;9(1):47-52; BioDrugs. 2006;20(3):151-60). Nếu protein thụ thể và thụ thể-protein dung hợp với Fc này có thể liên kết với các phân tử đích theo cách phụ thuộc vào độ pH, thì phân tử đơn có thể liên kết với nhiều phân tử đích.

Ngoài ra, phân tử liên kết với kháng nguyên có thể là protein phối tử nhân tạo hoặc protein dung hợp phối tử nhân tạo mà liên kết với đích và có tác dụng trung hòa, và bao gồm, ví dụ, IL-6 đột biến (EMBO J. 1994 Dec 15;13(24):5863-70). Nếu các protein phối tử nhân tạo và protein dung hợp phối tử nhân tạo này có thể liên kết với các phân tử

đích theo cách phụ thuộc vào độ pH, thì phân tử đơn có thể liên kết với nhiều phân tử đích.

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm các chuỗi đường được cải biến. Kháng thể có các chuỗi đường được cải biến bao gồm, ví dụ, kháng thể có sự glycosyl hóa được cải biến (WO 99/54342), kháng thể khuyết fucose mà được bổ sung vào chuỗi đường (WO 00/61739; WO 02/31140; WO 2006/067847; WO 2006/067913), và kháng thể có các chuỗi đường với GlcNAc chia đôi (WO 02/79255).

Mặc dù các phương pháp theo sáng chế không bị giới hạn ở lý thuyết cụ thể bất kỳ,, nhưng mối liên hệ giữa việc làm suy giảm khả năng liên kết kháng nguyên ở độ pH axit so với khả năng ở độ pH trung tính, việc cải thiện được động học và việc liên kết nhiều lần với kháng nguyên có thể được giải thích như sau.

Ví dụ, khi kháng thể là kháng thể liên kết với kháng nguyên màng, kháng thể này được sử dụng trong cơ thể sẽ liên kết với kháng nguyên và tiếp theo được hấp thụ thông qua sự nội hóa vào thể nhân trong các tế bào cùng với kháng nguyên này và trong khi kháng thể vẫn được liên kết với kháng nguyên này. Tiếp theo, kháng thể di chuyển vào lysosom trong khi vẫn được liên kết với kháng nguyên, và kháng thể được phân hủy bởi lysosom cùng với kháng nguyên. Việc loại bỏ thông qua việc nội hóa ra khỏi huyết tương được gọi là loại bỏ phụ thuộc vào kháng nguyên, và việc loại bỏ này đã được báo cáo với nhiều phân tử kháng thể (Drug Discov Today. 2006 Jan;11(1-2):81-8). Khi một phân tử của kháng thể IgG liên kết với các kháng nguyên bằng hóa trị hai, thì phân tử kháng thể đơn này được nội hóa trong khi kháng thể vẫn được liên kết với hai phân tử kháng nguyên, và được phân hủy trong lysosom. Do đó, trong trường hợp các kháng thể thông thường, một phân tử của kháng thể IgG không thể liên kết với 3 phân tử kháng nguyên hoặc nhiều hơn. Ví dụ, phân tử kháng thể IgG đơn có hoạt tính trung hòa không thể trung hòa 3 phân tử kháng thể hoặc nhiều hơn.

Thời gian lưu được kéo dài tương đối (loại bỏ từ từ) của phân tử IgG trong huyết tương là do chức năng của FcRn mà được biết là thụ thể thu hồi của các phân tử IgG. Khi được hấp thụ vào thể nhân thông qua sự ẩm bào, các phân tử IgG sẽ liên kết với FcRn được biểu hiện trong thể nhân trong điều kiện axit của thể nhân. Khi các phân tử IgG

không liên kết với FcRn chuyển tới lysosom tại đó chúng được phân hủy, các phân tử IgG được liên kết với FcRn sẽ chuyển tới bề mặt tế bào và quay trở lại trong huyết tương bằng cách phân ly ra khỏi FcRn trong điều kiện trung tính của huyết tương.

Theo cách khác, khi kháng nguyên là kháng nguyên liên kết với kháng nguyên hòa tan, kháng thể được sử dụng trong cơ thể sẽ liên kết với kháng nguyên này và sau đó được hấp thụ vào tế bào trong khi kháng thể vẫn được liên kết với kháng nguyên. Nhiều kháng thể được hấp thụ vào tế bào được giải phóng ra khỏi tế bào thông qua FcRn. Tuy nhiên, do kháng thể được giải phóng ra khỏi tế bào, với các kháng thể vẫn được liên kết với kháng nguyên, thì kháng thể không thể liên kết lại với kháng nguyên. Do đó, giống như kháng thể liên kết với kháng nguyên màng, trong trường hợp của kháng thể thông thường, một phân tử kháng thể IgG không thể liên kết với 3 phân tử kháng nguyên hoặc nhiều hơn.

Các tác giả sáng chế đưa ra lý do rằng khi kháng thể được liên kết với kháng nguyên như kháng nguyên màng được hấp thụ vào thể nhân bằng sự nội hóa, trong khi kháng thể vẫn được liên kết với kháng nguyên chuyển tới lysosom và được phân hủy, kháng thể IgG mà kháng nguyên của nó được phân ly trong thể nhân có thể liên kết với FcRn được biểu hiện trong thể nhân. Cụ thể, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng kháng thể mà liên kết mạnh với kháng nguyên trong huyết tương nhưng liên kết yếu với kháng nguyên trong thể nhân có thể liên kết với kháng nguyên trong huyết tương và được hấp thụ trong khi vẫn tạo phức với kháng nguyên trong thể nhân trong tế bào thông qua sự nội hóa; phân ly từ kháng nguyên trong thể nhân; sau đó liên kết với FcRn và chuyển tới bề mặt tế bào; và quay trở lại huyết tương ở trạng thái không được liên kết với kháng nguyên để trung hòa nhiều kháng nguyên được liên kết với màng. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng kháng thể có đặc tính liên kết kháng nguyên mạnh trong huyết tương nhưng liên kết yếu với kháng nguyên trong thể nhân có thể phân ly ra khỏi kháng nguyên trong thể nhân ngay cả khi kháng thể đã được liên kết với các kháng nguyên như các kháng nguyên hòa tan; do đó, chúng được giải phóng lại vào huyết tương ở trạng thái không được liên kết với kháng nguyên và có thể trung hòa nhiều kháng nguyên hòa tan.

Cụ thể, các tác giả sáng chế đã lưu ý rằng độ pH trong huyết tương là khác với độ pH trong thể nhân, và do đó phát hiện ra rằng các kháng thể liên kết mạnh với kháng nguyên trong điều kiện độ pH huyết tương nhưng liên kết yếu với kháng nguyên trong điều kiện độ pH thể nhân cao hơn khi lưu trong huyết tương, do một phân tử kháng thể có thể liên kết với nhiều kháng nguyên.

Thể nhân, là túi màng, tạo thành mạng lưới trong tế bào chất của tế bào có nhân điển hình và chịu trách nhiệm chuyển hóa các đại phân tử trong quá trình từ màng tế bào đến lysosom. Độ pH trong thể nhân đã được báo cáo thường là độ pH axit nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 (Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Feb;5(2):121-32). Trong khi đó, độ pH trong huyết tương được biết hầu như là trung tính (bình thường, độ pH=7,4).

Do đó, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH axit yếu hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH trung tính sẽ liên kết với kháng nguyên trong huyết tương có độ pH trung tính, được hấp thụ vào tế bào, và sau đó phân ly ra khỏi kháng nguyên trong thể nhân có độ pH axit. Phân tử liên kết kháng nguyên mà được phân ly ra khỏi kháng nguyên sẽ liên kết với FcRn, chuyển tới bề mặt tế bào, và quay trở lại huyết tương ở trạng thái không được liên kết với kháng nguyên. Kết quả là, phân tử liên kết kháng nguyên có thể liên kết với các kháng nguyên nhiều lần, và được động học được cải thiện.

Các chất phân tử liên kết kháng nguyên

Sáng chế còn đề xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0, tốt hơn là phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 6,0 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0. Cụ thể, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 bao gồm, ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4. Phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ

pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4 cũng có thể được biểu hiện dưới dạng phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 cao hơn so với hoạt tính ở độ pH=5,8.

Đối với các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4, miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 là thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4, thì không có giới hạn nào đối với sự khác biệt về hoạt tính liên kết, và hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 chỉ cần thấp hơn, thậm chí là không đáng kể.

Theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4 bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 cao gấp hai lần hoặc lớn hơn so với hoạt tính ở độ pH=5,8. Theo phương án được ưu tiên hơn, phân tử liên kết kháng nguyên này bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 cao gấp 10 lần hoặc lớn hơn so với hoạt tính ở độ pH=5,8. Theo phương án được ưu tiên hơn, phân tử liên kết kháng nguyên này bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 cao gấp 40 lần hoặc lớn hơn so với hoạt tính ở độ pH=5,8.

Cụ thể, theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4, trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, là tỷ lệ của KD đối với kháng nguyên ở độ pH=5,8 và KD đối với kháng nguyên ở độ pH=7,4, tốt hơn là bằng 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là bằng 10 hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là bằng 40 hoặc lớn hơn. Giới hạn trên của trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ không bị giới hạn cụ thể, và có thể là trị số bất kỳ, ví dụ, 400, 1000 hoặc 10000, miễn là có thể sản xuất được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo phương án được ưu tiên khác, phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4, có trị số $k_d(pH=5,8)/k_d(pH=7,4)$, là tỷ lệ giữa k_d đối với kháng nguyên ở độ pH=5,8 và k_d đối với kháng nguyên ở độ pH=7,4, tốt hơn là bằng 2 hoặc lớn hơn, tốt hơn là bằng 5

hoặc lớn hơn, thậm trí tốt hơn là bằng 10 hoặc lớn hơn, và tốt hơn nữa là bằng 30 hoặc lớn hơn. Giới hạn trên của trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ không bị giới hạn cụ thể, và có thể là trị số bất kỳ, ví dụ, 50, 100 hoặc 200, miễn là có thể sản xuất được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Các điều kiện không phải độ pH mà hoạt tính liên kết kháng nguyên được đo có thể được lựa chọn thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và các điều kiện này không bị giới hạn cụ thể; tuy nhiên, các phép đo này có thể được thực hiện, ví dụ, trong các điều kiện dung dịch đệm MES và nhiệt độ $37^{\circ}C$, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn nữa, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) hoặc phương pháp tương tự, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Giả thiết rằng phân tử liên kết kháng nguyên này, liên kết yếu với kháng nguyên ở độ pH axit, dễ dàng phân ly ra khỏi kháng nguyên trong điều kiện axit của thể nhân, và sau khi nội hóa vào tế bào, nó liên kết với FcRn và dễ dàng được giải phóng ra khỏi tế bào. Phân tử liên kết kháng nguyên được giải phóng ra khỏi tế bào mà không bị phân hủy bên trong tế bào có thể liên kết lại với các kháng nguyên khác. Do đó, ví dụ, khi phân tử liên kết kháng nguyên là phân tử trung hòa liên kết với kháng nguyên, thì phân tử liên kết kháng nguyên mà dễ dàng phân ly ra khỏi kháng nguyên trong điều kiện axit của thể nhân có thể liên kết và trung hòa các kháng nguyên nhiều lần. Kết quả là, các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 sẽ có thời gian lưu trong huyết tương tốt hơn.

Theo phương án được ưu tiên, phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ $pH=5,8$ thấp hơn so với hoạt tính ở độ $pH=7,4$ bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên trong đó ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên này được thay thế bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc trong đó ít nhất một histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên được cài vào. Vị trí

mà đột biến histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên được đưa vào không được giới hạn cụ thể và có thể là vị trí bất kỳ, miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 là yếu hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4 (trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ lớn hơn hoặc trị số $k_d(pH=5,8)/k_d(pH=7,4)$ lớn hơn) so với trước khi thay thế. Ví dụ về các vùng biến đổi và các CDR của kháng thể trong trường hợp phân tử liên kết kháng nguyên này là kháng thể. Số lượng axit amin được thay thế bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên và số lượng axit amin được cài vào có thể được xác định một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Một axit amin có thể được thay thế bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc một axit amin có thể được cài, hoặc hai hoặc nhiều axit amin có thể được thay thế bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, hoặc hai hoặc nhiều axit amin có thể được cài. Hơn nữa, ngoài việc thay thế histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên hoặc việc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, việc làm khuyết, thêm, cài và/hoặc thay thế các axit amin khác cũng có thể được thực hiện một cách đồng thời. Việc thay thế histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên hoặc việc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên có thể được thực hiện một cách ngẫu nhiên bằng cách sử dụng các phương pháp như quét histidin sử dụng histidin thay cho alanin trong phương pháp quét alanin đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các phân tử liên kết kháng nguyên có trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ hoặc $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ tăng lên so với trước khi đột biến có thể được chọn từ các phân tử liên kết kháng nguyên trong đó đột biến histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên đã được đưa vào một cách ngẫu nhiên.

Các phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên có đột biến histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên và có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 là thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4 bao gồm, ví dụ, các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 sau khi đột biến thành histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên là tương đương với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 trước khi đột biến thành histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên. Theo sáng chế, "phân tử liên kết kháng nguyên sau khi đột biến thành histidin hoặc axit amin

không có trong tự nhiên có hoạt tính liên kết kháng nguyên tương đương với hoạt tính liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên trước khi đột biến thành histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên" có nghĩa là, khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên trước khi đột biến thành histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên được coi là 100%, thì hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên sau khi đột biến thành histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên ít nhất là 10% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 50% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 80% hoặc lớn hơn, tốt hơn là 90% hoặc lớn hơn. Hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 sau khi đột biến thành histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên có thể lớn hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4 trước khi đột biến thành histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên. Khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên giảm đi do việc thay thế hoặc cài histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên, thì hoạt tính liên kết kháng nguyên này có thể điều chỉnh được bằng cách đưa đột biến thay thế, khuyết, thêm và/hoặc cài của một hoặc nhiều axit amin vào phân tử liên kết kháng nguyên để cho hoạt tính liên kết kháng nguyên trở nên tương đương với hoạt tính liên kết kháng nguyên trước khi thay thế hoặc cài histidin. Sáng chế cũng bao gồm các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết đã được tạo ra tương đương do việc thay thế, làm khuyết, thêm và/hoặc cài một hoặc nhiều axit amin sau khi thay thế hoặc cài histidin.

Ngoài ra, khi phân tử liên kết kháng nguyên là chất bao gồm vùng ổn định kháng thể, theo một phương án được ưu tiên khác về phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 là thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4, sáng chế bao gồm phương pháp cải biến các vùng ổn định của kháng thể chứa trong các phân tử liên kết kháng nguyên này. Các ví dụ cụ thể về các vùng ổn định của kháng thể sau khi cải biến bao gồm các vùng ổn định được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Khi hoạt tính liên kết kháng nguyên của chất liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 được làm suy giảm so với hoạt tính ở độ pH=7,4 (khi trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ tăng lên) bằng các phương pháp được mô tả ở trên và các phương pháp tương tự, nói

chung, tốt hơn nếu trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$ cao gấp hai lần hoặc lớn hơn, tốt hơn là 5 lần hoặc lớn hơn, thậm chí tốt hơn nữa là 10 lần hoặc lớn hơn, so với trị số của kháng thể ban đầu, nhưng không được giới hạn cụ thể ở đó.

Phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể còn có đặc tính bất kỳ khác, miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên của chúng ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0. Ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên có thể là phân tử liên kết kháng nguyên chủ vận hoặc đối kháng. Phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên theo sáng chế bao gồm, ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên đối kháng. Nói chung, phân tử liên kết kháng nguyên đối kháng ức chế sự truyền tín hiệu nội bào được trung gian bởi thụ thể bằng cách ức chế sự liên kết giữa phối tử (chất chủ vận) và thụ thể.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất kháng thể trong đó axit amin ở ít nhất một vị trí được chỉ ra dưới đây được thay thế bằng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên. Các vị trí axit amin được chỉ ra dựa trên cách đánh số Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Chuỗi nặng: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b và H102

Chuỗi nhẹ: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 và L94

Trong số các vị trí trên đây, H32, H61, L53, L90 và L94 có thể là các vị trí cải biến phổ biến.

Khi kháng nguyên là thụ thể IL-6 (ví dụ, thụ thể IL-6 của người), các vị trí cải biến được ưu tiên bao gồm các vị trí sau đây. Tuy nhiên, các vị trí cải biến không được giới hạn cụ thể ở các vị trí này.

Chuỗi nặng: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b và H102

Chuỗi nhẹ: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 và L94

Khi histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên được thay thế ở nhiều vị trí, các tổ hợp vị trí thay thế được ưu tiên bao gồm, ví dụ, tổ hợp gồm H27, H31 và H35; tổ hợp gồm H27, H31, H32, H35, H58, H62 và H102; tổ hợp gồm L32 và L53; và tổ hợp

gồm L28, L32 và L53. Ngoài ra, các tổ hợp vị trí thay thế được ưu tiên gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm tổ hợp gồm H27, H31, L32 và L53.

Khi kháng nguyên là IL-6 (ví dụ, IL-6 của người), các vị trí cải biến được ưu tiên bao gồm các vị trí sau đây. Tuy nhiên, các vị trí cải biến không được giới hạn cụ thể ở các vị trí này.

Chuỗi nặng: H32, H59, H61 và H99

Chuỗi nhẹ: L53, L54, L90 và L94

Khi kháng nguyên là thụ thể IL-31 (ví dụ, thụ thể IL-31 của người), các vị trí cải biến được ưu tiên bao gồm H33. Tuy nhiên, các vị trí cải biến không được giới hạn cụ thể ở vị trí này.

Các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể nhận diện kháng nguyên bất kỳ. Các kháng nguyên được nhận diện bởi các kháng thể theo sáng chế cụ thể bao gồm các protein thụ thể được đề cập ở trên (các thụ thể liên kết màng hoặc các thụ thể hòa tan), các kháng nguyên màng như chất chỉ thị bề mặt màng, và các kháng nguyên hòa tan như các xytokin, ví dụ, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, thụ thể IL-2, thụ thể IL-6, thụ thể OSM, gp130, thụ thể IL-5, CD40, CD4, Fas, osteopontin, CRTH2, CD26, PDGF-D, CD20, yếu tố hóa hướng động bạch cầu đơn nhân, CD23, TNF- α , HMGB-1, α 4 integrin, ICAM-1, CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BlyS, HLA-DR, TGF- β , CD52 và thụ thể IL-31.

Các kháng nguyên được ưu tiên đặc biệt là thụ thể IL-6.

Các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế được mô tả ở trên.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm kháng thể. Các kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên và có vùng liên kết với FcRn bao gồm, ví dụ, kháng thể IgG. Khi kháng thể này được sử dụng là kháng thể IgG, thì không có hạn chế về typ của nó. Có thể sử dụng IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 và typ tương tự.

Nguồn gốc của kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn cụ thể, và có thể có nguồn gốc bất kỳ. Ví dụ, có thể sử dụng kháng thể chuột nhắt, kháng thể người, kháng thể chuột thường, kháng thể thỏ, kháng thể dê, kháng thể lạc đà, các kháng thể khác.

Hơn nữa, ví dụ, các kháng thể có thể là kháng thể khảm được mô tả ở trên, và cụ thể là, các kháng thể được cải biến có các đột biến thay thế trình tự axit amin, như kháng thể được làm giống như của người. Kháng thể cũng có thể là kháng thể đặc hiệu kép được mô tả ở trên, các sản phẩm cải biến của kháng thể đã được liên kết với các phân tử khác nhau, polypeptit chứa các mảnh kháng thể, và kháng thể có các chuỗi đường được cải biến.

Việc tạo ra kháng thể khảm đã được biết. Trong trường hợp kháng thể khảm người-chuột nhất, ví dụ, ADN mã hóa vùng V của kháng thể có thể được liên kết với ADN mã hóa vùng C của kháng thể người; ADN này có thể được cài vào vector biểu hiện và đưa vào vật chủ để sản xuất kháng thể khảm.

“Kháng thể được làm giống như của người” cũng được gọi là kháng thể người được tạo lại hình dạng, là các kháng thể trong đó vùng quyết định bỏ thể (complementarity determining region - CDR) của động vật có vú không phải người, ví dụ, chuột nhất, được ghép với CDR của kháng thể người. Các phương pháp nhận biết CDR đã được biết (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia *et al.*, Nature (1989) 342:877). Các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền chung thích hợp cho mục đích này cũng đã được biết (xem đơn xin cấp patent Châu Âu số EP 125023; và WO 96/02576). Kháng thể được làm giống như của người có thể sản xuất được bằng các phương pháp đã biết, ví dụ, CDR của kháng thể chuột nhất có thể được xác định, và ADN mã hóa kháng thể trong đó CDR này được liên kết với vùng cấu trúc (framework region - FR) của kháng thể người được thu. Tiếp theo, kháng thể được làm giống như của người có thể sản xuất được bằng cách sử dụng hệ thống có sử dụng vector biểu hiện thông thường. Các ADN này có thể được tổng hợp bằng PCR, bằng cách sử dụng các đoạn mồi, một vài oligonucleotit được tạo ra có các phần mà chồng lấp với các vùng cuối cùng của cả CDR và FR (xem phương pháp được mô tả trong WO 98/13388). Các FR của kháng thể người được liên kết thông qua các CDR được lựa chọn sao cho các CDR này tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên thích hợp. Nếu cần, các axit amin trong các FR của vùng biến đổi của kháng thể có thể được thay thế để cho các CDR của kháng thể người được tạo lại hình dạng có thể tạo

thành vị trí liên kết kháng nguyên thích hợp (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53:10.01-6). Các gốc axit amin trong các FR có thể được cải biến bao gồm các phần liên kết trực tiếp với kháng nguyên thông qua các liên kết không cộng hóa trị (Amit *et al.*, Science (1986) 233: 747-53), các phần có ảnh hưởng hoặc có tác động đến cấu trúc CDR (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17), và các phần có liên quan đến các tương tác VH-VL (EP 239400).

Khi kháng thể theo sáng chế là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người, các vùng C của các kháng thể này tốt hơn là thu được từ kháng thể người. Ví dụ, C γ 1, C γ 2, C γ 3 và C γ 4 có thể được sử dụng cho chuỗi H, trong khi C κ và C λ có thể được sử dụng cho chuỗi L. Hơn nữa, nếu cần, các đột biến axit amin có thể được đưa vào vùng C của kháng thể người để tăng cường hoặc làm giảm khả năng liên kết với thụ thể Fc γ hoặc FcRn hoặc để cải thiện độ ổn định hoặc khả năng sản xuất của kháng thể. Kháng thể khảm theo sáng chế tốt hơn là bao gồm vùng biến đổi của kháng thể thu được từ động vật có vú không phải người và vùng ổn định thu được từ kháng thể người. Trong khi đó, kháng thể được làm giống như của người tốt hơn là bao gồm các CDR của kháng thể thu được từ động vật có vú không phải người và các FR và vùng C thu được từ kháng thể người. Các vùng ổn định thu được từ kháng thể người tốt hơn là bao gồm vùng liên kết với FcRn. Các kháng thể này bao gồm, ví dụ, các IgG (IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4). Các vùng ổn định được sử dụng cho kháng thể được làm giống như của người theo sáng chế có thể là các vùng ổn định của kháng thể thuộc isotyp bất kỳ. Tốt hơn nếu vùng ổn định của IgG người được sử dụng, mặc dù không chỉ được giới hạn ở đó. Các FR thu được từ kháng thể người, được sử dụng cho kháng thể được làm giống như của người, không được giới hạn cụ thể, và có thể thu được từ kháng thể thuộc isotyp bất kỳ.

Các vùng biến đổi và vùng ổn định của kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người theo sáng chế có thể cải biến được bằng cách làm khuyết, thay thế, cài và/hoặc thêm, v.v., miễn là tính đặc hiệu liên kết của kháng thể ban đầu được biểu hiện.

Do khả năng gây miễn dịch trong cơ thể người được làm giảm, nên kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người sử dụng các trình tự thu được từ

người được cho là hữu ích khi được sử dụng cho người nhằm mục đích điều trị hoặc mục đích tương tự.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ. Ví dụ, kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 ban đầu lớn hơn hoặc có thể so sánh được với hoạt tính ở độ pH=7,4 có thể được cải biến theo cách nhân tạo thông qua việc thay thế histidin được mô tả ở trên hoặc các cách tương tự để cho hoạt tính liên kết kháng nguyên của chúng ở độ pH=5,8 trở nên thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4. Theo cách khác, các kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 thấp hơn so với hoạt tính ở độ pH=7,4 có thể lựa chọn được bằng cách sàng lọc nhiều kháng thể thu được từ thư viện kháng thể hoặc các tế bào lai như được mô tả dưới đây.

Khi histidin được thay thế bằng các axit amin trong kháng thể, các trình tự đã biết có thể được sử dụng cho trình tự axit amin chuỗi H hoặc chuỗi L của kháng thể này trước khi đưa các đột biến histidin vào, hoặc các trình tự axit amin của các kháng thể mới thu được bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể được sử dụng. Ví dụ, các kháng thể có thể thu được từ thư viện kháng thể, hoặc chúng có thể thu được bằng cách tách dòng các gen mã hóa kháng thể từ các tế bào lai tạo ra kháng thể đơn dòng.

Liên quan đến thư viện kháng thể, nhiều thư viện kháng thể đã được biết, và các phương pháp tạo ra thư viện kháng thể cũng được biết; do đó, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể thu được một cách thích hợp các thư viện kháng thể. Ví dụ, liên quan đến thư viện thể thực khuẩn kháng thể, có thể tham khảo tài liệu chuyên ngành như Clackson *et al.*, Nature 1991, 352: 624-8; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97; Waterhouses *et al.*, Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6; Griffiths *et al.*, EMBO J. 1994, 13: 324.0-60; Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14; và Japanese Patent Kohyo Publication No. (JP-A) H20-504970 (công bố đơn Nhật chưa được xét nghiệm tương ứng với công bố đơn quốc tế không phải Nhật). Ngoài ra, có thể sử dụng các phương pháp đã biết, như các phương pháp sử dụng tế bào có nhân điển hình làm thư viện (WO 95/15393) và phương pháp biểu lộ ribosom. Hơn nữa, các kỹ thuật để thu kháng thể người bằng cách quét có sử dụng thư viện kháng thể người cũng

đã được biết. Ví dụ, các vùng biến đổi của kháng thể người có thể được biểu hiện trên bề mặt thể thực khuẩn dưới dạng kháng thể chuỗi đơn (single chain antibody - scFv) bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và các thể thực khuẩn liên kết với kháng nguyên có thể được lựa chọn. Việc phân tích di truyền các thể thực khuẩn đã lựa chọn có thể xác định trình tự ADN mã hóa các vùng biến đổi của kháng thể người liên kết với các kháng nguyên này. Ngay khi trình tự ADN của scFv liên kết với kháng nguyên này được biểu lộ, vector biểu hiện thích hợp có thể tạo ra dựa trên các trình tự này để thu được các kháng thể người. Các phương pháp này đã được biết rõ, và có thể tham khảo WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 và WO 95/15388.

Đối với các phương pháp thu gen mã hóa kháng thể từ các tế bào lai, các kỹ thuật đã biết về cơ bản có thể được sử dụng, bao gồm việc sử dụng các kháng nguyên hoặc tế bào mong muốn biểu hiện các kháng nguyên mong muốn dưới dạng các kháng nguyên gây miễn dịch, sử dụng các kháng nguyên này để gây miễn dịch theo các phương pháp gây miễn dịch thông thường, dung hợp các tế bào miễn dịch thu được với các tế bào gốc đã biết bằng các phương pháp dung hợp tế bào thông thường, sàng lọc các tế bào sản xuất kháng thể đơn dòng (các tế bào lai) bằng các phương pháp sàng lọc thông thường, tổng hợp ADN bổ trợ của các vùng biến đổi (các vùng V) của kháng thể từ ARN thông tin của các tế bào lai thu được bằng cách sử dụng enzym phiên mã ngược, và nối chúng với ADN mã hóa các vùng ổn định (các vùng C) của kháng thể mong muốn.

Cụ thể hơn, các kháng nguyên gây miễn dịch để thu các gen kháng thể được mô tả ở trên mã hóa các chuỗi H và chuỗi L bao gồm cả kháng nguyên đầy đủ có khả năng gây miễn dịch và kháng nguyên không đầy đủ bao gồm các hapten và các thành phần tương tự mà không có tính kháng nguyên; tuy nhiên, các kháng nguyên không bị giới hạn ở các ví dụ này. Ví dụ, có thể sử dụng các protein nguyên vẹn và các peptit một phần của các protein đang nói đến. Ngoài ra, được biết rằng các chất bao gồm polysaccharit, axit nucleic, lipid, và các chất tương tự có thể là kháng nguyên. Do đó, kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế không được giới hạn cụ thể. Kháng nguyên này có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật

này, ví dụ, bằng các phương pháp dựa trên baculovirut (ví dụ, WO 98/46777) và các phương pháp tương tự. Các tế bào lai có thể được sản xuất, ví dụ, bằng phương pháp của Milstein và các đồng tác giả (G. Kohler and C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46) và các phương pháp tương tự. Khi khả năng gây miễn dịch của kháng nguyên là thấp, thì việc gây miễn dịch có thể được thực hiện sau khi cho kháng nguyên liên kết với đại phân tử có khả năng gây miễn dịch, như albumin. Theo cách khác, nếu cần, kháng nguyên có thể được chuyển hóa thành kháng nguyên hòa tan bằng cách cho chúng liên kết với các phân tử khác. Khi các phân tử xuyên màng như kháng nguyên màng (ví dụ, thụ thể) được sử dụng làm kháng nguyên, thì các phần của các vùng ngoại bào của kháng nguyên màng này có thể được sử dụng dưới dạng mảnh, hoặc các tế bào biểu hiện các phân tử xuyên màng trên bề mặt tế bào của chúng có thể được sử dụng làm chất gây miễn dịch.

Tế bào sản xuất kháng thể có thể thu được bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng cách sử dụng các kháng nguyên gây miễn cảm thích hợp được mô tả ở trên. Theo cách khác, tế bào sản xuất kháng thể có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch *in vitro* các tế bào lympho có thể sản xuất kháng thể. Nhiều động vật có vú có thể được sử dụng để gây miễn dịch; các động vật được sử dụng phổ biến này bao gồm loài gặm nhấm, động vật gặm nhấm và động vật linh trưởng. Các loài động vật này bao gồm, ví dụ, loài gặm nhấm như chuột nhắt, chuột thường và chuột đồng; động vật gặm nhấm như thỏ; và động vật linh trưởng bao gồm khỉ như khỉ đầu chó, khỉ rhesus, khỉ mồm chó và tinh tinh. Ngoài ra, động vật chuyển gen mang nguồn gen kháng thể của người cũng được biết đến, và kháng thể người có thể thu được bằng cách sử dụng các động vật này (xem WO 96/34096; Mendez *et al.*, *Nat. Genet.* 1997, 15: 146-56). Ví dụ, thay vì sử dụng các động vật chuyển gen này, các kháng thể người mong muốn có hoạt tính liên kết đối với kháng nguyên có thể thu được bằng cách gây miễn cảm *in vitro* các tế bào lympho của người bằng các kháng nguyên mong muốn hoặc các tế bào biểu hiện các kháng nguyên mong muốn, và sau đó dung hợp các tế bào đã gây miễn cảm bằng các tế bào u tủy của người như U266 (xem công bố đơn xin cấp patent Nhật số (JP-B) H01-59878. Hơn nữa, các kháng thể người mong muốn có thể thu được bằng cách gây miễn dịch cho

các động vật chuyển gen mang nguồn gen kháng thể người đầy đủ, bằng các kháng nguyên mong muốn (xem WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096 và WO 96/33735).

Việc gây miễn dịch cho động vật có thể thực hiện được bằng cách pha loãng và tạo hỗn dịch một cách thích hợp cho kháng nguyên gây miễn cảm trong dung dịch nước muối đệm phosphat (phosphate buffered saline - PBS), nước muối sinh lý hoặc dung dịch tương tự, và trộn nó với chất phụ trợ để nhũ hóa, nếu cần. Tiếp theo, hỗn hợp này được tiêm vào động vật qua đường trong màng bụng hoặc qua đường dưới da. Tiếp theo, tốt hơn nếu kháng nguyên gây miễn cảm được trộn với chất phụ trợ không đầy đủ của Freund được sử dụng vài lần cứ mỗi khoảng thời gian từ 4 đến 21 ngày. Việc sản xuất kháng thể có thể xác nhận được bằng cách đo hiệu giá kháng thể đang nói đến trong huyết thanh của động vật bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.

Các tế bào sản xuất kháng thể thu được từ các tế bào lympho hoặc động vật được gây miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn có thể được dung hợp với các tế bào u tủy để tạo ra các tế bào lai bằng cách sử dụng các tác nhân dung hợp thông thường (ví dụ, polyetylen glycol) (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59-103). Nếu cần, các tế bào lai có thể được nuôi cấy và sinh trưởng, và tính đặc hiệu liên kết của kháng thể được sản xuất từ các tế bào lai này có thể đo được bằng cách sử dụng các phương pháp phân tích đã biết, như kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), và thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA). Sau đó, các tế bào lai sản xuất kháng thể đang nói đến có tính đặc hiệu, ái lực hoặc hoạt tính được xác định có thể được tạo dòng phụ bằng các phương pháp như pha loãng giới hạn.

Tiếp theo, gen mã hóa kháng thể đã lựa chọn có thể được tách dòng từ tế bào lai hoặc tế bào sản xuất kháng thể (tế bào lympho đã được gây miễn cảm, và tế bào tương tự) bằng cách sử dụng các đoạn dò có thể liên kết đặc hiệu với kháng thể này (ví dụ, các oligonucleotit hỗ trợ cho các trình tự mã hóa các vùng ổn định của kháng thể này). Cũng có thể tách dòng các gen từ ARN thông tin bằng cách sử dụng RT-PCR. Các globulin miễn dịch được phân thành 5 lớp khác nhau, IgA, IgD, IgE, IgG và IgM. Các lớp này

được chia tiếp thành các lớp phụ khác nhau (các isotyp) (ví dụ, IgG-1, IgG-2, IgG-3 và IgG-4; IgA-1 và IgA-2; v.v.). Các chuỗi H và L được sử dụng theo sáng chế để sản xuất kháng thể không được giới hạn cụ thể và có thể có nguồn gốc từ các kháng thể thuộc lớp hoặc lớp phụ bất kỳ trong số các lớp hoặc lớp phụ này; tuy nhiên, IgG được ưu tiên đặc biệt.

Ở đây, có thể cải biến các gen mã hóa chuỗi H và các gen mã hóa chuỗi L bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền. Các kháng thể được cải biến về mặt di truyền, như kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người mà được cải biến bằng con đường nhân tạo nhằm làm giảm tính gây miễn dịch khác loại, và đối với người, có thể sản xuất được một cách thích hợp đối với các kháng thể như kháng thể chuột nhắt, kháng thể chuột thường, kháng thể thỏ, kháng thể chuột đồng, kháng thể cừu và kháng thể lạc đà. Kháng thể khảm là kháng thể bao gồm các vùng biến đổi của chuỗi H và chuỗi L của kháng thể động vật có vú không phải người, như kháng thể chuột nhắt, và các vùng ổn định của chuỗi H và chuỗi L của kháng thể người. Kháng thể khảm có thể thu được bằng cách gắn ADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể chuột nhắt với ADN mã hóa vùng ổn định của kháng thể người, cài chúng vào vector biểu hiện và đưa vector này vào vật chủ để sản xuất kháng thể. Kháng thể được làm giống như của người, còn gọi là kháng thể người được tạo lại hình dạng, có thể tổng hợp được bằng PCR bằng cách sử dụng một vài oligonucleotit được sản xuất sao cho chúng có các phần chồng gen ở các đầu của các trình tự ADN được thiết kế để liên kết với các vùng quyết định bổ thể (complementarity determining region - CDR) của kháng thể của động vật có vú không phải người như chuột. ADN thu được có thể được gắn với ADN mã hóa vùng ổn định của kháng thể người. ADN đã gắn có thể được cài vào vector biểu hiện, và vector này có thể được đưa vào vật chủ để sản xuất kháng thể (xem EP 239400 và WO 96/02576). Các FR của kháng thể người được gắn với nhau thông qua CDR được chọn khi CDR này tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên thích hợp. Nếu cần, các axit amin trong vùng khung của vùng biến đổi của kháng thể có thể được thay thế sao cho CDR của kháng thể người đã tạo lại hình dạng tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên thích hợp (K. Sato *et al.*, Cancer Res. 1993, 53: 10.01-10.06).

Ngoài việc làm cho kháng thể giống như của người được mô tả ở trên, các kháng thể có thể được cải biến để cải thiện các đặc tính sinh học của chúng, ví dụ, việc liên kết với kháng nguyên. Theo sáng chế, các cải biến này có thể đạt được bằng các phương pháp như gây đột biến định hướng điểm (ví dụ, xem Kunkel (1910.0) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), gây đột biến PCR, và gây đột biến casset. Nói chung, các kháng thể đột biến có các đặc tính sinh học đã được cải thiện thể hiện độ tương đồng và/hoặc tương tự về trình tự axit amin là 70% hoặc cao hơn, tốt hơn là 80% hoặc cao hơn và thậm chí tốt hơn là 90% hoặc cao hơn (ví dụ, 95% hoặc cao hơn, 97%, 98% hoặc 99%) so với trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể ban đầu. Ở đây, độ tương đồng và/hoặc tương tự về trình tự được xác định là tỷ lệ của các gốc axit amin là tương đồng (cùng gốc) hoặc tương tự (các gốc axit amin được phân vào cùng nhóm dựa trên các đặc tính chung của các chuỗi bên axit amin) với các gốc kháng thể ban đầu, sau khi giá trị tương đồng về trình tự đã được tối đa hóa bằng sự sắp hàng trình tự và đưa vào khoảng trống, nếu cần. Nói chung, các gốc axit amin tự nhiên được phân thành các nhóm dựa trên các đặc tính chuỗi bên của chúng như sau:

- (1) kỵ nước: alanin, isoleuxin, valin, methionin và leuxin;
- (2) ưa nước trung tính: asparagin, glutamin, xystein, threonin và serin;
- (3) axit: axit aspartic và axit glutamic;
- (4) bazơ: arginin, histidin và lysin;
- (5) các gốc ảnh hưởng đến hướng của chuỗi: glyxin và prolin; và
- (6) thơm: tyrosin, tryptophan và phenylalanin.

Nói chung, tổng số 6 vùng quyết định tính bổ thể (CDR; vùng siêu biến) có mặt trên các vùng biến đổi của chuỗi H và chuỗi L tương tác với nhau để tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể. Riêng vùng biến đổi còn được biết đến là có khả năng nhận diện và liên kết với kháng nguyên, mặc dù ái lực của nó là thấp hơn so với ái lực trong vị trí liên kết nguyên vẹn. Do đó, các gen kháng thể mã hóa chuỗi H và chuỗi L theo sáng chế có thể mã hóa các mảnh mà mỗi mảnh bao gồm vị trí liên kết kháng nguyên của chuỗi H và chuỗi L, miễn là polypeptit được mã hóa bởi gen này vẫn giữ được hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn.

Như được mô tả ở trên, vùng biến đổi của chuỗi nặng thường được tạo cấu trúc bởi ba CDR và bốn FR. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các gốc axit amin cần “được cải biến” có thể được chọn một cách thích hợp từ các gốc axit amin, ví dụ, trong CDR hoặc FR. Nói chung, các cải biến các gốc axit amin trong CDR có thể làm giảm khả năng liên kết kháng nguyên. Do đó, các gốc axit amin thích hợp cần “được cải biến” theo sáng chế tốt hơn là được chọn từ các gốc axit amin trong FR, nhưng không bị giới hạn ở các gốc này. Có thể chọn các axit amin trong CDR miễn là việc cải biến này được xác nhận là không làm giảm khả năng liên kết. Theo cách khác, bằng cách sử dụng các cơ sở dữ liệu đã công bố hoặc dữ liệu tương tự, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể thu được các trình tự thích hợp có thể được sử dụng làm FR của vùng biến đổi của kháng thể của sinh vật như người hoặc chuột nhắt.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất gen mã hóa kháng thể theo sáng chế. Gen mã hóa kháng thể theo sáng chế có thể là gen bất kỳ, và có thể là ADN, ARN, chất tương tự axit nucleic, các chất tương tự.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ mang các gen được mô tả ở trên. Tế bào chủ này không được giới hạn cụ thể và bao gồm, ví dụ, *E. coli* và các tế bào động vật khác nhau. Tế bào chủ có thể được sử dụng, ví dụ, dưới dạng hệ thống sản xuất để sản xuất và biểu hiện các kháng thể theo sáng chế. Các hệ thống sản xuất *in vitro* và *in vivo* hiện sẵn có để dùng làm hệ thống sản xuất polypeptit. Các hệ sản xuất *in vitro* này bao gồm, ví dụ, các hệ sản xuất có sử dụng tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào không có nhân điển hình.

Tế bào có nhân điển hình có thể được sử dụng làm tế bào chủ bao gồm, ví dụ, tế bào động vật, tế bào thực vật và tế bào nấm. Tế bào động vật bao gồm: tế bào động vật có vú, ví dụ, CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 94.0), COS, HEK293, 3T3, u tùy, BHK (baby hamster kidney: thận chuột đồng con), HeLa và Vero; tế bào động vật lưỡng cư như tế bào trứng *Xenopus laevis* (Valle *et al.*, Nature (1981) 291: 338-340); và tế bào côn trùng như Sf9, Sf21 và Tn5. Tốt hơn nếu các tế bào CHO-DG44, CHO-DX11B, COS7, HEK293 và BHK được sử dụng để biểu hiện kháng thể theo sáng chế. Trong số các tế bào động vật, tế bào CHO được ưu tiên đặc biệt để biểu hiện trên quy mô lớn.

Vecto có thể được đưa vào tế bào chủ, ví dụ, bằng phương pháp canxi phosphat, phương pháp DEAE-dextran, phương pháp sử dụng DOTAP liposom cation (Boehringer-Mannheim), kỹ thuật xung điện và phương pháp biến nạp lipit.

Đối với tế bào thực vật, ví dụ, tế bào thu được từ *Nicotiana tabacum* và bèo tấm (*Lemna minor*) được biết là hệ thống sản xuất protein. Mô sẹo có thể được nuôi cấy từ các tế bào này để sản xuất kháng thể theo sáng chế. Đối với tế bào nấm, các hệ thống biểu hiện protein đã biết là các hệ thống sử dụng tế bào nấm men, ví dụ, tế bào thuộc giống *Saccharomyces* (như *Saccharomyces cerevisiae* và *Saccharomyces pombe*); và tế bào của nấm sợi, ví dụ, giống *Aspergillus* (như *Aspergillus niger*). Các tế bào này có thể được sử dụng làm tế bào chủ để sản xuất kháng thể theo sáng chế.

Tế bào vi khuẩn có thể được sử dụng trong hệ thống sản xuất không có nhân điển hình. Đối với tế bào vi khuẩn, hệ thống sản xuất sử dụng *Bacillus subtilis* đã được biết ngoài các hệ thống sản xuất sử dụng *E. coli* được mô tả ở trên. Các hệ thống này có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể theo sáng chế.

Phương pháp sàng lọc

Sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc các phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH axit thấp hơn so với ở độ pH trung tính. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc các phân tử liên kết kháng nguyên mà có thể liên kết riêng rẽ với nhiều kháng nguyên. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc các phân tử liên kết kháng nguyên có thời gian lưu trong huyết tương tốt hơn. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên mà phân ly bên trong tế bào ra khỏi kháng nguyên được liên kết ngoại bào. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên và được nội hóa vào tế bào, và được giải phóng ra khỏi tế bào ở dạng không chứa kháng nguyên. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương được gia tăng. Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết với kháng nguyên đặc biệt hữu ích khi được sử dụng làm dược phẩm.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (b) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5; và
- (c) lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5.

Trong phương pháp sàng lọc theo sáng chế, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 không được giới hạn cụ thể, miễn là nó là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0. Tuy nhiên, ví dụ, hoạt tính liên kết kháng nguyên tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=7,4. Hơn nữa, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 không được giới hạn cụ thể, miễn là nó là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5. Tuy nhiên, ví dụ, hoạt tính liên kết kháng nguyên tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 hoặc 5,5.

Hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có thể xác định được bằng các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các điều kiện không phải độ pH có thể được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này xác định một cách thích hợp. Hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có thể đánh giá được dưới dạng hằng số phân ly (KD), hằng số phân ly biểu kiến (KD biểu kiến), tốc độ phân ly (k_d), tốc độ phân ly biểu kiến (k_d biểu kiến), v.v.. Các hằng số này có thể xác định được bằng các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng Biacore (GE healthcare), đồ thị Scatchard, hoặc FACS.

Ở đây, “bước lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5” có cùng nghĩa với “bước chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 thấp hơn hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0”.

Sự khác biệt giữa hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 và hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 không được giới hạn cụ thể miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5. Tuy nhiên, hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 tốt hơn là bằng hai lần hoặc hơn, tốt hơn là cao gấp 10 lần hoặc hơn, và tốt hơn là cao gấp 40 lần hoặc hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (b) để phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên ở bước (a) trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5; và
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên phân ly trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên không liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (b) cho phân tử liên kết kháng nguyên đã chọn ở bước (a) liên kết với kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0; và

(c) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (b) để phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên ở bước (a) trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên phân ly trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (d) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã phân ly; và
- (e) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp.

Các bước từ (a) đến (d) có thể được lặp lại hai lần hoặc nhiều lần. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước lặp lại các bước từ (a) đến (d) hai lần hoặc nhiều lần. Số lần lặp lại các bước từ (a) đến (d) không được giới hạn cụ thể; tuy nhiên, số lần này thường là 10 hoặc ít hơn.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên không liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (b) cho phân tử liên kết kháng nguyên đã chọn ở bước (a) liên kết với kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 ;
- (d) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã phân ly; và
- (e) thu gom phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp.

Các bước từ (a) đến (d) có thể được lặp lại hai lần hoặc nhiều lần. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước lặp lại các bước từ (a)

đến (d) hai lần hoặc nhiều lần. Số lần lặp lại các bước từ (a) đến (d) không được giới hạn cụ thể; tuy nhiên, số lần này thường là 10 hoặc ít hơn.

Khi thu viên thể thực khuẩn hoặc dạng tương tự được sử dụng trong phương pháp sàng lọc theo sáng chế, thì bước khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên cũng có thể là bước khuếch đại thể thực khuẩn.

Trong các phương pháp theo sáng chế, việc liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên và kháng nguyên có thể thực hiện được ở trạng thái bất kỳ, mà không có giới hạn cụ thể. Ví dụ, việc liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên và kháng nguyên có thể thực hiện được bằng cách cho kháng nguyên tiếp xúc với phân tử liên kết kháng nguyên đã được cố định, hoặc bằng cách cho phân tử liên kết kháng nguyên tiếp xúc với kháng nguyên đã được cố định. Theo cách khác, việc liên kết của phân tử liên kết kháng nguyên và kháng nguyên có thể được thực hiện bằng cách cho kháng nguyên tiếp xúc với phân tử liên kết kháng nguyên trong dung dịch.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột đã được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;
- (b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với cột ở độ pH thứ nhất từ cột này trong điều kiện độ pH thứ hai; và
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất thấp hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên đi qua cột được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;
- (b) thu phân tử liên kết kháng nguyên giải hấp được mà không liên kết với cột ở bước (a);

(c) cho phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (b) liên kết với cột trong điều kiện độ pH thứ hai; và

(d) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với cột ở bước (c).

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) cho thụ viện phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột đã được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;

(b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên ra khỏi cột trong điều kiện độ pH thứ hai;

(c) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp; và

(d) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã được giải hấp.

Các bước từ (a) đến (c) có thể được lặp lại hai lần hoặc nhiều lần. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước lặp lại các bước từ (a) đến (c) hai lần hoặc nhiều lần. Số lần lặp lại của các bước từ (a) đến (c) không được giới hạn cụ thể; tuy nhiên, số lần này thường là 10 hoặc nhỏ hơn.

Theo sáng chế, mỗi độ pH thứ nhất và thứ hai có thể là độ pH bất kỳ, miễn là chúng không giống nhau. Theo tổ hợp được ưu tiên gồm độ pH thứ nhất và độ pH thứ hai, ví dụ, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5; theo tổ hợp được ưu tiên hơn, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5; và theo tổ hợp được ưu tiên hơn nữa, độ pH thứ nhất bằng 7,4 và độ pH thứ hai bằng 5,8 hoặc 5,5.

Theo tổ hợp được ưu tiên khác gồm độ pH thứ nhất và độ pH thứ hai, ví dụ, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0; theo tổ hợp được ưu tiên hơn, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0; và theo tổ hợp được ưu tiên hơn nữa, độ pH thứ nhất bằng 5,8 hoặc 5,5 và độ pH thứ hai bằng 7,4.

Phân tử liên kết kháng nguyên được sàng lọc bằng các phương pháp theo sáng chế có thể là phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ. Ví dụ, có thể sử dụng các phân tử liên kết kháng nguyên được mô tả ở trên trong phương pháp sàng lọc theo sáng chế. Ví dụ, có

thể sàng lọc các phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự tự nhiên hoặc phân tử liên kết kháng nguyên chứa các trình tự axit amin với các đột biến thay thế. Các phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên được sàng lọc theo sáng chế bao gồm, ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên trong đó ít nhất một axit amin được thay thế hoặc cài histidin hoặc ít nhất một histidin được cài vào. Vị trí đưa đột biến thay thế hoặc đột biến cài histidin không được giới hạn cụ thể, và có thể được đưa vào ở vị trí bất kỳ. Hơn nữa, đột biến thay thế hoặc cài histidin có thể được đưa vào ở một vị trí, hoặc có thể được đưa vào ở hai hoặc nhiều vị trí. Hơn nữa, các phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên được sàng lọc theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các phân tử liên kết kháng nguyên chứa các vùng ổn định được cải biến của kháng thể.

Các phân tử liên kết kháng nguyên được sàng lọc bằng các phương pháp theo sáng chế có thể là nhiều phân tử liên kết kháng nguyên khác nhau được đưa đột biến thay thế hoặc cài histidin vào ở các vị trí khác nhau, ví dụ, bằng phương pháp quét histidin.

Do đó, phương pháp sàng lọc theo sáng chế còn có thể bao gồm bước thay thế ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên bằng histidin hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên.

Trong phương pháp sàng lọc theo sáng chế, các axit amin không có trong tự nhiên có thể được sử dụng thay cho histidin. Do đó, sáng chế cũng có thể bao gồm việc thay thế histidin nêu trên bằng các axit amin không có trong tự nhiên.

Hơn nữa, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể còn bao gồm bước cải biến các axit amin thuộc các vùng ổn định của kháng thể.

Các chất liên kết kháng nguyên được sàng lọc bằng các phương pháp theo sáng chế có thể tạo ra được bằng phương pháp bất kỳ. Ví dụ, có thể sử dụng các kháng thể có trước đó, các thư viện có trước đó (thư viện thể thực khuẩn, v.v.), các kháng thể và thư viện bào chế được tạo ra từ tế bào lai thu được bằng cách gây miễn dịch cho động vật hoặc từ các tế bào B của các động vật đã được gây miễn dịch, các kháng thể và thư viện (các thư viện có lượng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên cao, các thư viện đưa histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào ở các vị trí đặc hiệu), các thư viện tương tự) được tạo ra bằng cách đưa các đột biến histidin hoặc các đột biến axit

amin không có trong tự nhiên và trong các kháng thể và thư viện được mô tả ở trên, v.v..

Các phân tử liên kết kháng nguyên liên kết nhiều lần với kháng nguyên, do đó có thời gian lưu trong huyết thanh tốt hơn, có thể thu được bằng phương pháp sàng lọc theo sáng chế. Do đó, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sàng lọc để thu các phân tử liên kết kháng nguyên có thời gian lưu trong huyết thanh tốt hơn.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên có thể liên kết với kháng nguyên hai hoặc nhiều lần khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ, có thể thu được bằng phương pháp sàng lọc theo sáng chế. Do đó, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng để thu phân tử liên kết kháng nguyên mà có thể liên kết với kháng nguyên hai hoặc nhiều lần.

Hơn nữa, các phân tử liên kết kháng nguyên có thể liên kết với nhiều kháng nguyên hơn so với nhiều vị trí liên kết kháng nguyên của chúng khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ có thể thu được bằng các phương pháp sàng lọc theo sáng chế. Do đó, các phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sàng lọc để thu các phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với nhiều kháng nguyên hơn so với nhiều vị trí liên kết kháng nguyên của chúng. Ví dụ, khi kháng thể này là kháng thể trung hòa, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng để thu các phân tử liên kết kháng nguyên mà có thể trung hòa nhiều kháng nguyên hơn so với số vị trí liên kết kháng nguyên của các phân tử liên kết kháng nguyên này.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng phân ly bên trong tế bào ra khỏi kháng nguyên đã được liên kết ngoại bào khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ, có thể thu được bằng phương pháp sàng lọc theo sáng chế. Do đó, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sàng lọc để thu phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng phân ly bên trong tế bào ra khỏi kháng nguyên được liên kết ngoại bào.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên và được nội hóa vào tế bào và được giải phóng ra ngoài tế bào ở dạng không chứa kháng nguyên khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ, có thể thu được bằng phương pháp sàng lọc theo sáng chế. Do đó, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng để thu phân tử liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên và được nội hóa vào tế bào và được giải phóng ra ngoài tế bào ở dạng không chứa kháng nguyên.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên có thể loại bỏ nhanh kháng nguyên trong huyết tương khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ, có thể thu được bằng phương pháp sàng lọc theo sáng chế. Do đó, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng để thu phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương tăng lên (cao).

Hơn nữa, các phân tử liên kết kháng nguyên này được mong đợi là đặc biệt tốt hơn là làm được phẩm, do liều lượng và tần suất sử dụng cho bệnh nhân có thể giảm và do đó tổng liều lượng có thể giảm. Do đó, phương pháp sàng lọc theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sàng lọc các phân tử liên kết kháng nguyên để sử dụng làm được phẩm.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thư viện trong đó lượng histidin tăng lên so với thư viện ban đầu. Thư viện chứa các phân tử liên kết kháng nguyên có hàm lượng histidin tăng có thể được sử dụng trong các phương pháp sàng lọc được mô tả ở trên và các phương pháp sản xuất được mô tả dưới đây.

Thư viện có hàm lượng hisitdin tăng có thể tạo ra được bằng các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm phương pháp sau. 20 loại codon bộ ba (trinucleotit) mã hóa 20 loại axit amin có thể được kết hợp với tần số như nhau khi tổng hợp các axit nucleic để tạo ra thư viện bằng phương pháp trinucleotit (J Mol Biol. 2008 Feb 29; 376(4): 1182-200). Kết quả là, vị trí được đột biến đối với thư viện này có thể được tạo ra để chứa 20 loại axit amin với xác suất như nhau. Phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH thể nhân thấp hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH huyết tương. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có thời gian lưu trong huyết tương tốt hơn. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên đặc biệt hữu ích khi được sử dụng làm dược phẩm.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (b) xác định hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (c) lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (d) thu phân tử liên kết kháng nguyên chọn được ở bước (c); và
- (e) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (d).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (b) để phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên ở bước (a) trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên phân ly trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (d) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (c); và
- (e) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (d).

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên không liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (b) cho kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên chọn được ở bước (a);
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (d) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (c); và
- (e) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (d).

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (b) để phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên ở bước (a) được giữ trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên phân ly trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;
- (d) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã phân ly;
- (e) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã giải hấp;
- (f) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (e); và
- (g) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (f).

Các bước từ (a) đến (d) có thể được lặp lại hai lần hoặc nhiều lần. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước lặp lại các bước từ (a) đến (d) hai lần hoặc nhiều lần. Số lần lặp lại các bước từ (a) đến (d) không được giới hạn cụ thể; tuy nhiên, số lần này thường là 10 hoặc ít hơn.

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất phương pháp sàng lọc phân tử liên kết kháng nguyên, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên không liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5;

- (b) cho kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 liên kết với phân tử liên kết kháng nguyên chọn được ở bước (a);
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên trong điều kiện độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0;
- (d) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã phân ly;
- (e) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã giải hấp;
- (f) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (e); và
- (g) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (f).

Các bước từ (a) đến (d) có thể được lặp lại hai lần hoặc nhiều lần. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước lặp lại các bước từ (a) đến (d) hai lần hoặc nhiều lần. Số lần lặp lại các bước từ (a) đến (d) không được giới hạn cụ thể; tuy nhiên, số lần này thường là 10 hoặc ít hơn.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột đã được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;
- (b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên, phân tử này đã liên kết với cột trong điều kiện độ pH thứ nhất, ra khỏi cột trong điều kiện độ pH thứ hai;
- (c) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã giải hấp;
- (d) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (c); và
- (e) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (d).

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết ở độ pH thứ nhất cao hơn so với hoạt tính liên kết ở độ pH thứ hai, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) cho thụ viện phân tử liên kết kháng nguyên liên kết với cột đã được cố định kháng nguyên trong điều kiện độ pH thứ nhất;
- (b) giải hấp phân tử liên kết kháng nguyên ra khỏi cột trong điều kiện độ pH thứ hai;
- (c) khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đã giải hấp;

- (d) thu phân tử liên kết kháng nguyên đã giải hấp;
- (e) thu gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên thu được ở bước (d); và
- (f) sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên bằng cách sử dụng gen thu được ở bước (e).

Các bước từ (a) đến (c) có thể được lặp lại hai lần hoặc nhiều lần. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp được mô tả ở trên còn bao gồm bước lặp lại các bước từ (a) đến (c) hai lần hoặc nhiều lần. Số lần lặp lại các bước từ (a) đến (c) không được giới hạn cụ thể; tuy nhiên, số lần này thường là 10 hoặc ít hơn.

Khi thư viện thể thực khuẩn hoặc thư viện tương tự được sử dụng trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, bước khuếch đại gen mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên có thể là bước khuếch đại thể thực khuẩn.

Các chất liên kết kháng nguyên được sử dụng trong phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ. Ví dụ, có thể sử dụng các kháng thể có trước đó, các thư viện có trước đó (thư viện thể thực khuẩn, các thư viện tương tự), các kháng thể và thư viện được tạo ra từ tế bào lai thu được bằng cách gây miễn dịch cho động vật hoặc từ các tế bào B của các động vật đã được gây miễn dịch, các kháng thể và thư viện (các thư viện có lượng histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên cao, các thư viện được đưa histidin hoặc axit amin không có trong tự nhiên vào ở các vị trí đặc hiệu), các thư viện tương tự) được tạo ra bằng cách đưa các đột biến histidin hoặc đột biến axit amin không có trong tự nhiên vào trong các kháng thể và thư viện được mô tả ở trên, v.v..

Trong phương pháp sản xuất được mô tả ở trên, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 không được giới hạn cụ thể, miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên là hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0. Tốt hơn nếu hoạt tính liên kết kháng nguyên này là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên là hoạt tính ở độ pH=7,4. Theo cách khác, hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 không được giới hạn cụ thể, miễn là nó là hoạt tính liên kết kháng nguyên này là hoạt tính ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5. Tốt hơn nếu hoạt tính liên kết kháng

nguyên này là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, tốt hơn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH=5,8 hoặc 5,5.

Hoạt tính liên kết kháng nguyên của phân tử liên kết kháng nguyên có thể xác định được bằng các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các điều kiện ngoại trừ độ pH có thể được xác định một cách thích hợp bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Bước lựa chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 là tương đồng với bước chọn phân tử liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 thấp hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0.

Sự khác biệt giữa hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 và hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 không được giới hạn cụ thể miễn là hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5. Tốt hơn nếu hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 cao gấp hai lần hoặc nhiều hơn, tốt hơn là cao gấp 10 lần hoặc nhiều hơn, và tốt hơn nữa là cao gấp 40 lần hoặc nhiều hơn so với hoạt tính liên kết kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5.

Trong các phương pháp sản xuất được mô tả ở trên, phân tử liên kết kháng nguyên có thể được liên kết với kháng nguyên trong điều kiện bất kỳ, và điều kiện này không được giới hạn cụ thể. Ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên có thể được liên kết với kháng nguyên bằng cách cho kháng nguyên này tiếp xúc với kháng nguyên đã được cố định hoặc bằng cách cho phân tử liên kết kháng nguyên này tiếp xúc với kháng nguyên đã được cố định. Theo cách khác, phân tử liên kết kháng nguyên có thể được liên kết với kháng nguyên bằng cách cho kháng nguyên này tiếp xúc với phân tử liên kết kháng nguyên trong dung dịch.

Trong các phương pháp sản xuất được mô tả ở trên, mỗi trong số độ pH thứ nhất và thứ hai có thể là độ pH bất kỳ, miễn là chúng không giống nhau. Theo tổ hợp được ưu tiên của độ pH thứ nhất và độ pH thứ hai, ví dụ, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5; theo tổ hợp được ưu tiên hơn, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5; và theo tổ hợp được ưu tiên hơn nữa, độ pH thứ nhất bằng 7,4 và độ pH thứ hai bằng 5,8 hoặc 5,5.

Theo tổ hợp được ưu tiên khác của độ pH thứ nhất và độ pH thứ hai, ví dụ, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 4,0 đến 6,5 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 6,7 đến 10,0; theo tổ hợp được ưu tiên hơn, độ pH thứ nhất nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5 và độ pH thứ hai nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0; và theo tổ hợp được ưu tiên hơn nữa, độ pH thứ nhất bằng 5,8 hoặc 5,5 và độ pH thứ hai bằng 7,4.

Phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng các phương pháp sản xuất được mô tả ở trên có thể là phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ. Các phân tử liên kết kháng nguyên được ưu tiên bao gồm, ví dụ, phân tử liên kết kháng nguyên trong đó ít nhất một axit amin được thay thế bằng histidin hoặc ít nhất một histidin được cài vào. Vị trí tại đó đột biến histidin này được đưa vào không được giới hạn cụ thể và có thể được đưa vào ở vị trí bất kỳ. Hơn nữa, đột biến histidin có thể được đưa vào ở một vị trí, hoặc ở hai hoặc nhiều vị trí.

Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế còn có thể bao gồm bước thay thế ít nhất một axit amin trong phân tử liên kết kháng nguyên bằng histidin hoặc cài ít nhất một histidin vào phân tử liên kết kháng nguyên.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, các axit amin không có trong tự nhiên có thể được sử dụng thay cho histidin. Do đó, sáng chế cũng có thể bao gồm việc thay thế histidin nêu trên đây bằng các axit amin không có trong tự nhiên.

Hơn nữa, theo một phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng các phương pháp sản xuất được mô tả ở trên bao gồm, ví dụ, các phân tử liên kết kháng nguyên chứa các vùng ổn định được cải biến của kháng thể. Do đó, phương

pháp sản xuất theo sáng chế còn có thể bao gồm bước cải biến các axit amin thuộc các vùng ổn định của kháng thể.

Phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế có thời gian lưu trong huyết tương tốt hơn. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có thời gian lưu trong huyết tương tốt hơn.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng các phương pháp sản xuất này được mong đợi là có khả năng liên kết với kháng nguyên hai hoặc nhiều lần khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với kháng nguyên hai hoặc nhiều lần.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng các phương pháp sản xuất theo sáng chế được mong đợi là có khả năng liên kết với nhiều kháng nguyên hơn so với nhiều vị trí liên kết kháng nguyên của nó khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với nhiều kháng nguyên hơn so với số vị trí liên kết kháng nguyên của nó.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng các phương pháp sản xuất theo sáng chế được cho là có khả năng phân ly bên trong tế bào ra khỏi kháng nguyên đã được liên kết ngoại bào khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng phân ly bên trong tế bào ra khỏi kháng nguyên đã được liên kết ngoại bào.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng các phương pháp sản xuất theo sáng chế được cho là có khả năng được liên kết với kháng nguyên và được nội hóa vào tế bào cũng như được giải phóng ra khỏi tế bào ở dạng không chứa kháng nguyên, khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sản xuất phân tử liên

kết kháng nguyên có khả năng được liên kết với kháng nguyên và được nội hóa vào tế bào và được giải phóng ra khỏi tế bào ở dạng không chứa kháng nguyên.

Hơn nữa, phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng các phương pháp sản xuất theo sáng chế được cho là có khả năng loại bỏ nhanh kháng nguyên ra khỏi huyết tương khi được sử dụng cho động vật như người, chuột nhắt hoặc khỉ. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên có khả năng loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương tăng lên (cao).

Hơn nữa, các phân tử liên kết kháng nguyên này có thể làm giảm số liều ở bệnh nhân và được cho là đặc biệt tốt hơn làm dược phẩm. Do đó, phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể được sử dụng làm phương pháp sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên để sử dụng làm dược phẩm.

Các gen thu được bằng các phương pháp sản xuất theo sáng chế thường được mang bởi (được cài vào) các vector thích hợp, và tiếp theo được đưa vào tế bào chủ. Các vector này không được giới hạn cụ thể miễn là chúng vẫn giữ được một cách ổn định các axit nucleic đã cài vào. Ví dụ, khi *Escherichia coli* (*E. coli*) được sử dụng làm vật chủ, các vector tách dòng được ưu tiên bao gồm vector pBluescript (Stratagene); tuy nhiên, các vector có bán trên thị trường khác nhau có thể được sử dụng. Khi sử dụng các vector để sản xuất các phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế, vector biểu hiện là đặc biệt hữu ích. Các vector biểu hiện này không được giới hạn cụ thể miễn là các vector này biểu hiện phân tử liên kết kháng nguyên *in vitro*, trong *E. coli*, trong tế bào nuôi cấy hoặc trong cơ thể sinh vật. Ví dụ, vector pBEST (Promega) được ưu tiên để biểu hiện *in vitro*; vector pET (Invitrogen) được ưu tiên đối với *E. coli*; vector pME18S-FL3 (Số hiệu lưu giữ ngân hàng gen số AB009864) được ưu tiên đối với tế bào nuôi cấy; và vector pME18S (Mol Cell Biol. 8:466-472 (1988)) được ưu tiên đối với các cơ thể sinh vật. Các ADN theo sáng chế có thể được cài vào các vector này bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách gắn sử dụng các vị trí enzym giới hạn (Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel *et al.*, (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11).

Các tế bào chủ ở trên không được giới hạn cụ thể, và các tế bào chủ khác nhau có thể được sử dụng tùy theo mục đích. Ví dụ về các tế bào dùng để biểu hiện phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm tế bào vi khuẩn (như *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces* và *Bacillus subtilis*), tế bào có nhân điển hình (như nấm men và *Aspergillus*), tế bào côn trùng (như *Drosophila* S2 và *Spodoptera* SF9), tế bào động vật (như CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, và tế bào u hắc sắc tố Bowes), và tế bào thực vật. Vector có thể được đưa vào tế bào chủ bằng các phương pháp đã biết, ví dụ, phương pháp kết tủa canxi phosphat, phương pháp biến nạp điện (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9), phương pháp biến nạp lipid và phương pháp vi tiêm.

Tế bào chủ có thể được nuôi cấy bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, khi sử dụng tế bào động vật làm tế bào chủ, DMEM, MEM, RPMI 1640 hoặc IMDM có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy. Chúng có thể được sử dụng với các thành phần bổ sung trong huyết thanh như FBS hoặc huyết thanh bào thai bò (fetal calf serum - FCS). Các tế bào này có thể được nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh. Độ pH được ưu tiên nằm trong khoảng từ 6 đến 8 trong suốt quá trình nuôi cấy. Việc ủ thường được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C trong khoảng thời gian từ 15 đến 200 giờ. Môi trường có thể được trao đổi, sục khí hoặc khuấy, nếu cần.

Các tín hiệu bài tiết thích hợp có thể được kết hợp polypeptit đang nói đến để cho phân tử liên kết kháng nguyên này được biểu hiện trong tế bào chủ được bài tiết vào khoang lưới nội chất, vào khoang chu chất hoặc vào môi trường ngoại bào. Các tín hiệu này có thể là nội sinh đối với phân tử liên kết kháng nguyên đang nói đến hoặc có thể là các tín hiệu khác loại.

Mặt khác, ví dụ, các hệ thống sản xuất có sử dụng động vật hoặc thực vật có thể được sử dụng làm các hệ thống để sản xuất polypeptit *in vivo*. Polynucleotit đang nói đến được đưa vào động vật hoặc thực vật và polypeptit được sản xuất trong cơ thể động vật hoặc thực vật này, và tiếp theo được thu gom. "Vật chủ" theo sáng chế bao gồm động vật và thực vật.

Hệ thống sản xuất sử dụng động vật bao gồm hệ thống sản xuất có sử dụng động vật có vú và côn trùng. Có thể sử dụng động vật có vú như dê, lợn, cừu, chuột nhắt và bò (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Các động vật có vú này có thể là các động vật chuyển gen.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế được tạo ra dưới dạng gen dung hợp với gen mã hóa polypeptit được sản xuất đặc hiệu trong sữa, như β -casein của dê. Tiếp theo, phôi dê được tiêm các mảnh polynucleotit chứa gen dung hợp và tiếp theo cấy vào dê cái. Các phân tử liên kết kháng nguyên mong muốn có thể được thu từ sữa được tạo ra bởi dê chuyển gen, dê này được sinh ra từ dê đã tiếp nhận phôi, hoặc từ con cháu của chúng. Các hormon có thể được sử dụng nếu thích hợp để làm tăng thể tích sữa chứa phân tử liên kết kháng nguyên được tạo ra bởi dê chuyển gen (Ebert *et al.*, Bio/Technology (1994) 12: 699-702).

Côn trùng như tằm có thể được sử dụng để sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Khi tằm được sử dụng, baculovirut mang polynucleotit mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đang nói đến có thể được sử dụng để gây nhiễm tằm, và phân tử liên kết kháng nguyên có thể thu được từ dịch thể của chúng.

Hơn nữa, khi thực vật được sử dụng để sản xuất phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế, thuốc lá có thể được sử dụng. Khi thuốc lá được sử dụng, polynucleotit mã hóa phân tử liên kết kháng nguyên đang nói đến được cài vào vectơ biểu hiện thực vật, ví dụ, pMON 530, và tiếp theo vectơ này được đưa vào vi khuẩn như *Agrobacterium tumefaciens*. Tiếp theo, vi khuẩn này được gây nhiễm vào thuốc lá như *Nicotiana tabacum*, và các phân tử liên kết kháng nguyên mong muốn có thể thu được từ lá của chúng (Ma *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131-138). Theo cách khác, có thể gây nhiễm bèo tấm (*Lemna minor*) bằng các vi khuẩn tương tự. Sau khi tách dòng, các phân tử liên kết kháng nguyên mong muốn có thể thu được từ các tế bào bèo tấm này (Cox KM *et al.*, Nat. Biotechnol. 2006 Dec; 24(12):1591-1597).

Các phân tử liên kết kháng nguyên thu được theo cách này có thể được phân lập từ bên trong hoặc bên ngoài (như môi trường hoặc sữa) của tế bào chủ, và được tinh chế dưới dạng các phân tử liên kết kháng nguyên gần như tinh khiết hoặc đồng nhất. Phương

pháp phân lập và tinh chế phân tử liên kết kháng nguyên không được giới hạn cụ thể, và các phương pháp phân lập và tinh chế thường được sử dụng để tinh chế polypeptit có thể được sử dụng. Các phân tử liên kết kháng nguyên có thể được phân lập và tinh chế, bằng cách lựa chọn và kết hợp một cách thích hợp, ví dụ, cột sắc ký, lọc, siêu lọc, kết tủa bằng muối, kết tủa dung dịch, chiết dung môi, chưng cất, kết tủa miễn dịch, điện di trên gel SDS-polyacrylamit, sắc ký đẳng điện, thẩm tách và tái kết tinh.

Phương pháp sắc ký bao gồm, ví dụ, sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, lọc gel, sắc ký ngược pha đảo và sắc ký hấp phụ (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Các phương pháp sắc ký này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký pha lỏng như HPLC và FPLC. Các cột được sử dụng cho sắc ký ái lực bao gồm cột protein A và cột protein G. Các cột sử dụng protein A bao gồm, ví dụ, Hyper D, POROS và Sepharose F. F. (Pharmacia).

Nếu cần, phân tử liên kết kháng nguyên có thể được cải biến một cách tùy ý, và các peptit có thể được làm khuyết một phần bằng cách cho enzym cải biến protein thích hợp tác động trước hoặc sau khi tinh chế phân tử liên kết kháng nguyên. Các enzym cải biến protein này bao gồm, ví dụ, trypsin, chymotrypsin, lysyl endopeptidaza, protein kinaza và glucosidaza.

Kháng thể kháng thụ thể IL-6

Hơn nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng thụ thể IL-6 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (a) đến (m) sau đây:

(a) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin, trong đó ít nhất một Tyr ở vị trí 27, Asp ở vị trí 31, Asp ở vị trí 32, Trp ở vị trí 35, Tyr ở vị trí 51, Asn ở vị trí 59, Ser ở vị trí 63, Met ở vị trí 106 và Tyr ở vị trí 108 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53) đã được thay thế bằng His;

(b) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (H3pI) có trình tự axit amin, trong đó Tyr ở vị trí 27, Asp ở vị trí 31 và Trp ở vị trí 35 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53) đã được thay thế bằng His;

(c) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin, trong đó Tyr ở vị trí 27, Asp ở vị trí 31, Asp ở vị trí 32, Trp ở vị trí 35, Asn ở vị trí 59, Ser ở vị trí 63 và Tyr ở vị trí 108 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53) đã được thay thế bằng His;

(d) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (H170) có trình tự axit amin, trong đó Tyr ở vị trí 27, Asp ở vị trí 31, Asp ở vị trí 32, Trp ở vị trí 35, Asn ở vị trí 59, Ser ở vị trí 63 và Tyr ở vị trí 108 đã được thay thế bằng His, và trong đó Ser ở vị trí 99 đã được thay thế bằng Val và Thr ở vị trí 103 đã được thay thế bằng Ile trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53);

(e) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin, trong đó Asp ở vị trí 31, Tyr ở vị trí 51, Ser ở vị trí 63, Met ở vị trí 106 và Tyr ở vị trí 108 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53) đã được thay thế bằng His;

(f) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (CLH5) chứa trình tự axit amin, trong đó Asp ở vị trí 31, Tyr ở vị trí 51, Ser ở vị trí 63, Met ở vị trí 106 và Tyr ở vị trí 108 đã được thay thế bằng His, và trong đó Ser ở vị trí 99 đã được thay thế bằng Phe và Thr ở vị trí 103 đã được thay thế bằng Ile trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53);

(g) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin, trong đó ít nhất một trong số Asp ở vị trí 28, Tyr ở vị trí 32, Glu ở vị trí 53, Ser ở vị trí 56 và Asn ở vị trí 92 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (vùng biến đổi PF1L) đã được thay thế bằng His;

(h) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (L73) có trình tự axit amin, trong đó Asp ở vị trí 28, Tyr ở vị trí 32 và Glu ở vị trí 53 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (vùng biến đổi PF1L) đã được thay thế bằng His;

(i) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (L82) có trình tự axit amin, trong đó Tyr ở vị trí 32 và Glu ở vị trí 53 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53) đã được thay thế bằng His;

- (j) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (CLL5) có trình tự axit amin, trong đó Tyr ở vị trí 32, Glu ở vị trí 53, Ser ở vị trí 56 và Asn ở vị trí 92 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (vùng biến đổi PF1L) đã được thay thế bằng His;
- (k) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng của (b) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của (h);
- (l) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng của (d) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của (i); và
- (m) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng của (f) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của (h).

Các ví dụ cụ thể về vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin trong đó ít nhất một trong số Tyr ở vị trí 27, Asp ở vị trí 31, Asp ở vị trí 32, Trp ở vị trí 35, Tyr ở vị trí 51, Asn ở vị trí 59, Ser ở vị trí 63, Met ở vị trí 106 và Tyr ở vị trí 108 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 (vùng biến đổi H53) đã được thay thế bằng His bao gồm, ví dụ, các vùng biến đổi của chuỗi nặng sau.

vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 (H3pI)

vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4 (H170)

vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 (CLH5)

Các ví dụ cụ thể về vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin trong đó ít nhất một trong số Asp ở vị trí 28, Tyr ở vị trí 32, Glu ở vị trí 53, Ser ở vị trí 56 và Asn ở vị trí 92 trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 (vùng biến đổi PF1L) đã được thay thế bằng His bao gồm, ví dụ, các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ sau.

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6 (L73)

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 (L82)

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8 (CLL5)

Các vị trí axit amin và các axit amin được thay thế trong mỗi trong số các kháng thể được mô tả ở trên H3pI, H170, CLH5, L73, L82 và CLL5 được thể hiện dưới đây trong Bảng 1. Các vị trí axit amin này được thể hiện dựa trên cách đánh số Kabat.

Vị trí	27	31	32	33	35	50	58	61	62	63	64	65	95	99	100B	102
H3pI	H	H		H	H											
H170	H	H	H	H	H		H		H				V	I		H
CLH5		H		H		H			H				F	I	H	H

Vị trí	24	27	28	32	53	55	56	90	92	94
L73			H	H	H	H				
L82				H	H	H				
CLL5				H	H	H	H		H	

* Trong WT, chuỗi H có histidin ở vị trí 33, trong khi chuỗi L có histidin ở vị trí 55.

Sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một trong số các đột biến thay thế axit amin được mô tả ở trên trong mục từ (a) đến (j), và phương pháp sản xuất kháng thể này. Do đó, kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm kháng thể không chỉ chứa đột biến bất kỳ trong số các đột biến thay thế axit amin được mô tả ở trên trong mục từ (a) đến (j) mà còn chứa (các) đột biến thay thế axit amin khác với các đột biến thay thế axit amin được mô tả ở trên trong mục từ (a) đến (j). Các đột biến thay thế axit amin khác với các đột biến thay thế axit amin được mô tả ở trên trong mục từ (a) đến (j) bao gồm, ví dụ, các đột biến thay thế, khuyết, thêm và/hoặc cài trong trình tự axit amin của CDR và FR.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng thụ thể IL-6 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (28) sau đây:

- (1) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (vùng biến đổi VH1-IgG1) có trình tự axit amin từ các vị trí từ 1 đến 119 nêu trong SEQ ID NO: 21 (VH1-IgG1);
- (2) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (vùng biến đổi VH2-IgG1) có trình tự axit amin từ các vị trí từ 1 đến 119 nêu trong SEQ ID NO: 22 (VH2-IgG1);
- (3) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (vùng biến đổi VH3-IgG1) có trình tự axit amin từ các vị trí từ 1 đến 119 nêu trong SEQ ID NO: 23 (VH3-IgG1);
- (4) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (vùng biến đổi VH4-IgG1) có trình tự axit amin từ các vị trí từ 1 đến 119 nêu trong SEQ ID NO: 24 (VH4-IgG1);
- (5) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (vùng biến đổi VL1-CK) có trình tự axit amin từ các vị trí từ 1 đến 107 nêu trong SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);
- (6) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (vùng biến đổi VL2-CK) có trình tự axit amin từ các vị trí từ 1 đến 107 nêu trong SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);

- (7) kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (vùng biến đổi VL3-CK) có trình tự axit amin từ các vị trí từ 1 đến 107 nêu trong SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- (8) kháng thể (Fv1-IgG1) bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng trong mục (2) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ trong mục (6);
- (9) kháng thể (Fv2-IgG1) bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng trong mục (1) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 (L82);
- (10) kháng thể (Fv3-IgG1) bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng trong mục (4) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ trong mục (5);
- (11) kháng thể (Fv4-IgG1) bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng trong mục (3) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ trong mục (7);
- (12) kháng thể (VH3-IgG2ΔGK) bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 33;
- (13) kháng thể (VH3-M58) bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34;
- (14) kháng thể (VH3-M73) bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35;
- (15) kháng thể (Fv4-IgG2ΔGK) bao gồm chuỗi nặng trong mục (12) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- (16) kháng thể (Fv4-M58) bao gồm chuỗi nặng trong mục (13) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- (17) kháng thể (Fv4-M73) bao gồm chuỗi nặng trong mục (14) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- (18) kháng thể (VH2-M71) bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 36 (VH2-M71);
- (19) kháng thể (VH2-M73) bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 37 (VH2-M73);
- (20) kháng thể (VH4-M71) bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38 (VH4-M71);

- (21) kháng thể (VH4-M73) bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39 (VH4-M73);
- (22) kháng thể (Fv1-M71) bao gồm chuỗi nặng trong mục (18) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);
- (23) kháng thể (Fv1-M73) bao gồm chuỗi nặng trong mục (19) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);
- (24) kháng thể (Fv3-M71) bao gồm chuỗi nặng trong mục (20) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);
- (25) kháng thể (Fv3-M73) bao gồm chuỗi nặng trong mục (21) và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);
- (26) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);
- (27) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 (VL2-CK); và
- (28) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27 (VL3-CK).

Hơn nữa, sáng chế đề xuất các FR và CDR trong các mục từ (a) đến (v) sau đây:

- (a) chuỗi nặng CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40 (VH1, 2, 3, 4);
- (b) chuỗi nặng CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41 (VH1, 2);
- (c) chuỗi nặng CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 42 (VH3);
- (d) chuỗi nặng CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 (VH4);
- (e) chuỗi nặng CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44 (VH1, 2);
- (f) chuỗi nặng CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 (VH3, 4);
- (g) chuỗi nặng FR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46 (VH1, 2);
- (h) chuỗi nặng FR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47 (VH3, 4);
- (i) chuỗi nặng FR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 48 (VH1, 2, 3, 4);
- (j) chuỗi nặng FR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49 (VH1);
- (k) chuỗi nặng FR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 50 (VH2);

- (l) chuỗi nặng FR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51 (VH3, 4);
- (m) chuỗi nặng FR4 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 52 (VH1, 2, 3, 4);
- (n) chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53 (VL1, 2);
- (o) chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 54 (VL3);
- (p) chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55 (VL1, VL3);
- (q) chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 56 (VL2);
- (r) chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57 (VL1, 2, 3);
- (s) chuỗi nhẹ FR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58 (VL1, 2, 3);
- (t) chuỗi nhẹ FR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59 (VL1, 2, 3);
- (u) chuỗi nhẹ FR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 60 (VL1, 2, 3); và
- (v) chuỗi nhẹ FR4 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61 (VL1, 2, 3).

Các trình tự tương ứng trong các mục từ (a) đến (v) nêu trên được thể hiện trên Fig. 25. Hơn nữa, sáng chế đề xuất polypeptit bao gồm FR và CDR bất kỳ trong số các FR và CDR trong các mục từ (a) đến (v) nêu trên.

Kháng thể kháng thụ thể IL-6 theo sáng chế còn bao gồm các mảnh và các sản phẩm được cải biến của kháng thể bao gồm các đột biến bất kỳ trong số các đột biến thay thế axit amin được mô tả ở trên. Các mảnh kháng thể này bao gồm, ví dụ, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv (scFv) chuỗi đơn trong đó Fv của các chuỗi H và L được liên kết với nhau thông qua trình tự liên kết thích hợp, chuỗi H miền đơn và chuỗi L miền đơn (ví dụ, Nat. Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126-36), Unibody (WO 2007059782 A1) và SMIP (WO 2007014278 A2). Nguồn kháng thể này không được giới hạn cụ thể. Kháng thể này bao gồm kháng thể của người, chuột nhắt, chuột thường và thỏ. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể là kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể được làm giống như của người hoàn toàn, v.v..

Cụ thể, các mảnh kháng thể này thu được bằng cách xử lý các kháng thể bằng enzym, ví dụ, papain hoặc pepsin, hoặc bằng cách tạo cấu trúc các gen mã hóa các mảnh kháng thể này, tiếp theo cài chúng vào vectơ biểu hiện, và sau đó biểu hiện chúng trong tế bào chủ thích hợp (ví dụ, xem ấn phẩm Co, M.S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496;

Plueckthun, A. & Skerra, A. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-66; Bird, R. E. *et al.*, *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất (i) polypeptit theo sáng chế hoặc (ii) polypeptit được mã hóa bằng gen mã hóa polypeptit theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa vector mà được đưa polynucleotit mã hóa polypeptit theo sáng chế vào.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit theo sáng chế, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) nuôi cấy tế bào chủ chứa vector mà được đưa gen mã hóa polypeptit theo sáng chế đã được đưa vào; và
- (b) thu polypeptit được mã hóa bằng gen này.

scFv được thu bằng cách liên kết các vùng V của các chuỗi H và chuỗi L của kháng thể. Trong scFv này, vùng V của chuỗi H được liên kết với vùng V của chuỗi L thông qua trình tự liên kết, tốt hơn là trình tự liên kết peptit (Huston, J. S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 10.0, 5879-5883). Các vùng V của chuỗi H và chuỗi L trong scFv có thể được thu từ kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả ở trên. Trình tự liên kết peptit để liên kết các vùng V này bao gồm, ví dụ, các peptit chuỗi đơn tùy ý gồm từ 12 đến 19 gốc axit amin.

Khi kháng thể kháng thụ thể IL-6 theo sáng chế chứa vùng ổn định, thì vùng ổn định này có thể thuộc loại bất kỳ, ví dụ, IgG1, IgG2 hoặc IgG4 có thể được sử dụng. Tốt hơn nếu vùng ổn định này là vùng ổn định của kháng thể người. Theo cách khác, vùng ổn định này có thể là dạng được cải biến bao gồm các đột biến thay thế, khuyết, thêm và/hoặc cài trong trình tự axit amin của các vùng ổn định của IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người.

Thụ thể IL-6 được ưu tiên để liên kết với kháng thể kháng thụ thể IL-6 theo sáng chế là thụ thể IL-6 của người.

Kháng thể kháng thụ thể IL-6 theo sáng chế có thời gian lưu trong huyết tương tốt hơn, và chúng tồn tại trong khoảng thời gian kéo dài trong huyết tương ở dạng có khả

năng liên kết với kháng nguyên, tức là các thụ thể IL-6 hòa tan hoặc được liên kết màng. Do đó, kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết *in vivo* với các thụ thể IL-6 hòa tan hoặc thụ thể IL-6 được liên kết với màng trong khoảng thời gian kéo dài. Hơn nữa, kháng thể kháng thụ thể IL-6 có khả năng liên kết với các thụ thể IL-6 hai lần hoặc nhiều lần, và do đó được cho là có khả năng trung hòa ba thụ thể IL-6 hoặc nhiều hơn.

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên này được phân lập bằng phương pháp sàng lọc theo sáng chế hoặc phân tử liên kết kháng nguyên được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế. Phân tử liên kết kháng nguyên theo sáng chế và phân tử liên kết kháng nguyên sản xuất được bằng phương pháp sản xuất theo sáng chế có thời gian lưu trong huyết tương tốt hơn, và do đó, được cho là làm giảm tần số sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên, và do đó, hữu ích làm dược phẩm. Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất mang dược dụng.

Theo sáng chế, dược phẩm thường dùng để chỉ các chất dùng để điều trị hoặc ngăn ngừa, hoặc thử nghiệm hoặc chẩn đoán bệnh.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, dược phẩm này có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ở dạng thuốc tiêm dung dịch hoặc hỗn dịch vô trùng bao gồm nước và chất lỏng dược dụng khác. Ví dụ, các dược phẩm này có thể được bào chế bằng cách trộn ở dạng liều đơn vị được yêu cầu trong thực tiễn sản xuất thuốc được chấp nhận chung bằng cách phối hợp một cách thích hợp với các chất mang hoặc môi trường dược dụng, cụ thể là với nước vô trùng, nước muối sinh lý, dầu thực vật, nhũ tương, hỗn dịch, chất hoạt động bề mặt, chất làm ổn định, chất điều vị, tá dược, chất dẫn thuốc, chất bảo quản, chất liên kết, v.v.. Trong các chế phẩm này, lượng hoạt chất được điều chỉnh để thu được lượng thích hợp nằm trong khoảng định trước.

Các thành phần vô trùng dùng để tiêm có thể được bào chế bằng cách sử dụng các chất dẫn thuốc như nước cất dùng để tiêm, theo thực tiễn bào chế chuẩn.

Các dung dịch nước dùng để tiêm bao gồm, ví dụ, nước muối sinh lý và các dung dịch đẳng trương chứa dextroza hoặc các chất phụ trợ khác (ví dụ, D-sorbitol, D-manoza, D-manitol và natri clorua). Cũng có thể sử dụng phối hợp các chất hòa tan thích hợp, ví dụ, rượu (ethanol, v.v.), rượu đa chức (propylen glycol, polyetylen glycol, v.v.), chất hoạt động bề mặt không ion (polysorbat 80(TM), HCO-50, v.v.).

Dầu có thể là dầu mè hoặc dầu đậu nành. Benzyl benzoat và/hoặc rượu benzylic có thể được sử dụng phối hợp làm chất hòa tan. Cũng có thể sử dụng phối hợp các dung dịch đệm (ví dụ, dung dịch đệm phosphat và dung dịch đệm natri axetat), chất làm mềm (ví dụ, procain hydroclorua), chất làm ổn định (ví dụ, rượu benzylic và phenol) và/hoặc chất chống oxy hóa. Các ống thuốc tiêm thích hợp sẽ được nạp thuốc tiêm bào chế được.

Tốt hơn nếu được phẩm theo sáng chế được sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Ví dụ, dược phẩm này có thể ở dạng liều dùng để tiêm, sử dụng qua đường mũi, sử dụng qua đường phổi hoặc sử dụng qua da. Ví dụ, chúng có thể được sử dụng qua đường toàn thân hoặc khu trú bằng cách tiêm vào tĩnh mạch, tiêm vào cơ, tiêm vào màng bụng, tiêm dưới da, v.v..

Các phương pháp sử dụng có thể được lựa chọn một cách thích hợp có xem xét đến độ tuổi và triệu chứng của bệnh nhân. Liều dược phẩm chứa phân tử liên kết kháng nguyên có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 1000mg/kg đối với mỗi lần sử dụng. Theo cách khác, liều này có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,001 đến 100000mg/bệnh nhân. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi các trị số được mô tả ở trên. Liều và phương pháp sử dụng phụ thuộc vào thể trọng, độ tuổi, triệu chứng, v.v., của bệnh nhân. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định được liều và phương pháp sử dụng thích hợp có xem xét các yếu tố được mô tả ở trên.

Các axit amin chứa trong trình tự axit amin theo sáng chế có thể được cải biến sau dịch mã. ví dụ, việc cải biến gốc glutamin (Gln) ở đầu tận cùng N thành gốc axit pyroglutamic (pGlu) bằng cách pyroglutamyl hóa đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Tất nhiên, các axit amin được cải biến sau dịch mã này được bao gồm trong các trình tự axit amin theo sáng chế.

Tất cả các tài liệu tình trạng kỹ thuật được nêu trong bản mô tả này được đưa vào đây theo cách viện dẫn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ dưới đây, nhưng các ví dụ này không được coi là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Sản xuất kháng thể PM1 được làm giống như của người được cải biến

Bào chế thụ thể IL-6 hòa tan tái tổ hợp của người (SR344)

Thụ thể IL-6 của người tái tổ hợp ở người từ thụ thể IL-6 của người, đóng vai trò là kháng nguyên, được bào chế như được mô tả sau đây. Dòng tế bào CHO biểu hiện ổn định thụ thể IL-6 hòa tan của người (sau đây được ký hiệu là SR344) (Yamasaki, et al., Science 1988; 241: 825-828 (Ngân hàng gen #X12830)) gồm trình tự axit amin từ axit amin thứ nhất đến axit amin thứ 344 ở phía đầu tận cùng N như được báo cáo trong ấn phẩm J. Biochem., 108, 673-676 (1990), được sản xuất.

SR344 được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy thu được từ các tế bào CHO biểu hiện SR344 bằng cách sử dụng 3 phương pháp sắc ký cột: Sắc ký cột Blue Sepharose 6 FF, sắc ký ái lực bằng cách sử dụng cột trong đó kháng thể đặc hiệu với SR344 được cố định, và sắc ký cột lọc gel. Phân đoạn này được giải hấp dưới dạng đỉnh chính được sử dụng làm thành phẩm được tinh chế.

Tạo ra thụ thể IL-6 hòa tan tái tổ hợp ở khi đầu chó (cIL-6R)

Các đoạn môi ADN oligonucleotit Rhe6Rf1 (SEQ ID NO: 16) và Rhe6Rr2 (SEQ ID NO: 17) được sản xuất dựa trên trình tự gen của thụ thể IL-6 của khi rhesus có thể sử dụng công khai (Birney et al., Ensemble 2006, Nucleic Acids Res., 2006, Jan. 1; 34 (Database issue): D556-61). Bằng cách sử dụng ADN bổ trợ được tạo ra từ tự khi đầu chó làm khuôn, mảnh ADN mã hóa toàn bộ chiều dài của gen thụ thể IL-6 của khi đầu chó được tạo ra bằng PCR sử dụng các đoạn môi Rhe6Rf1 và Rhe6Rr2. bằng cách sử dụng mảnh ADN thu được làm khuôn, đoạn ADN có chiều dài 1131bp (SEQ ID NO: 20) mã hóa protein trong đó 6xHis được bổ sung vào đầu tận cùng C của vùng tan

(Met1-Pro363) chứa vùng tín hiệu của gen thụ thể IL-6 của khỉ đầu chó, được khuếch đại bằng PCR có sử dụng các đoạn mồi ADN oligonucleotit CynoIL6R N-EcoRI (SEQ ID NO: 18) và CynoIL6R C-NotI-His (SEQ ID NO: 19). Đoạn ADN thu được được cắt bằng EcoRI và NotI và được cài vào vector biểu hiện tế bào động vật có vú, và tiếp theo được sử dụng để sản xuất dòng tế bào CHO biểu hiện ổn định (tế bào CHO sản xuất cyno.sIL-6R).

Môi trường nuôi cấy tế bào CHO sản xuất cyno.sIL-6R được tinh chế bằng cột HisTrap (GE Healthcare Biosciences), được cô bằng cách sử dụng bộ lọc Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore), và tinh chế tiếp bằng cột lọc gel Superdex 200 pg 16/60 (GE Healthcare Biosciences) để thu được thành phẩm được tinh chế thụ thể IL-6 hòa tan của khỉ đầu chó (sau đây được ký hiệu là cIL-6R).

Tạo ra IL-6 tái tổ hợp của khỉ đầu chó (cIL-6)

IL-6 của khỉ đầu chó được bào chế như sau. Trình tự nucleotit mã hóa 212 axit amin được lưu giữ trong cơ sở dữ liệu SWISSPROT với số hiệu lưu giữ P79341 được tạo ra, được tách dòng thành vector biểu hiện tế bào động vật có vú, và được đưa vào tế bào CHO để tạo ra dòng tế bào biểu hiện ổn định (tế bào CHO tạo ra cyno.IL-6). Môi trường nuôi cấy tế bào CHO tạo ra cyno.IL-6 được tinh chế bằng cột SP-Sepharose/FF (GE Healthcare Biosciences), được cô bằng cách sử dụng bộ lọc Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore), và tiếp theo tinh chế tiếp bằng cột lọc gel Superdex 75 pg 26/60 (GE Healthcare Biosciences). Sản phẩm này được cô bằng cách sử dụng bộ lọc Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore) để thu được thành phẩm được tinh chế IL-6 của khỉ đầu chó (sau đây được ký hiệu là cIL-6).

Thiết lập dòng tế bào BaF3 biểu hiện gp130 của người

Dòng tế bào BaF3 biểu hiện gp130 của người được thiết lập như được chỉ ra dưới đây để thu dòng tế bào biểu hiện sự sinh trưởng phụ thuộc vào IL-6.

ADN bổ trợ gp130 của người có chiều dài đầy đủ (Hibi et al., Cell 1990; 63: 1149-1157 (Ngân hàng gen #NM_002184)) được khuếch đại bằng PCR và được tách dòng trong vector biểu hiện pCOS2Zeo, vector này được bào chế bằng cách loại bỏ vị trí biểu hiện gen DHFR ra khỏi pCHOI (Hirata, et al., FEBS Letter 1994; 356: 244-248) và

cài vị trí biểu hiện gen kháng Zeocin, để tạo cấu trúc pCOS2Zeo/gp130. ADN bổ trợ IL-6R của người có chiều dài đầy đủ được khuếch đại bằng PCR và tách dòng thành pcDNA3.1(+) (Invitrogen) để tạo cấu trúc hIL-6R/pcDNA3.1(+). 10µg pCOS2Zeo/gp130 được trộn vào các tế bào BaF3 ($0,8 \times 10^7$ tế bào) đã được tạo hỗn dịch trong PBS, và được truyền xung bằng cách sử dụng Gene Pulser (Bio-Rad) ở điện áp 0,33kV và điện dung 950µFD. Các tế bào BaF3 đã có gen được đưa vào bằng cách biến nạp điện được nuôi cấy trong một ngày đêm trong môi trường RPMI1640 (Invitrogen) chứa 0,2ng/mL interleukin-3 của chuột nhắt (Peprotech) và 10% huyết thanh bào thai bò (sau đây được ký hiệu là FBS, HyClone), và tiếp theo được sàng lọc bằng cách bổ sung môi trường RPMI1640 chứa 100ng/mL interleukin-6 của người (R&D Systems), 100ng/mL thụ thể interleukin-6 hòa tan của người (R&D Systems) và 10% FBS để thiết lập dòng tế bào BaF3 biểu hiện gp130 (sau đây được ký hiệu là BaF3/gp130). Do dòng tế bào BaF3/gp130 tăng sinh khi có mặt interleukin-6 của người (R&D Systems) và SR344, nên nó có thể được sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế sinh trưởng (cụ thể, hoạt tính trung hòa thụ thể IL-6) của kháng thể kháng thụ thể IL-6.

Sản xuất kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người

Trong phần ví dụ và bản mô tả, thuật ngữ “kiểu đại” được viết tắt là WT, thuật ngữ “chuỗi H kiểu đại” được viết tắt là H(WT) (trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9), và thuật ngữ “chuỗi L kiểu đại” được viết tắt là L(WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO. 10). Trong trường hợp này, các đột biến được đưa vào trình tự khung và trình tự CDRa của kháng thể PM1 của chuột nhắt được làm giống như của người được mô tả trong ấn phẩm Cancer Res. 1993, Feb. 15; 53(4): 851-6, để tạo ra các chuỗi H được cải biến H53 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 1) và PF1H (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 11), và các chuỗi L được cải biến L28 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 12) và PF1L (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 2). Cụ thể hơn các thể đột biến được tạo ra bằng cách sử dụng bộ kit gây đột biến định hướng điểm QuikChange (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)) theo phương pháp được mô tả trong hướng dẫn đi kèm, và các đoạn plasmit thu được được cài vào vectơ biểu hiện tế bào động vật có vú để sản xuất các vectơ biểu hiện chuỗi H và các vectơ biểu hiện chuỗi L mong muốn. Trình tự

nucleotit của các vectơ biểu hiện thu được được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Biểu hiện và tinh chế kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người

Kháng thể này được biểu hiện bằng phương pháp được mô tả dưới đây. Dòng tế bào HEK293H thu được từ tế bào ung thư thận phôi người (Invitrogen) được tạo hỗn dịch trong môi trường DMEM (Invitrogen) có bổ sung 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen). Các tế bào này được dàn lên đĩa với thể tích 10ml/đĩa trong các đĩa để kết dính các tế bào (có đường kính 10cm; CORNING) với mật độ tế bào từ 5×10^5 đến 6×10^5 tế bào/ml và được nuôi cấy trong thiết bị ủ CO_2 (37°C , 5% CO_2) trong cả một ngày đêm. Tiếp theo, môi trường được loại bỏ bằng cách hút, và 6,9ml môi trường CHO-S-SFM-II (Invitrogen) được bổ sung vào. Plasmit thu được được đưa vào tế bào bằng phương pháp biến nạp lipid. Dịch nổi nuôi cấy thu được được thu gom, ly tâm (khoảng 2000g, 5 phút, nhiệt độ trong phòng) để loại bỏ tế bào, và vô trùng bằng cách lọc qua bộ lọc 0,22 μm MILLEX®-GV (Millipore) để thu dịch nổi. Kháng thể được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy thu được này bằng phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Để xác định nồng độ kháng thể đã tinh chế, độ hấp thụ được đo ở bước sóng 280nm bằng cách sử dụng quang phổ kế. Nồng độ kháng thể được tính từ các trị số đã xác định bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ tính được bằng phương pháp PACE (Protein Science 1995; 4:2411-2423).

Ví dụ 2: Sản xuất kháng thể H3pI/L73 sự liên kết phụ thuộc vào độ pH

Phương pháp tạo kháng thể có khả năng trung hòa kháng nguyên nhiều lần

Do các phân tử IgG có hóa trị hai, nên phân tử IgG đơn có thể trung hòa lên tới hai kháng nguyên khi hai vị trí này liên kết với kháng nguyên; tuy nhiên, nó không thể trung hòa ba kháng nguyên hoặc nhiều hơn. Do đó, để duy trì tác dụng trung hòa của kháng thể trung hòa trong khoảng thời gian xác định, thì cần sử dụng lượng kháng thể bằng hoặc lớn hơn lượng kháng nguyên được tạo ra trong khoảng thời gian này. Do đó,

nếu có thể trung hòa hai hoặc nhiều phân tử kháng nguyên bằng phân tử IgG đơn thì liều này có thể cải thiện khoảng thời gian tác dụng trung hòa, hoặc theo cách khác liều kháng thể cần để đạt được khoảng thời gian này có thể giảm.

Đối với kháng thể trung hòa, có hai loại kháng nguyên đích: kháng nguyên kiểu hòa tan, kháng nguyên này có trong huyết tương, và kháng nguyên được liên kết màng, kháng nguyên này được biểu hiện trên bề mặt của tế bào.

Khi kháng nguyên là kháng nguyên liên kết màng, kháng thể đã sử dụng sẽ liên kết với kháng nguyên màng này trên bề mặt tế bào, và kháng thể này sau đó được hấp thụ vào thể nhân bên trong tế bào bằng cách nội hóa cùng với kháng nguyên màng đã được liên kết với kháng thể. Tiếp theo, kháng thể vẫn còn liên kết với kháng nguyên sẽ chuyển tới lysosom tại đó nó bị phân hủy lysosom bởi cùng với kháng nguyên. Việc loại bỏ kháng thể ra khỏi huyết tương được trung gian bởi sự nội hóa bởi kháng nguyên màng được gọi là sự loại bỏ phụ thuộc kháng nguyên, và điều này được báo cáo đối với nhiều phân tử kháng thể (Drug Discov. Today, 2006 Jan; 11(1-2): 81-8). Do phân tử kháng thể IgG đơn liên kết với hai phân tử kháng nguyên khi nó liên kết hóa trị hai với các kháng nguyên, và tiếp theo được nội hóa và được phân hủy trực tiếp bởi lysosom, kháng thể IgG đơn bình thường không thể trung hòa hai hoặc nhiều phân tử kháng nguyên (Fig. 1).

Lý do có sự kéo dài thời gian lưu (sự loại bỏ chậm) của các phân tử IgG trong huyết tương là ở các chức năng của FcRn, còn được gọi là thụ thể thu hồi phân tử IgG (Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep; 7(9): 715-25). Các phân tử IgG đã được hấp thụ vào thể nhân bằng quá trình ẩm bào sẽ liên kết với FcRn được biểu hiện trong thể nhân trong điều kiện axit nội thể nhân. Các phân tử IgG đã liên kết với FcRn sẽ chuyển đến bề mặt tế bào tại đó chúng phân ly ra khỏi FcRn trong điều kiện trung tính trong huyết tương và quay trở lại huyết tương, trong khi các phân tử IgG không thể liên kết với FcRn sẽ tiếp tục đi vào lysosom tại đó chúng bị phân hủy (Fig. 2).

Các phân tử IgG đã liên kết với kháng nguyên màng được hấp thụ vào thể nhân nội bào bằng quá trình nội hóa, chuyển vào lysosom trong khi được liên kết với kháng nguyên, và trải qua quá trình phân hủy. Khi kháng thể IgG liên kết hóa trị hai với các

kháng nguyên, nó trung hòa hai phân tử kháng nguyên và trải qua quá trình phân hủy cùng với các kháng nguyên này. Nếu kháng thể IgG, khi được hấp thụ vào thể nhân nội bào bằng quá trình nội hóa, có thể phân ly ra khỏi kháng nguyên trong điều kiện axit nội thể nhân, thì kháng thể đã phân ly có thể liên kết với FcRn được biểu hiện trong thể nhân. Phân tử IgG đã được phân ly ra khỏi kháng nguyên và được liên kết với FcRn sẽ được chuyển tới bề mặt tế bào và tiếp theo được phân ly ra khỏi FcRn trong điều kiện trung tính trong huyết tương, do đó quay trở lại huyết tương. Phân tử IgG đã quay trở lại huyết tương có thể lại liên kết với kháng nguyên màng mới. Việc lặp lại quá trình này cho phép phân tử IgG đơn liên kết lặp lại với các kháng nguyên màng, nhờ đó cho phép trung hòa nhiều kháng nguyên bằng phân tử IgG đơn (Fig. 3).

Trong trường hợp kháng nguyên hòa tan, kháng thể được sử dụng để liên kết với kháng nguyên này trong huyết tương, và vẫn ở trong huyết tương ở dạng phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Bình thường, trong khi thời gian lưu của kháng thể trong huyết tương là rất dài (tốc độ loại bỏ rất chậm) do chức năng của FcRn như được mô tả ở trên, thời gian lưu của kháng nguyên trong huyết tương là ngắn (tốc độ loại bỏ nhanh). Do đó, các kháng nguyên đã được liên kết với kháng thể có thời gian lưu trong huyết tương tương đương với thời gian lưu của kháng thể (tốc độ loại bỏ rất chậm). Các kháng nguyên được sản xuất trong cơ thể với tốc độ không đổi và, khi không có mặt kháng thể, có mặt trong huyết tương ở nồng độ tại đó tốc độ sản xuất kháng nguyên và tốc độ loại bỏ kháng nguyên là tương đương. Khi có mặt kháng thể, hầu hết các kháng nguyên đều được liên kết với kháng thể, dẫn đến việc loại bỏ rất chậm các kháng nguyên. Do đó, nồng độ kháng nguyên trong huyết tương tăng lên so với nồng độ kháng nguyên khi không có mặt kháng thể (Kidney Int. 2003, 64, 697-703; J. National Cancer Institute 2002, 94(19), 1484-1493; J. Allergy and Clinical Immunology 1997, 100(1), 110-121; Eur. J. Immunol. 1993, 23; 2026-2029). Ngay cả khi ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên là vô hạn, thì nồng độ kháng nguyên sẽ tăng cao khi kháng thể được loại bỏ chậm ra khỏi huyết tương, và tác dụng trung hòa của kháng thể kết thúc sau khi nồng độ kháng thể và kháng nguyên trở nên bằng nhau. Mặc dù các kháng thể có hằng số phân ly (KD) cao hơn có thể trung hòa các kháng nguyên hòa tan ở nồng độ kháng thể thấp hơn,

các kháng thể có nồng độ bằng một nửa hoặc ít hơn nồng độ kháng nguyên có mặt không thể trung hòa các kháng nguyên bất kể ái lực của kháng thể mạnh ở mức nào (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005 Sep 9; 334(4): 1004-13). Như trong trường hợp các phân tử IgG không được liên kết với kháng nguyên, các phân tử IgG được liên kết với kháng nguyên trong huyết tương cũng được hấp thụ vào thể nhân bằng quá trình ẩm bào, và liên kết với FcRn được biểu hiện trong thể nhân trong điều kiện axit nội thể nhân. Các phân tử IgG được liên kết với FcRn di chuyển tới bề mặt tế bào trong khi kháng thể này vẫn được liên kết với kháng nguyên và tiếp theo phân ly ra khỏi FcRn trong điều kiện trung tính trong huyết tương. Do các phân tử IgG quay trở lại huyết tương trong khi vẫn được liên kết với kháng nguyên, nên chúng không thể liên kết với các kháng nguyên mới trong huyết tương. Trong trường hợp này, nếu các phân tử IgG có thể phân ly ra khỏi kháng nguyên trong điều kiện axit nội thể nhân thì kháng nguyên đã được phân ly sẽ không thể liên kết với FcRn và do đó có thể bị phân hủy trong lysosom. Mặt khác, các phân tử IgG có thể quay trở lại huyết tương bằng cách liên kết với FcRn. Do các phân tử IgG quay trở lại huyết tương đã phân ly ra khỏi kháng nguyên trong thể nhân nên chúng có thể liên kết với kháng nguyên mới trong huyết tương. Việc lặp lại quá trình này cho phép phân tử IgG đơn liên kết lặp lại với các kháng nguyên hòa tan. Điều này cho phép phân tử IgG đơn trung hòa nhiều kháng nguyên (Fig. 4).

Do đó, bất kể kháng nguyên màng hay kháng nguyên hòa tan, nếu việc phân ly kháng thể IgG ra khỏi kháng nguyên có thể xảy ra trong điều kiện axit nội thể nhân, thì phân tử IgG đơn có thể trung hòa lặp lại các kháng nguyên. Để kháng thể IgG phân ly ra khỏi kháng nguyên trong điều kiện axit nội thể nhân, sự liên kết kháng nguyên-kháng thể cần phải yếu hơn đáng kể trong điều kiện axit so với trong điều kiện trung tính. Do kháng nguyên màng trên bề mặt tế bào cần được trung hòa, kháng thể phải liên kết mạnh với kháng nguyên ở độ pH bề mặt tế bào, tức là độ pH=7,4. Do độ pH nội thể nhân đã được báo cáo là thường nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 (Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2004 Feb; 5(2): 121-32), nên kháng thể liên kết yếu với kháng nguyên ở độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0 được coi là phân ly ra khỏi kháng nguyên trong điều kiện axit nội thể nhân. Cụ thể hơn, phân tử IgG đơn liên kết mạnh với kháng thể ở độ pH bề

mặt tế bào (7,4) và liên kết yếu với kháng nguyên ở độ pH nội thể nhân (nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0) có thể trung hòa nhiều kháng nguyên và do đó cải thiện được động học.

Nói chung, các tương tác protein-protein gồm tương tác kỵ nước, tương tác tĩnh điện và liên kết hydro, và cường độ liên kết thường được thể hiện dưới dạng hằng số liên kết (ái lực) hoặc hằng số liên kết biểu kiến (ái tính). Sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, mà cường độ liên kết của nó thay đổi giữa điều kiện trung tính (độ pH=7,4) và điều kiện axit (độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0), có mặt trong các tương tác protein-protein có trong tự nhiên. Ví dụ, liên kết đề cập ở trên giữa các phân tử IgG và FcRn được biết là thụ thể thu hồi đối với các phân tử IgG là mạnh trong điều kiện axit (độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0) nhưng rất yếu trong điều kiện trung tính (độ pH=7,4). Hầu hết các tương tác protein-protein thay đổi theo độ pH này đều liên quan đến các gốc histidin. Do độ pKa của gốc histidin là ở gần độ pH nằm trong khoảng từ 6,0 đến 6,5 nên trạng thái phân ly proton của các gốc histidin thay đổi nằm trong khoảng từ điều kiện trung tính (độ pH=7,4) và điều kiện axit (độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Cụ thể, các gốc histidin không tích điện và hoạt động dưới dạng thể nhận nguyên tử hydro trong điều kiện trung tính (độ pH=7,4), khi chúng trở nên tích điện dương và hoạt động dưới dạng thể cho nguyên tử hydro trong điều kiện axit (độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Đã được báo cáo rằng liên kết phụ thuộc vào độ pH của tương tác IgG-FcRn được mô tả ở trên cũng liên quan đến các gốc histidin có mặt trong IgG (Mol. Cell. 2001 Apr; 7(4): 867-77).

Do đó, sự phụ thuộc vào độ pH có thể ảnh hưởng đến các tương tác protein-protein bằng cách thay thế gốc axit amin liên quan đến các tương tác protein-protein bằng gốc histidin, hoặc bằng cách đưa gốc histidin vào vị trí tương tác. Các nỗ lực này cũng đã được thực hiện ở các tương tác protein-protein giữa kháng thể và kháng nguyên, và kháng thể đột biến có khả năng liên kết với kháng nguyên giảm trong điều kiện axit đã thu được thành công bằng cách đưa histidin vào trình tự CDR của kháng thể kháng lysozym trong lòng trắng trứng (FEBS Letter (vol. 309, No. 1, 85-88, 1992)). Ngoài ra, kháng thể tạo ra được bằng cách đưa histidin vào trình tự CDR và liên

kết đặc hiệu với kháng nguyên ở độ pH thấp của mô ung thư nhưng liên kết yếu trong điều kiện trung tính đã được báo cáo (WO 2003-105757).

Mặc dù phương pháp đưa sự phụ thuộc vào độ pH vào các phản ứng kháng thể-kháng nguyên đã được báo cáo như được mô tả ở trên, nhưng phân tử IgG trung hòa nhiều kháng nguyên bằng cách liên kết mạnh với các kháng nguyên ở độ pH dịch thể (7,4) nhưng liên kết yếu với các kháng nguyên ở độ pH nội thể nhân (nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0) chưa được báo cáo. Nói cách khác, chưa có báo cáo bất kỳ liên quan đến các cải biến làm giảm đáng kể sự liên kết trong điều kiện axit mà vẫn giữ được sự liên kết trong điều kiện trung tính như vậy, so với kháng thể không được cải biến, kháng thể được cải biến liên kết với kháng nguyên nhiều lần *in vivo* và do đó thể hiện được động học được cải thiện cũng như thời gian tác dụng trung hòa được cải thiện ở liều tương tự.

Thụ thể IL-6 có mặt trong cơ thể ở dạng thụ thể IL-6 hòa tan hoặc thụ thể IL-6 kiểu màng (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2006 Nov; 2(11): 619-26). Kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết với cả thụ thể IL-6 hòa tan và thụ thể IL-6 kiểu màng, và trung hòa tác dụng sinh học của chúng. Xét thấy rằng sau khi liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng, kháng thể kháng thụ thể IL-6 được hấp thụ vào thể nhân nội bào bằng quá trình nội hóa trong khi được liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng, tiếp theo di chuyển vào lysosom trong khi kháng thể này vẫn được liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng, và trải qua quá trình phân hủy bởi lysosom cùng với thụ thể IL-6 kiểu màng. Thực tế, đã được báo cáo rằng kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người biểu hiện mức thanh thải không tuyến tính, và việc loại bỏ phụ thuộc vào kháng nguyên của nó góp phần lớn vào việc loại bỏ kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người (The Journal of Rheumatology, 2003, 30; 71426-1435). Do đó, một kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người liên kết với một hoặc hai thụ thể IL-6 kiểu màng (hóa trị một hoặc hóa trị hai), và tiếp theo được nội hóa và phân hủy trong lysosom. Do đó, có thể sản xuất kháng thể được cải biến có khả năng liên kết giảm đáng kể trong điều kiện axit nhưng vẫn giữ được khả năng liên kết tương tự như kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người kiểu đại trong điều kiện trung tính (kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH), nhiều thụ thể IL-6 có thể được trung hòa

bằng kháng thể đơn kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người. Do đó, so với kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người kiểu đại, kháng thể kháng thụ thể IL-6 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH có thể cải thiện khoảng thời gian tác dụng trung hòa *in vivo* ở cùng liều.

Sản xuất kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người liên kết phụ thuộc vào độ pH (H3pI/L73)

Việc đưa histidin vào CDR đã được báo cáo là phương pháp đưa sự liên kết phụ thuộc vào độ pH vào phản ứng kháng nguyên-kháng thể (FEBS Letter (vol. 309, No. 1, 85-88, 1992)). Để tìm các gốc axit amin lộ ra trên bề mặt vùng biến đổi của H53/PF1L được sản xuất trong Ví dụ 1 và các gốc có thể có tương tác với kháng nguyên, mô hình vùng Fv của H53/PF1L đã được tạo ra bằng cách lập mô hình tương đồng bằng cách sử dụng phần mềm MOE (Chemical Computing Group Inc.). Mô hình ba chiều được tạo cấu trúc dựa trên thông tin trình tự của H53/PF1L được sử dụng để lựa chọn H27, H31, H35, L28, L32 và L53 (Kabat numbering, Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH) làm các vị trí đột biến có thể tạo ra sự liên kết phụ thuộc vào độ pH bằng cách đưa histidin vào. Sản phẩm trong đó các gốc ở H27, H31 và H35 trong H53 được sản xuất trong Ví dụ 1 được thay thế bằng các histidin được ký hiệu là H3pI (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 3), và sản phẩm trong đó các gốc ở L28, L32 và L53 trong PF1L được sản xuất trong Ví dụ 1 được thay thế bằng các histidin được ký hiệu là L73 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 6).

Sản xuất, biểu hiện và tinh chế vector biểu hiện H3pI/L73

Việc cải biến axit amin được thực hiện để tạo ra kháng thể được cải biến ở các vị trí đã chọn. Các đột biến được đưa vào H53 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 13) và PF1L (trình tự nucleotit: SEQ ID NO: 14) được sản xuất trong ví dụ 1 để tạo ra H3pI (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 3) và L73 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 6). Cụ thể, bộ kit gây đột biến định hướng điểm QuikChange (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)) được sử dụng theo phương pháp được mô tả trong hướng dẫn đi kèm, và các mảnh plasmid thu được được cài vào vector biểu hiện tế bào động vật có vú để tạo ra vector biểu hiện chuỗi H và vector biểu hiện chuỗi L mong muốn. Trình tự

nucleotit của các vector biểu hiện thu được được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này H3pI/L73 sử dụng H3pI đối với chuỗi H và L73 đối với chuỗi L được biểu hiện và tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1.

Ví dụ 3: Tạo khả năng liên kết với kháng nguyên phụ thuộc vào độ pH bằng cải biến His ở CDR bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn

Sản xuất phân tử scFv của kháng thể PM1 được làm giống như của người

Kháng thể PM1 được làm giống như của người, là kháng thể kháng IL-6R được làm giống như của người (Cancer Res. 1993 Feb 15; 53(4): 851-6), được biến đổi thành scFv. Các vùng VH và VL được khuếch đại bằng PCR, và HL scFv của PM1 được làm giống như của người có trình tự liên kết GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 15) giữa VH và VL được sản xuất.

Lựa chọn vị trí có thể đưa histidin vào bằng phương pháp quét histidin

PCR được thực hiện bằng cách sử dụng ADN mã hóa HL scFv của PM1 đã làm giống như của người được tạo ra làm khuôn để sản xuất thư viện histidin trong đó axit amin bất kỳ trong số các axit amin CDR được thay thế bằng histidin. Các phần thư viện này được tạo cấu trúc bằng PCR có sử dụng các đoạn môi trong đó codon của axit amin cần được đột biến để có thư viện này được thay thế bằng CAT, một codon tương ứng với histidin, và các phần khác được tạo cấu trúc bằng PCR bình thường. Tiếp theo, các phần này được liên kết với nhau bằng PCR ghép. Thư viện đã cấu trúc được này được cắt bằng SfiI, cài vào vector phagemit pELBG lacI cũng đã được cắt bằng SfiI, và tiếp theo được sử dụng để biến nạp XL1-Blue (Stratagene). Các khuẩn lạc thu được được sử dụng để đánh giá sự liên kết với kháng nguyên bằng ELISA đối với thể thực khuẩn và phân tích trình tự của HL scFv. ELISA thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách sử dụng tấm có phủ SR344 ở 1µg/mL theo J. Mol. Biol. 1992; 227: 381-388. Các dòng vô tính được phát hiện liên kết với SR344 được sử dụng để phân tích trình tự bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu.

Hiệu giá thể thực khuẩn được xác định bằng ELISA với kháng thể kháng Etg (GE Healthcare) và kháng thể kháng M13 (GE Healthcare). Tiếp theo, trị số này được sử

dụng để chọn các vị trí nơi mà việc thay thế gốc CDR bằng histidin không làm biến đổi đáng kể khả năng liên kết so với HL scFv của PM1 được làm giống như của người, dựa trên kết quả ELISA thể thực khuẩn đối với SR344. Các vị trí chọn được được thể hiện trong Bảng 2. Việc đánh số mỗi gốc là theo cách đánh số Kabat (Kabat, et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Bảng 2: Các vị trí thay thế histidin không ảnh hưởng đáng kể đến ái tính liên kết

H31, H50, H54, H56, H57, H58, H59, H60, H61, H62, H63, H64, H65, H100a, H100b, H102
L24, L26, L27, L28, L30, L31, L32, L52, L53, L54, L56, L90, L92, L93, L94

Cấu trúc của thư viện CDR được cải biến bằng histidin

Thư viện được thiết kế trong đó các axit amin của các gốc CDR không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng liên kết khi được thay thế bằng histidin như được thể hiện trong Bảng 2 (các vị trí có thể đưa histidin vào) là trình tự ban đầu của chúng (trình tự kiểu đại) hoặc histidin. Thư viện này được tạo cấu trúc dựa trên các trình tự của PF1H của chuỗi H và PF1L của chuỗi L được sản xuất trong Ví dụ 1 sao cho các vị trí đã đột biến đối với thư viện này có trình tự ban đầu hoặc histidin.

Các phần thư viện này được tạo cấu trúc bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế sao cho vị trí cần đột biến để có thư viện này có codon axit amin ban đầu hoặc codon histidin, và các phần khác được tạo ra bằng PCR bình thường, hoặc bằng PCR có sử dụng các đoạn mồi tổng hợp như trong các phần thư viện này. Tiếp theo, các phần này được liên kết với nhau bằng PCR ghép (J. Mol. Biol. 1996; 256: 77-88).

Thư viện này được sử dụng để tạo cấu trúc thư viện biểu lộ ribosom theo J. Immunological Methods 1999; 231: 119-135. Để thực hiện việc dịch mã *in vitro* không chứa tế bào *Escherichia coli*, trình tự SDA (vị trí liên kết ribosom) và gen khởi đầu của T7 được bổ sung vào phía đầu 5', và một phần trình tự gene3 đóng vai trò trình tự liên kết đối với sự biểu lộ ribosom được gắn vào phía đầu 3' bằng cách sử dụng SfiI.

Thu được scFv có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH từ thư viện bằng phương pháp đãi hạt

Để thu được duy nhất scFv có khả năng liên kết với SR344, việc đã được thực hiện hai lần bằng cách sử dụng phương pháp biểu lộ ribosom theo Nature Biotechnology 2000 Dec; 18: 1287-1292. SR344 được tạo ra được biotin hóa bằng cách sử dụng NHS-PEO4-Biotin (Pierce) để thu kháng nguyên. Việc đã được thực hiện bằng cách sử dụng 40nM kháng nguyên đã được biotin hóa.

Bằng cách sử dụng hỗn hợp ADN thu được làm khuôn, HL scFv được phục hồi bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu. Sau khi cắt bằng SfiI, HL scFv đã cắt được cài vào vector phagemit pELBG lacI cũng đã được cắt bằng SfiI, và tiếp theo được sử dụng để biến nạp XL1-Blue (Stratagene).

Các tế bào *Escherichia coli* mang plasmit mong muốn được sinh trưởng tới mật độ nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,6 O.D./mL trong môi trường 2YT chứa 100µg/mL ampicilin và 2% glucoza. Thể thực khuẩn giúp đỡ (M13KO7, $4,5 \times 10^{11}$ pfu) được bổ sung vào, nuôi cấy tĩnh trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C, và tiếp theo nuôi cấy lắc trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Môi trường nuôi cấy này được chuyển sang ống Falcon có dung tích 50mL, ly tâm trong thời gian 10 phút ở tốc độ 3000vòng/phút, được tạo hỗn dịch lại trong môi trường 2YT chứa 100µg/mL ampicilin, 25µg/mL kanamycin và 0,5mM IPTG, và tiếp theo ủ qua đêm ở nhiệt độ 30°C.

Môi trường nuôi cấy đã ủ qua đêm được kết tủa bằng dung dịch NaCl 2,5M và 10% PEG, và tiếp theo pha loãng bằng PBS để thu được dung dịch thư viện thể thực khuẩn. M-PBS 10% (PBS chứa 10% sữa không kem) và Tris-HCl 1M được bổ sung vào dung dịch thư viện thể thực khuẩn tới nồng độ cuối cùng bằng 2,5% M-PBS và độ pH=7,4. Việc gạn được thực hiện bằng phương pháp gạn thông thường bằng cách sử dụng kháng nguyên đã được cố định trên các hạt từ tính (J. Immunol. Methods 2008 Mar 20; 332(1-2): 2-9; J. Immunol. Methods 2001 Jan 1; 247(1-2): 191-203; Biotechnol. Prog. 2002 Mar-Apr; 18(2): 212-20). Cụ thể hơn, 40pmol SR344 đã đánh dấu biotin được bổ sung vào thư viện thể thực khuẩn đã tạo ra và thư viện này được tiếp xúc với kháng nguyên trong thời gian 60 phút ở nhiệt độ 37°C. Các hạt đã phủ Streptavidin (Dynal M-280) được rửa bằng 5% M-PBS (PBS chứa 5% sữa không kem) được bổ sung vào và để liên kết trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 37°C. Các hạt được rửa 5 lần cả

bằng 0,5mL PBST (PBS chứa 0,1% Tween-20, độ pH=7,4) và PBS (độ pH=7,4). Tiếp theo, các hạt này được tạo hỗn dịch trong 1mL PBS (độ pH=5,5) ở nhiệt độ 37°C, và thể thực khuẩn được thu hồi ngay. Dung dịch thể thực khuẩn thu hồi được được bổ sung vào 10mL XL1-Blue ở pha sinh trưởng hàm số mũ (OD600 nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,5) và để trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C để gây nhiễm. *E. coli* đã gây nhiễm được cấy lên đĩa 225mm x 225mm chứa 2 YT, 100µg/mL ampicilin và 2% glucoza. *E. coli* này được sử dụng để bắt đầu nuôi cấy thể thực khuẩn bổ sung theo cách tương tự như được mô tả ở trên và lặp lại bước gạn 8 lần.

Đánh giá bằng ELISA thể thực khuẩn

Các khuẩn lạc đơn trên đây được cấy vào 100µL 2YT, 100µg/mL ampicilin, 2% glucoza và 12,5µg/mL tetracyclin và nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 30°C. 2µL môi trường nuôi cấy này được cấy vào 300µL 2YT, 100µg/mL ampicilin và 2% glucoza, và tiếp theo nuôi cấy trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 37°C. Thể thực khuẩn giúp đỡ (M13KO7) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy này ở mật độ 9×10^8 pfu, để trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C và tiếp theo lắc trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C để gây nhiễm. Tiếp theo, môi trường được thay bằng 300µL 2 YT, 100µg/mL ampicilin, 25µg/mL kanamycin và 0,5mM IPTG. Sau khi nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 30°C, dịch nổi đã ly tâm được thu hồi. 360µL PBS 50mM (độ pH=7,4) được bổ sung vào 40µL dịch nổi đã ly tâm và dùng để phân tích ELISA. Tám vi chuẩn độ loại 96 lỗ StreptaWell (Roche) được phủ qua đêm bằng 100µL PBS chứa 62,5ng/mL SR344 đã đánh dấu biotin. Sau khi loại bỏ kháng nguyên bằng cách rửa bằng PBST, việc phong bế được thực hiện bằng 250µL BSA-PBS 2% trong thời gian 1 giờ hoặc lâu hơn. Sau khi loại bỏ BSA-PBS 2%, dịch nổi nuôi cấy bào chế được được bổ sung vào và để trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C để liên kết với kháng thể. Sau khi rửa, PBS 50mM (độ pH=7,4) hoặc PBS 50mM (độ pH=5,5) được bổ sung vào và ủ bằng cách để trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau khi rửa, việc phát hiện được thực hiện bằng kháng thể kháng M13 liên hợp với HRP (Amersham Pharmacia Biotech) được pha loãng bằng BSA-PBS 2% và dung dịch đơn TMB (Zymed), tiếp theo bổ sung axit sulfuric vào để làm dừng phản ứng, và đo độ hấp thụ ở bước sóng 450nm.

Tuy nhiên, không thu được dòng vô tính bất kỳ biểu hiện khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH bằng phương pháp gạn này bằng cách sử dụng kháng nguyên được cố định trên các hạt từ tính. Các dòng vô tính được phát hiện có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH yếu được phân tích trình tự bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu. Các vị trí ở các dòng này nơi histidin có mặt với tỷ lệ cao được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3: Các vị trí thay thế histidin được phát hiện bằng cách sử dụng thư viện thể thực khuẩn (đãi hạt từ tính)

H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H102
L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94

Thu được scFv có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH từ thư viện bằng phương pháp đãi cột

Không thu được dòng vô tính bất kỳ có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH mạnh bằng phương pháp đãi thông thường có sử dụng kháng nguyên được cố định trên hạt từ tính. Điều này có thể là do các lý do sau. Trong phương pháp đãi có sử dụng kháng nguyên được cố định trên các hạt từ tính hoặc tấm, tất cả các thể thực khuẩn phân ly ra khỏi các hạt từ tính hoặc tấm trong điều kiện axit đều được thu gom. Do đó, các dòng thể thực khuẩn có sự phụ thuộc vào độ pH yếu thu hồi được đều làm giảm khả năng các dòng vô tính có sự phụ thuộc vào độ pH mạnh có được trong các dòng được tạo ra cuối cùng.

Do đó, phương pháp đãi có sử dụng cột được cố định kháng nguyên được kiểm tra dưới dạng phương pháp đãi nghiêm ngặt hơn (Fig. 5). Trước đó, chưa có báo cáo bất kỳ về việc tạo ra các dòng có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH bằng cách sử dụng phương pháp đãi với cột được cố định kháng nguyên. Trong phương pháp đãi với cột được cố định kháng nguyên, khi các thể thực khuẩn đã được liên kết trong điều kiện trung tính được giải hấp trong điều kiện axit, các dòng có sự phụ thuộc vào độ pH yếu liên kết lại với kháng nguyên bên trong cột và do đó được giải hấp ít hơn, cho phép các dòng phụ thuộc vào độ pH mạnh liên kết lại ít hơn bên trong cột cần được giải hấp chọn lọc ra khỏi cột. Ngoài ra, mặc dù "tất cả" các thể thực khuẩn đã phân ly trong điều kiện axit đều được thu hồi bằng phương pháp đãi có sử dụng cột được cố định kháng nguyên

cho phép thu hồi chọn lọc các thể thực khuẩn có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH mạnh bằng cách cho phép dung dịch đệm axit chảy qua cột để bắt đầu giải hấp và chỉ thu hồi "các phân đoạn thích hợp".

Trước hết, cột được cố định kháng nguyên SR344 được chuẩn bị. 200 μ L Streptavidin Sepharose (GE Healthcare) được rửa bằng 1mL PBS, được tạo hỗn dịch trong 500 μ L PBS, và được tiếp xúc với 400pmol SR344 đã đánh dấu biotin trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, cột rỗng (Amersham Pharmacia Biotech) được nạp sepharozas trên đây và rửa bằng 3mL PBS. Các thể thực khuẩn trong thư viện đã được kết tủa bằng PEG trên đây được pha loãng tới 1/25 bằng BSA-PBS 0,5% (độ pH=7,4), qua bộ lọc 0,45 μ m, và tiếp theo được bổ sung vào cột. Sau khi rửa bằng 6mL PBS (độ pH=7,4), MES-NaCl 50mM (độ pH=5,5) được chảy qua cột để giải hấp các kháng thể phân ly ở độ pH thấp. Các phân đoạn giải hấp được thích hợp được thu gom, và dung dịch thể thực khuẩn thu hồi được bổ sung vào 10mL XL1-Blue ở pha sinh trưởng theo hàm số mũ (OD₆₀₀ nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,5) và để trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 37°C.

E. coli were đã gây nhiễm được cấy lên đĩa 225mm x 225mm chứa 2YT, 100 μ g/mL ampicillin và 2% glucoza. *E. coli* này được sử dụng để bắt đầu nuôi cấy thể thực khuẩn bổ sung theo cách tương tự như được mô tả ở trên và lặp lại bước gạn 6 lần. Đánh giá bằng ELISA thể thực khuẩn

Các thể thực khuẩn thu được được đánh giá bằng ELISA thể thực khuẩn. Các dòng vô tính được tìm thấy có sự phụ thuộc độ pH mạnh được phân tích trình tự bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu. Kết quả là, một số dòng vô tính biểu hiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH mạnh so với kiểu đại được thu. Như được thể hiện trên Fig. 6, dòng CL5 (chuỗi H: CLH5, chuỗi L: CLL5) (CLH5: trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5, CLL5: trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8) được phát hiện là biểu hiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH đặc biệt mạnh so với kiểu đại. Do đó, đã xác nhận được rằng các kháng thể biểu hiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH mạnh, trong khi không thể thu được bằng phương pháp đại thông thường có sử dụng kháng nguyên được cố định trên các hạt từ tính, có thể thu được bằng phương pháp đại có sử dụng cột được cố định

kháng nguyên. Do đó, phương pháp đã có sử dụng cột được cố định kháng nguyên được phát hiện là phương pháp rất hữu hiệu để thu các kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH từ thư viện. trình tự axit amin của các dòng biểu hiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH được phân tích, và các vị trí nơi histidin có mặt với tỷ lệ cao trong các dòng tạo ra được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Các vị trí thay thế histidin được phát hiện bằng thư viện thể thực khuẩn (đãi cột)

H31, H50, H58, H62, H63, H65, H100b, H102
L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94

Ví dụ 4: Biểu hiện và tính chế kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người được cải biến bằng histidin

Sản xuất, biểu hiện và tính chế vector biểu hiện kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người được cải biến bằng histidin

Để chuyển hóa các dòng vô tính biểu hiện sự phụ thuộc vào độ pH mạnh trong ELISA thể thực khuẩn thành IgG, VH và VL lần lượt được khuếch đại bằng PCR, cắt bằng XhoI/NheI và EcoRI, và cài vào vector biểu hiện tế bào động vật có vú. Trình tự nucleotit của mỗi đoạn ADN được xác định bằng phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. CLH5/L73, trong đó CLH5 được sử dụng cho chuỗi H và L73 thu được trong Ví dụ 2 được sử dụng cho chuỗi L, được biểu hiện và tính chế dưới dạng IgG. Việc biểu hiện và tính chế được thực hiện bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1.

Kháng thể có sự phụ thuộc vào độ pH thậm chí cao hơn được sản xuất bằng cách tổ hợp các vị trí đột biến. Dựa trên các vị trí nơi histidin được tạo ra trong thư viện thể thực khuẩn cũng như thông tin về cấu trúc, v.v., H32, H58, H62 và H102 trong H3pI thu được dưới dạng chuỗi H trong Ví dụ 2 được thay thế bằng histidin, và H95 và H99 cũng lần lượt được thay thế bằng valin và isoleuxin, để tạo ra H170 (SEQ ID NO: 4). Việc sản xuất thể biến dị này được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1. Ngoài ra, L82 (SEQ ID NO: 7) được sản xuất bằng cách thay thế histidin thứ 28 của L73, được tạo ra dưới dạng chuỗi L trong Ví dụ 2, bằng axit aspartic. Việc sản xuất biến thể này được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1.

H170/L82, trong đó H170 được sử dụng cho chuỗi H và L82 được sử dụng cho chuỗi L, được biểu hiện và tinh chế dưới dạng IgG bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 1.

Ví dụ 5: Đánh giá hoạt tính trung hòa IL-6R của kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH

Đánh giá hoạt tính trung hòa thụ thể IL-6 của người của các dòng vô tính đã được chuyển hóa thành IgG

Hoạt tính trung hòa thụ thể IL-6 được đánh giá đối với 4 kháng thể: kháng thể PM1 được làm giống như của người (WT) và H3pI/L73, CLH5/L73 và H170/L82 sản xuất được ở các Ví dụ 2 và 4.

Cụ thể hơn, hoạt tính trung hòa thụ thể IL-6 được đánh giá bằng cách sử dụng BaF3/gp130 biểu hiện sự sinh trưởng phụ thuộc vào IL-6/thụ thể IL-6. BaF3/gp130 được rửa 3 lần bằng môi trường RPMI1640 chứa 10% FBS, tiếp theo tạo hỗn dịch ở mật độ 5×10^4 tế bào/mL trong môi trường RPMI1640 chứa 60ng/mL interleukin-6 của người (Toray), 60ng/mL thụ thể IL-6 hòa tan tái tổ hợp của người (SR344) và 10% FBS. 50μL hỗn dịch này được phân tán vào mỗi lỗ của tấm loại 96 lỗ (Corning). Tiếp theo, kháng thể tinh chế được pha loãng bằng RPMI1640 chứa 10% FBS, và 50μL kháng thể này được trộn vào mỗi lỗ. Sau khi ủ được 3 ngày ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂, thuốc thử WST-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories) đã pha loãng 2 lần bằng PBS được bổ sung vào 20μL/lỗ, và tiếp theo đo ngay độ hấp thụ ở bước sóng 450nm (bước sóng quy chiếu: 620nm) bằng cách sử dụng Sunrise Classic (Tecan). Sau khi ủ được 2 giờ, độ hấp thụ ở bước sóng 450nm lại được đo (bước sóng quy chiếu: 620nm). Hoạt tính trung hòa thụ thể IL-6 được đánh giá dựa trên sự thay đổi độ hấp thụ sau thời gian 2 giờ. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig. 7, H3pI/L73, CLH5/L73 và H170/L82 có hoạt tính trung hòa tương đương so với kháng thể PM1 được làm giống như của người (WT).

Ví dụ 6: Phân tích Biacore đối với kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH

Phân tích sự liên kết của các dòng có sự phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 hòa tan

Việc phân tích động học của các phản ứng kháng nguyên-kháng thể ở độ pH=5,8 và 7,4 được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) đối với 4 kháng thể: kháng thể PM1 được làm giống như của người (WT) và H3pI/L73, CLH5/L73, và H170/L82 sản xuất được ở các Ví dụ 2 và 4 (dung dịch đệm: MES 10mM (độ pH=7,4 hoặc 5,8), NaCl 150mM và Tween 20 0,05%). Các kháng thể khác nhau được liên kết trên chip cảm biến đã được cố định recomb-protein A/G (Pierce) bằng phương pháp liên hợp amin. SR344 đã điều chỉnh tới nồng độ nằm trong khoảng từ 9,8 đến 400nM được tiêm vào chip này làm chất phân tích. Sự kết hợp và phân ly của các dòng có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với SR344 được ghi lại theo thời gian thực (các Fig. 8 và 9). Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Hằng số tốc độ kết hợp k_a (1/Ms) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/s) được tính bằng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)), và hằng số phân ly KD (M) được tính dựa trên các trị số này (Bảng 5). Hơn nữa, tỷ lệ ái lực ở độ pH=5,8 và 7,4 được tính cho mỗi dòng để đánh giá sự liên kết phụ thuộc vào độ pH. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C.

Theo kết quả tính tỷ lệ ái lực của độ pH=5,8 và 7,4 đối với mỗi dòng, mức liên kết phụ thuộc vào độ pH (ái lực) của H3pI/L73, H170/L82 và CLH5/L73 với SR344 lần lượt là 41 lần, 394 lần và 66 lần, mỗi kháng thể này có mức liên kết phụ thuộc vào độ pH cao hơn 15 lần so với WT.

Các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết mạnh với kháng nguyên ở độ pH huyết tương (7,4) nhưng liên kết yếu với kháng nguyên ở độ pH nội thể nhân (nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0) đã không được báo cáo. Trong nghiên cứu này, các kháng thể thu được vẫn giữ hoạt tính trung hòa sinh học tương đương với kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người (WT) và ái lực ở độ pH=7,4, nhưng có ái lực ở độ pH=5,8 được giảm tới hơn 10 lần.

Bảng 5: So sánh sự liên kết của các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH được định hướng kháng SR344 đối với thụ thể IL-6 hòa tan

	pH=7,4			pH=5,8			KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	
WT	5,1E+05	1,0E-03	2,1E-09	7,6E-05	3,8E-03	5,0E-09	2,4
H3pl/L73	5,4E+05	7,4E-04	1,4E-09	1,7E-05	9,7E-03	5,7E-08	41,3
H170/L82	6,8E+05	1,1E-03	1,6E-09	2,6E-04	1,7E-02	6,4E-07	393,5
CLH5/L73	7,1E+05	7,9E-04	1,1E-09	3,8E-05	2,8E-02	7,4E-08	66,1

Phân tích sự liên kết của các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH đối với thụ thể IL-6 kiểu màng.

Các phản ứng kháng nguyên-kháng thể với thụ thể IL-6 kiểu màng ở độ pH=5,8 và pH=7,4 được ghi nhận đối với các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH đã tạo ra ở trên, bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare). Sự liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng được đánh giá bằng cách đánh giá sự liên kết với thụ thể IL-6 được cố định trên chip cảm biến. SR344 được biotin hóa bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và SR344 đã biotin hóa này được cố định trên chip cảm biến thông qua streptavidin bằng cách sử dụng ái lực giữa streptavidin và biotin. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C, và dung dịch đệm pha động chứa MES 10mM (độ pH=5,8), NaCl 150mM và Tween 20 0,05%. Các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH được tiêm vào đó trong điều kiện độ pH=7,4 và cho liên kết với SR344 (dung dịch đệm mẫu tiêm: MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM, Tween 20 0,05%), và sự phân ly phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng vô tính ở độ pH pha động (5,8) được quan sát (Fig. 10).

Tốc độ phân ly ($k_d(1/s)$) ở độ pH=5,8 được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)) bằng cách chỉ cần chỉnh tới pha phân ly ở độ pH=5,8, tại đó 0,5µg/mL mẫu được liên kết trong MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM, và Tween 20 0,05%, và được phân ly trong MES 10mM (độ pH=5,8), NaCl 150mM và Tween 20 0,05%. Tương tự, tốc độ phân ly ($k_d(1/s)$) ở độ pH=7,4 được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)) bằng cách chỉ cần chỉnh tới

pH=7,4), NaCl 150mM, và Tween 20 0,05%, và được phân ly trong MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM và Tween 20 0,05%. Hằng số tốc độ phân ly phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng vô tính được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6: So sánh hằng số tốc độ phân ly của các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH kháng lại SR344 ra khỏi thụ thể IL-6 kiểu màng

	Kd(1/s)		Tỷ lệ kd
	pH=7,4	pH=5,8	pH=5,8/pH=7,4
WT	4,84E-04	7,15E-04	1,5
H3pl/L73	3,44E-04	3,78E-03	11,0
H170/L82	7,70E-04	1,44E-03	1,9
CLH5/L73	1,04E-03	5,67E-03	5,5

Sự phụ thuộc vào độ pH cao nhất của tỷ lệ phân ly được ghi nhận ở H3pl/L73 tiếp theo CLH5/L73 và H170/L82 theo thứ tự giảm dần, và mỗi dòng vô tính được chứng minh có sự phân ly phụ thuộc vào độ pH ra khỏi thụ thể IL-6 kiểu màng cao hơn so với WT. Tuy nhiên, mức độ kết hợp/phân ly phụ thuộc vào độ pH là khác nhau giữa thụ thể IL-6 hòa tan và thụ thể IL-6 kiểu màng. Đã phát hiện thấy rằng H170/L82, kháng thể này có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH cao nhất trong phép phân tích về sự liên kết với thụ thể IL-6 hòa tan, có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH thấp nhất trong phép phân tích về sự liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng. Nói chung, biết rằng trong khi các phân tử IgG liên kết đơn trị với kháng nguyên hòa tan (ái lực), chúng liên kết hóa trị hai với các kháng nguyên màng (ái tính). Điều này đề xuất rằng sự khác biệt về kiểu liên kết giữa kháng nguyên hòa tan và kháng nguyên màng đã ảnh hưởng tới sự liên kết phụ thuộc vào độ pH của H170/L82.

Ví dụ 7: Xác nhận sự đa liên kết với kháng nguyên bởi kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH

Như được mô tả trong ví dụ 2, các kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH có khả năng liên kết với kháng nguyên nhiều lần. Cụ thể, kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH mà đã liên kết với kháng nguyên được hấp thụ không đặc hiệu vào thể nhân, nhưng được phân ly khỏi kháng nguyên hòa tan trong điều kiện axit nội thể nhân. Kháng thể

lại huyết tương không được liên kết với kháng nguyên, nên kháng thể này có thể liên kết lại với một kháng nguyên mới. Việc lặp lại quy trình này có khả năng làm cho kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH liên kết với kháng nguyên nhiều lần. Tuy nhiên, đối với các kháng thể IgG mà không có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH, thì không phải tất cả các kháng nguyên đều được phân ly khỏi kháng thể trong điều kiện axit nội thể nhân. Do đó, các kháng thể như vậy được quay trở lại huyết tương bằng FcRn còn lại được liên kết với kháng nguyên, và do đó không thể liên kết với các kháng nguyên mới. Do đó, trong hầu hết các trường hợp, mỗi phân tử đơn của các kháng thể IgG chỉ có khả năng trung hòa hai kháng nguyên (trong trường hợp liên kết hóa trị hai).

Do đó, các tác giả sáng chế đã đánh giá xem liệu ba kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH (H3pI/L73, CLH5/L73 và H170/L82) được tạo cấu trúc trong các Ví dụ 2 và 4 có khả năng liên kết với kháng nguyên SR344 nhiều lần so với kháng thể PM1 được làm giống như của người (kiểu đại, WT) hay không.

Biacore (GE Healthcare) được sử dụng để đánh giá các kháng thể liên kết ở độ pH=7,4 và phân ly ở độ pH=5,8 có khả năng liên kết với kháng nguyên nhiều lần. Kháng thể này cần được đánh giá được liên kết với chip cảm biến đã cố định protein tái tổ hợp A/G (Pierce) (recomb-protein A/G (Pierce)) bằng phương pháp liên hợp amin, và pha động có độ pH=7,4 được cho phép chảy qua (bước 1). Dung dịch SR344 được điều chỉnh tới độ pH=7,4 sau đó được chảy dưới dạng chất phân tích để liên kết SR344 với kháng thể ở độ pH=7,4 (bước 2). Việc liên kết này ở độ pH=7,4 mô phỏng sự liên kết với kháng nguyên trong huyết tương. Tiếp theo, riêng dung dịch đệm (không chứa SR344) được điều chỉnh tới độ pH=5,8 được bổ sung dưới dạng chất phân tích để cho kháng nguyên đã được liên kết với kháng thể được tiếp xúc với các điều kiện axit (bước 3). Việc phân ly này ở độ pH=5,8 mô phỏng trạng thái liên kết của các phức hợp kháng nguyên-kháng thể trong thể nhân. Tiếp theo, bước 2 được lặp lại. Bước này mô phỏng sự liên kết lại của kháng thể đã quay trở lại huyết tương bằng FcRn với kháng nguyên mới. Tiếp theo, bước 2 được lặp lại để cho phức hợp kháng nguyên-kháng thể được tiếp xúc với các điều kiện axit. Việc lặp lại "từ bước 2 đến bước 3" nhiều lần ở nhiệt độ 37°C như được mô tả ở trên có thể mô phỏng trạng thái *in vivo* trong đó các kháng thể được hấp

thụ lặp lại từ huyết tương vào thể nhân bằng quá trình ảm bào và quay trở lại huyết tương bằng FcRn (Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep; 7(9): 715-25).

Các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH đã sản xuất được mô tả ở trên được phân tích bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) về khả năng liên kết với SR344 nhiều lần của chúng ở độ pH=5,8 và pH=7,4. Cụ thể hơn, việc phân tích này được thực hiện như sau. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Trước hết, các kháng thể mẫu đã mô tả ở trên được liên kết trên chip cảm biến đã cố định protein tái tổ hợp A/G (Pierce) (recomb-protein A/G (Pierce)) bằng phương pháp liên hợp amin, trong đó dung dịch đệm pha động là MES 10mM (độ pH=5,8), NaCl 150mM và Tween 20 0,05% (bước 1). SR344 đã điều chỉnh tới nồng độ bằng khoảng 40nM được tiêm vào dưới dạng chất phân tích trong thời gian 3 phút ở độ pH=7,4 và để liên kết (dung dịch đệm dùng cho SR344 đã tiêm là MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM và Tween 20 0,05%) (bước 2). Tiếp theo, việc tiêm SR344 được gián đoạn và pha động có độ pH=5,8 được cho chảy qua trong thời gian khoảng 70 giây để phức hợp kháng thể/SR344 tiếp xúc với các điều kiện axit (bước 3). Mười công đoạn của quy trình liên kết (bước 2)/tiếp xúc với điều kiện axit (bước 3) được lặp lại liên tục để ghi lại cảm biến đồ theo thời gian thực, cảm biến đồ này được thể hiện trên Fig.11. WT thể hiện mức phân ly SR344 thấp hơn trong quá trình tiếp xúc với axit trong bước 3, và do đó tỷ lệ kháng thể của kháng thể có khả năng liên kết với các kháng nguyên mới trong bước 2 tiếp theo là rất thấp. Trái lại, đã phát hiện ra rằng các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH, cụ thể là H170/L82 và CLH5/L73, chứng minh rằng mức phân ly quá mạnh trong quá trình tiếp xúc với axit trong bước 3 mà hầu hết SR344 đã liên kết đều được phân ly, và do đó gần như tất cả các kháng thể đều có khả năng liên kết với các kháng nguyên mới trong bước 2 kế tiếp. Trong việc lặp lại mười công đoạn của quy trình liên kết (bước 2) và tiếp xúc với điều kiện axit (bước 3), hầu như tất cả các kháng thể H170/L82 và CLH5/L73 đều có khả năng liên kết với các kháng nguyên mới ở mỗi công đoạn.

Các cảm biến đồ thu được được sử dụng để tính toán lượng liên kết của SR344 trong mỗi công đoạn đối với mỗi mẫu bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)). Các trị số tích hợp trong

khoảng thời gian của 10 công đoạn được thể hiện trên Fig.12. Các trị số RU đã tích hợp thu được ở công đoạn thứ 10 là tương đương với tổng lượng kháng nguyên đã liên kết trong suốt mười chu kỳ này. Các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH, cụ thể là H170/L82 và CLH5/L73, đều thể hiện tổng lượng kháng nguyên liên kết lớn nhất so với WT, và được chứng minh là có khả năng liên kết lặp lại với khoảng 4 lần lượng kháng nguyên được liên kết bởi WT. Do đó, chúng tôi rằng bằng cách tạo cho WT khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH, các kháng thể này có thể liên kết lặp lại với các kháng nguyên và do đó trung hòa được nhiều kháng nguyên.

Ví dụ 8: Thử nghiệm PK/PD về kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người

Các thụ thể IL-6 có mặt trong cơ thể cả ở dạng thụ thể IL-6 hòa tan và dạng thụ thể IL-6 kiểu màng (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2006 Nov; 2(11): 619-26). Các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết với thụ thể IL-6 hòa tan và thụ thể IL-6 kiểu màng và trung hòa tác dụng sinh học của chúng. Được tin rằng kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng, tiếp theo được hấp thụ vào thể nhân bên trong tế bào bằng quá trình nội hóa trong khi kháng thể này vẫn được liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng, và tiếp theo chuyển vào thể nhân trong khi vẫn được liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng nơi nó được phân hủy bằng thể nhân cùng với thụ thể IL-6 kiểu màng. Nếu H3pI/L73, CLH5/L73 và H170/L82, là các kháng thể kháng thụ thể IL-6 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH được đánh giá trong ví dụ 6, có thể quay trở lại huyết tương thông qua FcRn do sự phân ly trong điều kiện axit bên trong thể nhân, thì các kháng thể đã quay trở lại huyết tương có thể lại liên kết với kháng nguyên. Điều này cho phép trung hòa nhiều thụ thể IL-6 kiểu màng bằng phân tử kháng thể đơn. Việc quay trở lại huyết tương thông qua FcRn do sự phân ly trong điều kiện axit bên trong thể nhân có đạt được hay không bằng các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH đã tạo cấu trúc có thể xác định được bằng cách đánh giá động học của các kháng thể này có được cải thiện so với WT hay không.

Do đó, được động học ở chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người (chuột nhắt hIL-6R tg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995 May 23; 92(11): 4862-6) được đánh

giá đối với bốn loại kháng thể, tức là kháng thể PM1 được làm giống như của người (kiểu đại: WT) và H3pI/L73, CLH5/L73, và H170/L82 được tạo cấu trúc trong các Ví dụ 2 và 4. WT, H3pI/L73, CLH5/L73, hoặc H170/L82 được sử dụng bằng cách cho chuột nhắt hIL-6R tg sử dụng qua đường trong tĩnh mạch liều duy nhất 25mg/kg, và các mẫu máu được thu gom, trước khi sử dụng và theo thời gian. Máu đã thu gom được ly tâm trực tiếp trong thời gian 15 phút ở tốc độ 15000 vòng/phút và nhiệt độ 4°C để thu huyết tương. Huyết tương đã tách được bảo quản trong ngăn đá ở nhiệt độ tới -20°C hoặc thấp hơn cho đến khi thực hiện các phép đo.

Việc đo nồng độ trong huyết tương chuột được thực hiện bằng ELISA. Các mẫu dùng để tạo đường cong hiệu chỉnh được bảo chế ở các nồng độ huyết tương 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 và 0,1 µg/mL. Các mẫu đường cong hiệu chỉnh và mẫu đo huyết tương của chuột nhắt được phân tán vào tấm miễn dịch (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) được cố định bằng F(ab')₂ kháng IgG ở người (đặc hiệu với chuỗi γ) (Sigma), và được để yên không khuấy trộn trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. BIOT ở dê kháng IgG người (Southern Biotechnology Associates) và thể liên hợp streptavidin-phosphatase kiềm (Roche Diagnostics) được phản ứng tuần tự với nhau, và phản ứng tạo màu được thực hiện bằng cách sử dụng hệ cơ chất BluePhos Microwell Phosphatase (BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories)) làm cơ chất. Độ hấp thụ ở bước sóng 650nm được đo bằng máy đọc vi đĩa. Nồng độ trong huyết tương của chuột được tính toán từ độ hấp thụ theo đường cong hiệu chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm phân tích SOFTmax PRO (Molecular Devices). Khoảng nồng độ trong huyết tương theo thời gian của WT cũng như H3pI/L73, CLH5/L73 và H170/L82 được thể hiện trên FIG. 13.

Dược động học được cải thiện đối với tất cả ba H3pI/L73, CLH5/L73 và H170/L82 so với WT. Cụ thể, dược động học của H3pI/L73 và CLH5/L73 được cải thiện đáng kể. Kháng thể kháng thụ thể IL-6 kiểu đại (WT) đã liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng được hấp thụ vào thể nhân bên trong tế bào bằng quá trình nội hóa, di chuyển tới lysosom trong khi kháng thể này vẫn được liên kết với kháng nguyên, và tiếp theo được phân hủy; do đó, nó có thời gian lưu trong huyết tương ngắn. Trái lại, do được

động học của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH được cải thiện đáng kể, nên các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH này được tin là quay trở lại huyết tương thông qua FcRn do sự phân ly ra khỏi kháng nguyên, thụ thể IL-6 kiểu màng, trong điều kiện axit bên trong thể nhân.

Mặc dù được động học được cải thiện đối với cả ba H3pI/L73, CLH5/L73 và H170/L82 so với WT, tác dụng kéo dài thời gian lưu trong huyết tương của H170/L82 là yếu hơn so với H3pI/L73 và CLH5/L73. Do các phân tử IgG được tin là liên kết hóa trị hai với kháng nguyên liên kết màng, nên tin rằng các kháng thể kháng thụ thể IL-6 cũng liên kết hóa trị hai (ái tính) với các thụ thể IL-6 kiểu màng và tiếp theo được nội hóa. Như được chỉ ra trong ví dụ 6, việc phân tích bằng cách sử dụng Biacore cho thấy rằng H170/L82 phân ly nhanh ra khỏi thụ thể IL-6 ở độ pH=5,8 khi liên kết với thụ thể IL-6 hòa tan (FIG. 9), nhưng tốc độ phân ly của nó ra khỏi thụ thể IL-6 ở độ pH=5,8 khi liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng là rất chậm (FIG. 10). Từ kết quả này, tác dụng yếu của việc kéo dài thời gian lưu trong huyết tương của H170/L82 được tin là do kháng thể này không thể phân ly hoàn toàn bên trong thể nhân sau khi đã được nội hóa do sự phân ly chậm của nó ở độ pH=5,8 khi liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng. Cụ thể, như đối với trường hợp liên quan đến các kháng nguyên màng, đã xác định được rằng để phân tử IgG đơn trung hòa nhiều kháng nguyên màng, sự phụ thuộc vào độ pH của sự phân ly ra khỏi liên kết hóa trị hai (ái tính) là quan trọng hơn so với sự phụ thuộc vào độ pH của liên kết đơn trị (ái lực).

Ví dụ 9: Thử nghiệm PK/PD về kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH bằng cách sử dụng khi đầu chó

Do được động học của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH được cải thiện đáng kể trong ví dụ 8, các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH được cho là quay trở lại huyết tương thông qua FcRn do việc phân ly khỏi kháng nguyên, thụ thể IL-6 kiểu màng, trong điều kiện axit bên trong thể nhân. Nếu các kháng thể đã quay trở lại huyết tương có thể lại liên kết với các thụ thể IL-6 kiểu màng, thì việc trung hòa kháng nguyên, thụ thể IL-6 kiểu màng, bằng các kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH được cho là kéo dài lâu hơn so với việc

trung hòa bằng kháng thể kháng thụ thể IL-6 kiểu đại, ở cùng liều dùng. Ngoài ra, do thụ thể IL-6 hòa tan cũng có mặt trong số các thụ thể IL-6, nên khoảng thời gian trung hòa cũng được cho là lâu hơn đối với cùng liều dùng với thụ thể IL-6 hòa tan.

Dược động học ở khí đầu chó được đánh giá đối với WT và H3pI/L73. WT hoặc H3pI/L73 được sử dụng cho khí đầu chó bằng cách sử dụng qua đường trong tĩnh mạch với liều duy nhất 1mg/kg, và các mẫu máu được thu gom, trước khi sử dụng và theo thời gian. Máu đã thu gom được ly tâm trực tiếp trong thời gian 15 phút ở tốc độ 15000 vòng/phút và nhiệt độ 4°C để thu huyết tương. Huyết tương đã tách được bảo quản trong ngăn đá ở nhiệt độ tới -20°C hoặc thấp hơn cho đến khi thực hiện các phép đo.

Việc đo nồng độ trong huyết tương khí đầu chó được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA. Trước hết, mảnh kháng thể F(ab')₂ kháng IgG ở người (đặc hiệu với chuỗi γ) (Sigma) được phân tán vào Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) và để yên qua đêm không khuấy trộn ở nhiệt độ 4°C để tạo ra các tấm được cố định kháng IgG ở người. Các mẫu đường cong hiệu chỉnh có nồng độ trong huyết tương bằng 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 và 0,05μg/mL và các mẫu đo huyết tương ở khí đầu chó đã pha loãng 100 lần hoặc nhiều hơn được chuẩn bị; 200μL IL-6R của khí đầu chó 20ng/mL được bổ sung vào 100 μL mẫu đường cong hiệu chỉnh và mẫu đo huyết tương; và tiếp theo chúng được để yên không khuấy trộn trong thời gian 1 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể kháng IL-6R ở người được biotin hóa (Biotinylated Anti-Human IL-6R Antibody (R&D)) được cho phản ứng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và tiếp theo Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) được phản ứng trong thời gian 1 giờ. Phản ứng tạo màu được thực hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMP One Component HRP Microwell (TMP One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)) làm cơ chất, tiếp theo phản ứng này được dập tắt bằng axit sulfuric 1N (Showa Chemical) và độ hấp thụ ở bước sóng 450nm được đo bằng máy đọc vi đĩa. Nồng độ trong huyết tương của khí đầu chó được tính toán từ độ hấp thụ theo đường cong hiệu chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm phân tích SOFTmax PRO (Molecular Devices). Khoảng nồng độ trong huyết tương theo thời gian của WT và H3pI/L73 sau khi sử dụng qua đường trong tĩnh mạch được thể hiện trên FIG. 14. Kết

quả là, được động học của H3pI/L73 được cải thiện đáng kể so với WT ở khi đầu chó theo cách tương tự như ở chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người. Do được động học của kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH, được cải thiện đáng kể, H3pI/L73 được cho là quay trở lại huyết tương thông qua FcRn do sự phân ly ra khỏi kháng nguyên, thụ thể IL-6 kiểu màng, trong điều kiện axit bên trong thể nhân.

Để đánh giá mức độ mà thụ thể IL-6 kiểu màng của khi đầu chó được trung hòa bởi việc sử dụng qua đường trong tĩnh mạch WT và H3pI/L73, tác dụng của kháng thể mẫu đối với protein phản ứng C của huyết tương (C-reactive protein - CRP) do IL-6 của khi đầu chó gây ra được nghiên cứu. Do CRP được tiết ra khi IL-6 liên kết với các thụ thể IL-6 kiểu màng, nên CRP đóng vai trò làm chất chỉ thị cho việc trung hòa thụ thể IL-6 kiểu màng. IL-6 của khi đầu chó (cyno.IL-6 được tạo ra trong ví dụ 1) chứa 1% huyết tương bất hoạt của khi đầu chó được sử dụng qua đường dưới da vào vùng thắt lưng của động vật này hằng ngày với liều 5µg/kg từ ngày 3 đến ngày 10 sau khi sử dụng WT hoặc H3pI/L73. Các mẫu máu được thu gom từ tĩnh mạch nổi ngay trước khi bắt đầu sử dụng IL-6 của khi đầu chó (ngày 3) và sau khi sử dụng ở khoảng cách 24 giờ (ngày 4 đến ngày 11), tiếp theo được tách thành huyết tương. Nồng độ CRP của các động vật riêng rẽ được đo bằng Cias R CRP (Kanto Chemical) bằng cách sử dụng máy phân tích tự động (TBA-120FR, Toshiba Medical Systems). Khoảng nồng độ CRP theo thời gian sau khi cảm ứng bằng IL-6 của khi đầu chó liên quan đến WT và H3pI/L73 được thể hiện trên FIG. 15. Kết quả là, khoảng thời gian ức chế CRP được kéo dài đáng kể bằng H3pI/L73 so với bằng WT. Dựa trên phát hiện này, kháng thể kháng thụ thể IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH, H3pI/L73, được cho là quay trở lại huyết tương thông qua FcRn do sự phân ly khỏi kháng nguyên của nó, thụ thể IL-6 kiểu màng, trong điều kiện axit bên trong thể nhân; và trung hòa thụ thể IL-6 kiểu màng bằng cách liên kết lại với kháng nguyên này; và nhờ đó ức chế sự sản xuất CRP trong khoảng thời gian lâu hơn so với WT. Nói cách khác, H3pI/L73 cho thấy khả năng liên kết với và trung hòa thụ thể IL-6 kiểu màng nhiều hơn một lần, dưới dạng phân tử kháng thể đơn. Do khoảng thời gian ức chế sự sản xuất CRP bởi H3pI/L73 được kéo dài so với bởi WT, khoảng thời

gian mà kháng thể liên kết với kháng nguyên và thụ thể IL-6 kiểu màng được chỉ ra là được kéo dài đối với H3pI/L73 so với WT.

Để đánh giá mức độ thụ thể IL-6 hòa tan của khí đầu chó được trung hòa bởi việc sử dụng WT và H3pI/L73 qua đường trong tĩnh mạch, nồng độ thụ thể IL-6 hòa tan của khí đầu chó không được liên kết trong huyết tương của khí đầu chó được đo. Tất cả các kháng thể kiểu IgG (IgG của khí đầu chó, kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người và phức hợp gồm kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người và thụ thể IL-6 hòa tan của khí đầu chó) có mặt trong huyết tương được hấp phụ lên Protein A bằng cách bổ sung 30 μ L huyết tương của khí đầu chó với lượng thích hợp của dòng nhanh rProtein A Sepharose (rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)) đã được sấy khô trong cốc lọc 0,22 μ m (Millipore). Sau khi ly tâm bằng máy ly tâm tốc độ cao, dung dịch đã đi qua (sau đây được gọi là "dung dịch đi qua") được thu hồi. Do dung dịch đi qua này không chứa phức hợp gồm kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người và thụ thể IL-6 hòa tan của khí đầu chó, thụ thể này được liên kết với protein A, nồng độ của IL-6 hòa tan không được liên kết có thể đo được bằng cách đo nồng độ của thụ thể IL-6 hòa tan của khí đầu chó trong dung dịch đi qua. Kháng thể kháng IL-6R ở người đơn dòng (Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D)) đã được đánh dấu ruteni bằng Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery) và kháng thể kháng IL-6R ở người được biotin hóa (Biotinylated Anti-human IL-6R Antibody (R&D)) được trộn với các mẫu đường cong hiệu chỉnh thụ thể IL-6 của khí đầu chó được điều chỉnh tới các nồng độ 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 và 62,5pg/mL và các mẫu huyết tương đã xử lý bằng Protein A như được mô tả ở trên. Các hỗn hợp này được để phản ứng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, các hỗn hợp này được phân tán vào đĩa 96 lỗ SA-Coated Standard MA2400 (Meso Scale Discovery). Sau khi để cho phản ứng thêm trong thời gian 1 giờ nữa và rửa, Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery) được phân tán. Ngay sau đó, việc đo bằng bộ tạo ảnh hình quạt 2400 (Sector Imager 2400) (Meso Scale Discovery) được thực hiện. Nồng độ thụ thể IL-6 của khí đầu chó được tính từ đáp ứng theo đường con hiệu chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm phân tích, SOFTmax PRO (Molecular Devices). Khoảng nồng độ của thụ thể IL-6 hòa tan của khí đầu chó không

được liên kết đối với WT và H3pI/L73 được thể hiện trên FIG. 16. Kết quả là, khoảng thời gian trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan của khi đầu chó bởi H3pI/L73 được kéo dài đáng kể so với bởi WT. Dựa trên phát hiện này, kháng thể kháng thụ thể IL-6 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, H3pI/L73 được cho là phân ly khỏi kháng nguyên, thụ thể IL-6 hòa tan, trong điều kiện axit trong thể nhân; và quay trở lại huyết tương thông qua FeRn; và liên kết lại với và trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan. Do khoảng thời gian ức chế thụ thể IL-6 hòa tan của khi đầu chó không được liên kết bởi được kéo dài so với bởi WT nên khoảng thời gian để các kháng thể liên kết với kháng nguyên và thụ thể IL-6 hòa tan được chỉ ra là được kéo dài đối với H3pI/L73 so với WT.

Từ các phát hiện này, thời gian cho đến khi kháng thể không còn trong huyết tương cũng như thời gian để kháng thể liên kết với các thụ thể IL-6 hòa tan và kiểu màng trong cơ thể được phát hiện là được kéo dài đáng kể đối với các kháng thể kháng thụ thể IL-6 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH sản xuất được để liên kết mạnh với kháng nguyên ở độ pH=7,4 (là độ pH trong huyết tương) nhưng liên kết yếu với kháng nguyên ở độ pH=5,8 (là độ pH trong thể nhân) so với kháng thể kháng thụ thể IL-6 kiểu đại. Điều này có thể làm giảm liều lượng và tần số sử dụng cho bệnh nhân, và sau đó là, tổng liều lượng sử dụng. Do đó, kháng thể kháng thụ thể IL-6 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH được cho là đặc biệt hữu ích làm được phẩm để sử dụng làm chất đối kháng IL-6.

Ví dụ 10: Cải thiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng bằng cách tối ưu hóa vùng biến đổi

Tối ưu hóa các vùng biến đổi H3pI/L73 và CLH5/L82

Các kháng thể có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH được cho thấy là có tác dụng tốt hơn trong ví dụ 9. Do đó, để cải thiện hơn nữa khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH này, các đột biến đã được đưa vào trình tự CDR của CLH5 thu được trong ví dụ 3 để tạo cấu trúc VH1-IgG1 (SEQ ID NO: 21) và VH2-IgG1 (SEQ ID NO: 22). Ngoài ra, các đột biến đã được đưa vào trình tự khung và trình tự CDR của H3pI để cấu trúc các chuỗi H được cải biến VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) và VH4-IgG1 (SEQ ID NO: 24). Các đột biến đã được đưa vào trình tự CDR của L73 và L82 để tạo cấu trúc các chuỗi L được cải biến VL1-CK (SEQ ID NO: 25), VL2-CK (SEQ ID NO: 26) và VL3-CK (SEQ

ID NO: 27). Cụ thể, các thể đột biến được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng bộ kit gây đột biến định hướng điểm QuikChange (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)) bằng phương pháp được mô tả trong hướng dẫn đi kèm, và các đoạn plasmid thu được được cài vào vectơ biểu hiện tế bào động vật có vú để tạo cấu trúc các vectơ biểu hiện chuỗi H và vectơ biểu hiện chuỗi L mong muốn. Trình tự nucleotit của các vectơ biểu hiện thu được được xác định bằng các phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Kháng thể có VH2-IgG1 (SEQ ID NO: 22) làm chuỗi H và VL2-CK (SEQ ID NO: 26) làm chuỗi L được ký hiệu là Fv1-IgG1, kháng thể có VH1-IgG1 (SEQ ID NO: 21) làm chuỗi H và L82 làm chuỗi L được ký hiệu là Fv2-IgG1, kháng thể có VH4-IgG1 (SEQ ID NO: 24) làm chuỗi H và VL1-CK (SEQ ID NO: 25) làm chuỗi L được ký hiệu là Fv3-IgG1, và kháng thể có VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) làm chuỗi H và VL3-CK (SEQ ID NO: 27) làm chuỗi L được ký hiệu là Fv4-IgG1. Trong đó, Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 được biểu hiện và tinh chế. Việc biểu hiện và tinh chế được thực hiện bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

Phân tích sự liên kết của các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 hòa tan

Việc phân tích động học của các phản ứng kháng nguyên-kháng thể ở độ pH=7,4 được thực hiện đối với 4 loại kháng thể, tức là kháng thể PM1 được làm giống như của người (kiểu đại: WT), và WT, H3pI/L73-IgG1, Fv2-IgG1, và Fv4-IgG1 đã tạo cấu trúc trong các Ví dụ 2 và 10, bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) (dung dịch đệm: MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM, Tween 20 0,05%). Mỗi kháng thể được liên kết trên chip cảm biến mà trên đó F(ab)₂ đặc hiệu với chuỗi γ kháng IgG (Pierce) được cố định bằng phương pháp liên hợp amin, và tiếp theo, SR344 được điều chỉnh tới nồng độ nằm trong khoảng từ 9,8 đến 40nM được tiêm vào làm chất phân tích. Sự kết hợp và phân ly ra khỏi SR344 được ghi lại dựa trên thời gian thực đối với các dòng vô tính có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Hằng số tốc độ kết hợp k_a (1/Ms) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/s) được tính bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100

Evaluation Software (GE Healthcare)), và hằng số phân ly KD (M) được tính dựa trên các trị số này (Bảng 7).

Bảng 7: So sánh hằng số tốc độ phân ly của các dòng có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH ra khỏi thụ thể IL-6 hòa tan, SR344

Mẫu	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)
WT	4,0E+05	1,1E-03	2,7E-09
H3pI/L73	4,1E+05	5,9E-04	1,4E-09
Fv2-IgG1	3,9E+05	7,7E-04	2,0E-09
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09

Từ kết quả tính toán ái lực ở độ pH=7,4 đối với mỗi dòng vô tính, hằng số phân ly (ái lực, trị số KD) của WT, H3pI/L73-IgG1, Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 với SR344 lần lượt là 2,7nM, 1,4nM, 2,0nM và 1,4nM, và chúng gần như tương đương. Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 được chứng minh là có khả năng liên kết với thụ thể IL-6 hòa tan bằng hoặc lớn hơn khả năng liên kết của WT.

Phân tích sự liên kết của các dòng vô tính có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng

Các phản ứng kháng nguyên-kháng thể đối với thụ thể IL-6 kiểu màng được ghi nhận ở độ pH=5,8 và 7,4 đối với 4 dòng vô tính được tạo cấu trúc, WT, H3pI/L73-IgG1, Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare). Sự liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng được đánh giá bằng cách đánh giá sự liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng được cố định trên chip cảm biến. SR344 được biotin hóa bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và SR344 đã biotin hóa được cố định trên chip cảm biến thông qua streptavidin bằng cách sử dụng ái lực giữa streptavidin và biotin. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch đệm pha động là MES 10mM (độ pH=5,8), NaCl 150mM và Tween 20 0,05%. Các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH được tiêm vào trong điều kiện độ pH=7,4 để chúng liên kết với SR344 (dung dịch đệm mẫu tiêm: MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM, Tween 20 0,05%), tiếp theo sự phân ly phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng được ghi lại ở độ pH của pha động (5,8) (FIG. 17).

Nồng độ mẫu được điều chỉnh tới 0,25µg/mL. việc liên kết được thực hiện ở MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM, và Tween 20 0,05%. Việc phân ly được thực hiện ở MES 10mM (độ pH=5,8), NaCl 150mM, và Tween 20 0,05%. Trong trường hợp này, hằng số tốc độ phân ly ($k_d(1/s)$) ở độ pH=5,8 được tính toán bằng cách chỉ hiệu chỉnh pha phân ly ở độ pH=5,8 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)). Tương tự, nồng độ mẫu được điều chỉnh tới 0,25µg/mL, việc liên kết được thực hiện ở MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM, và Tween 20 0,05%, việc phân ly được thực hiện ở MES 10mM (độ pH=7,4), NaCl 150mM, và Tween 20 0,05%, và hằng số tốc độ phân ly ($k_d(1/s)$) ở độ pH=7,4 được tính bằng cách chỉ hiệu chỉnh pha phân ly ở độ pH=7,4 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)). Hằng số tốc độ phân ly phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng vô tính được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8: So sánh hằng số tốc độ phân ly của các dòng có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH ra khỏi thụ thể IL-6 kiểu màng, SR344

Mẫu	pH=7,4	pH=5,8	Phụ thuộc độ pH
	$k_d(1/s)$	$k_d(1/s)$	$k_d(pH=5,8)/k_d(pH=7,4)$
WT	2,5E-04	2,5E-04	1,0
H3pl/L73	2,6E-04	6,7E-04	2,59
Fv2-IgG1	3,4E-04	2,4E-03	7,18
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56

Từ kết quả tính toán sự phụ thuộc vào độ pH đối với mỗi dòng vô tính, mức phụ thuộc vào độ pH của sự liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng, SR344, của 4 dòng vô tính WT, H3pl/L73-IgG1 Fv2-IgG1, và Fv4-IgG1 lần lượt là 1,0 lần, 2,59 lần, 7,18 lần và 5,56 lần. Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 cho thấy mức phụ thuộc vào độ pH cao hơn trong việc phân ly ra khỏi thụ thể IL-6 kiểu màng so với H3pl/L73-IgG1.

Dựa trên cơ sở đó, Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 được chứng minh là có sự liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng phụ thuộc vào độ pH mạnh hơn so với H3pl/L73-IgG1 trong khi vẫn duy trì được ái lực với thụ thể IL-6 hòa tan bằng hoặc mạnh hơn ái lực của WT.

Ví dụ 11: Thử nghiệm PK/PD về kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH có các vùng biến đổi đã được tối ưu hóa bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người

Dược động học của Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1, cũng như WT và H3pI/L73-IgG1 đã tạo ra và đánh giá trong ví dụ 10, được đánh giá bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người đã sử dụng trong ví dụ 8. WT, H3pI/L73-IgG1, Fv2-IgG1 hoặc Fv4-IgG1 được sử dụng bằng cách cho chuột nhắt hIL-6R tg sử dụng liều duy nhất 25mg/kg qua đường trong tĩnh mạch, và nồng độ của mỗi kháng thể trong huyết tương được đo theo cách tương tự như trong ví dụ 8. Khoảng nồng độ trong huyết tương theo thời gian của WT, H3pI/L73-IgG1, Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 được thể hiện trên FIG. 18.

Dược động học của H3pI/L73-IgG1 được cải thiện so với WT theo cách tương tự như trong ví dụ 8, trong khi dược động học của Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 còn được cải thiện so với H3pI/L73-IgG1. Việc đo như đối với nồng độ thụ thể IL-6 không liên kết, như được đo ở khi đầu chó trong ví dụ 9, được thực hiện ở chuột nhắt hIL-6R tg trong thử nghiệm này bằng cách sử dụng cùng phương pháp. Kết quả là, việc kéo dài thời gian trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan được xác nhận đối với Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 so với H3pI/L73-IgG1 (số liệu không được thể hiện). Như đã chỉ ra trong ví dụ 10, sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng được cải thiện đối với Fv2-IgG1 và Fv4-IgG1 so với H3pI/L73-IgG1. Điều đó chỉ ra rằng có thể cải thiện hơn nữa dược động học và thời gian trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan so với H3pI/L73-IgG1 bằng cách cải thiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng.

Ví dụ 12: Cải thiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng bằng cách tối ưu hóa vùng ổn định

Tối ưu hóa vùng ổn định của Fv4-IgG1

Nói chung, sự liên kết với các kháng nguyên liên kết màng được báo cáo là thay đổi tùy theo vùng ổn định của kháng thể (J. Immunol. Methods 1997 Jun 23; 205(1): 67-72). Các vùng ổn định của kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH được tạo ra ở trên là thuộc isotyp IgG1. Do đó, một nghiên cứu đã được thực hiện để tối ưu hóa vùng ổn định để cải thiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng.

Đột biến đã được đưa vào vùng ổn định có trong tự nhiên, tức là vùng ổn định của IgG2 (SEQ ID NO: 28), để tạo cấu trúc vùng ổn định IgG2ΔGK (SEQ ID NO: 29). Đột biến khác được đưa vào vùng ổn định IgG2ΔGK để tạo cấu trúc vùng ổn định M58 (SEQ ID NO: 30). Các đột biến cũng được đưa vào các vùng ổn định IgG2 và M58 để tạo cấu trúc các vùng ổn định M71 (SEQ ID NO: 31) và M73 (SEQ ID NO: 32).

VH3-IgG2ΔGK (SEQ ID NO: 33) được tạo cấu trúc bằng cách thay thế vùng ổn định của VH3-IgG1 được tạo ra trong ví dụ 10 bằng IgG2ΔGK, VH3-M58 (SEQ ID NO: 34) được tạo cấu trúc bằng cách thay thế vùng ổn định này bằng M58, và VH3-M73 (SEQ ID NO: 35) được tạo cấu trúc bằng cách thay thế vùng ổn định này bằng M73. Cụ thể, các vector biểu hiện trong đó phần vùng ổn định của VH3 được sử dụng trong ví dụ 10 được thay thế bằng vùng ổn định mong muốn bằng cách cắt và gắn NheI/NotI được tạo cấu trúc. Trình tự nucleotit của các vector biểu hiện thu được được xác định bằng phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc biểu hiện và tinh chế được thực hiện như sau: Fv4-IgG2 sử dụng VH3-IgG2ΔGK (SEQ ID NO: 33) làm chuỗi H và VL3-CK (SEQ ID NO: 27) làm chuỗi L; Fv4-M58 sử dụng VH3-M58 (SEQ ID NO: 34) làm chuỗi H và VL3-CK (SEQ ID NO: 27) làm chuỗi L; và Fv4-M73 có sử dụng VH3-M73 (SEQ ID NO: 35) làm chuỗi H và VL3-CK (SEQ ID NO: 27) làm chuỗi L. Việc biểu hiện và tinh chế được thực hiện bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

Phân tích sự liên kết của Fv4 có vùng ổn định đã được tối ưu hóa với thụ thể IL-6 hòa tan

Sự kết hợp với và phân ly ra khỏi SR344 được ghi nhận dựa trên thời gian thực bằng cách sử dụng phương pháp như trong ví dụ 10 đối với Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73 đã được tạo ra cũng như WT. Hằng số tốc độ kết hợp k_a (1/Ms) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/s) được tính toán sau khi phân tích theo cách tương tự, và tiếp theo, hằng số phân ly KD (M) được tính toán dựa trên các trị số này (Bảng 9).

Bảng 9: So sánh hằng số tốc độ phân ly của các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH ra khỏi thụ thể IL-6 hòa tan, SR344

Mẫu	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv4-IgG2	9,6E+05	1,2E-03	1,3E-09

Fv4-M58	8,3E+05	1,1E-03	1,4E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,0E-03	1,4E-09

Từ kết quả tính toán ái lực ở độ pH=7,4 đối với mỗi dòng vô tính, hằng số phân ly (ái lực, trị số KD) của Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73 với SR344 lần lượt là 1,4nM, 1,3nM, 1,4nM và 1,4nM, và chúng hầu như tương đương. Điều này chỉ ra rằng khả năng liên kết của các dòng vô tính có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 hòa tan, SR344, không thay đổi ngay cả sau khi cải biến vùng ổn định. Dựa trên cơ sở phát hiện này, khả năng liên kết với thụ thể IL-6 hòa tan được cho là không thay đổi đối với Fv1, Fv2 và Fv3 ngay cả khi vùng ổn định được cải biến theo cách tương tự. Phân tích sự liên kết của Fv4 có vùng ổn định đã được tối ưu hóa với thụ thể IL-6 kiểu màng

Các phản ứng kháng nguyên-kháng thể với thụ thể IL-6 kiểu màng ở độ pH=5,8 và độ pH=7,4 được ghi nhận đối với Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73 đã được tạo ra cũng như WT, theo cách tương tự như trong ví dụ 10 bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare). Kết quả thu được bằng cách tiêm dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH trong điều kiện độ pH=7,4 cho phép liên kết với SR344, và bằng cách ghi lại sự phân ly phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng ở pha động có độ pH=5,8, được thể hiện trên FIG. 19. Các phương pháp phân tích khác được thực hiện theo cách tương tự như trong ví dụ 10, và tốc độ phân ly phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng vô tính được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10: So sánh hằng số tốc độ phân ly của các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH ra khỏi thụ thể IL-6 kiểu màng, SR344

	pH=7,4	pH=5,8	Phụ thuộc độ pH
Mẫu	kd (1/s)	kd (1/s)	kd(pH=5,8)/kd(pH=7,4)
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56
Fv4-IgG2	1,0E-03	1,8E-02	16,99
Fv4-M58	5,4E-04	9,5E-03	17,64
Fv4-M73	5,1E-04	5,1E-03	10,06

Từ kết quả tính toán mức phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng vô tính, mức phụ thuộc vào độ pH của Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73 với SR344 lần lượt là

5,6 lần, 17,0 lần, 17,6 lần và 10,1 lần; do đó, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73 đều cho thấy mức phân ly phụ thuộc vào độ pH ra khỏi thụ thể IL-6 kiểu màng cao hơn so với Fv4-IgG1.

Dựa trên kết quả phân tích sự liên kết với thụ thể IL-6 hòa tan và sự liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng bằng cách sử dụng vùng biến đổi của Fv4, đã phát hiện ra rằng việc thay thế vùng ổn định từ IgG1 đến IgG2, M58 hoặc M73 có thể cải thiện sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng, mà không làm thay đổi ái lực với thụ thể IL-6 hòa tan. Điều này được coi là được duy trì giống như đối với Fv1, Fv2 và Fv3. Ví dụ 13: Thử nghiệm PK/PD về kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH có vùng ổn định đã được tối ưu hóa bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người

Dược động học của Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 và Fv4-M58 được tạo ra trong ví dụ 13 được đánh giá bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen thụ thể IL-6 của người (chuột nhắt hIL-6R tg) được sử dụng trong ví dụ 8 để kiểm tra tác dụng của vùng ổn định đối với dược động học. WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 hoặc Fv4-M58 được sử dụng cho chuột nhắt hIL-6R tg với liều duy nhất 25mg/kg qua đường trong tĩnh mạch, và tiếp theo, việc đo nồng độ trong huyết tương của mỗi kháng thể được thực hiện theo cách tương tự như trong ví dụ 8. Khoảng nồng độ trong huyết tương theo thời gian của WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 và Fv4-M58 được thể hiện trên FIG. 20.

Tương tự như trong ví dụ 11, dược động học của Fv4-IgG1 được cải thiện so với WT, và dược động học của Fv4-IgG2 và Fv4-M58 còn được cải thiện so với Fv4-IgG1. Việc đo như đối với nồng độ thụ thể IL-6 không được liên kết, như được đo ở khi đầu chó trong ví dụ 9, được thực hiện ở chuột nhắt hIL-6R tg trong thử nghiệm này bằng cách sử dụng phương pháp tương tự. Kết quả là, việc kéo dài thời gian trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan được xác nhận đối với Fv4-IgG2 và Fv4-M58 so với Fv4-IgG1 (số liệu không được thể hiện). Như đã chỉ ra trong ví dụ 10, sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng được cải thiện đối với Fv4-IgG2 và Fv4-M58 so với Fv4-IgG1. Điều đó chỉ ra rằng có thể cải thiện dược động học và thời gian trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan bằng cách thay thế vùng ổn định từ IgG1 đến IgG2 hoặc M58. Dựa trên phát hiện này, tin rằng dược động học và thời gian trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan, không chỉ trong

trường hợp Fv4, mà còn trong trường hợp Fv1, Fv2 và Fv3, có thể được cải thiện so với IgG1 bằng cách thay thế vùng ổn định từ IgG1 đến IgG2 hoặc M58.

Ví dụ 14: Cấu trúc các kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH có các vùng biến đổi và vùng ổn định đã được tối ưu hóa

VH2-M71 (SEQ ID NO: 36) và VH2-M73 (SEQ ID NO: 37), có M71 và M73 làm vùng ổn định của VH2-IgG1, và VH4-M71 (SEQ ID NO: 38) và VH4-M73 (SEQ ID NO: 39), có M71 và M73 làm vùng ổn định của VH4-IgG1, được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như được mô tả ở trên.

Fv1-M71 sử dụng VH2-M71 làm chuỗi H và VL2-CK làm chuỗi L, Fv1-M73 có sử dụng VH2-M73 làm chuỗi H và VL2-CK làm chuỗi L, Fv3-M71 sử dụng VH4-M71 làm chuỗi H và VL1-CK làm chuỗi L, và Fv3-M73 sử dụng VH4-M73 làm chuỗi H và VL1-CK làm chuỗi L, được biểu hiện và tinh chế. Việc biểu hiện và tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

Phân tích sự liên kết của các kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH có các vùng biến đổi và vùng ổn định đã được tối ưu hóa với thụ thể IL-6 hòa tan

Sự kết hợp với và phân ly ra khỏi SR344 được ghi lại dựa trên thời gian thực bằng cách sử dụng phương pháp như trong ví dụ 10 đối với 11 loại kháng thể, kháng thể PM1 được làm giống như của người (kiểu đại: WT) và H3pI/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73, được tạo cấu trúc như được mô tả ở trên. Hằng số tốc độ kết hợp k_a (1/Ms) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/s) được tính toán bằng cách phân tích theo cách tương tự, và hằng số phân ly KD (M) được tính toán dựa trên các trị số này (Bảng 11).

Bảng 11: So sánh hằng số tốc độ phân ly của các dòng có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 hòa tan, SR344

Mẫu	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
WT	4,0E+05	1,1E-03	2,7E-09
H3pI/L73	4,1E+05	5,9E-04	1,4E-09
Fv1-M71	5,5E+05	5,4E-04	9,7E-10
Fv1-M73	6,1E+05	5,5E-04	9,1E-10

Fv2-IgG1	3,9E+05	7,7E-04	2,0E-09
Fv3-M71	7,8E+05	8,2E-04	1,1E-09
Fv3-M73	8,5E+05	8,7E-04	1,0E-09
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv4-IgG2	9,6E+05	1,2E-03	1,3E-09
Fv4-M58	8,3E+05	1,1E-03	1,4E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,0E-03	1,4E-09

Cả 10 dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH thu được đều được phát hiện là có hằng số phân ly (ái lực, trị số KD) với thụ thể IL-6 hòa tan bằng hoặc cao hơn so với hằng số phân ly của WT.

Phân tích sự liên kết của các kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH có các vùng biến đổi và vùng ổn định đã được tối ưu hóa với thụ thể IL-6 kiểu màng

Các phản ứng kháng nguyên-kháng thể với thụ thể IL-6 kiểu màng ở độ pH=5,8 và độ pH=7,4 được ghi lại theo cách tương tự như trong ví dụ 10 bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) đối với 11 loại kháng thể, kháng thể PM1 được làm giống như của người (kiểu đại: WT) và H3pI/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73, được tạo ra như được mô tả ở trên. Các dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH được tiêm trong điều kiện độ pH=7,4 để cho phép chúng liên kết với SR344, và tiếp theo, sự phân ly phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng ở độ pH pha động, độ pH=5,8, được ghi lại. Kết quả được thể hiện trên FIG. 21 (kết quả đối với Fv1-M71, Fv1-M73, Fv3-M71 và Fv3-M73 được thể hiện trên FIG. 21, trong khi kết quả đối với các dòng còn lại được thể hiện trên các hình vẽ FIG. 17 và FIG. 19). Các phân tích được thực hiện theo cách tương tự như trong ví dụ 10 và sự phụ thuộc vào độ pH của hằng số tốc độ phân ly của tất cả 11 dòng này được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12: Sự phụ thuộc vào độ pH của hằng số tốc độ phân ly của các dòng vô tính có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng, SR344

	pH=7,4	pH=5,8	Phụ thuộc độ pH
Mẫu	kd (1/s)	kd (1/s)	kd(pH=5,8)/kd(pH=7,4)
WT	2,5E-04	2,5E-04	1,00
H3pI/L73	2,6E-04	6,7E-04	2,59

Fv1-M71	6,1E-04	6,9E-03	11,29
Fv1-M73	3,7E-04	3,2E-03	8,80
Fv2-IgG1	3,4E-04	2,4E-03	7,18
Fv3-M71	9,1E-04	9,7E-03	10,74
Fv3-M73	4,9E-04	5,3E-03	10,88
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56
Fv4-IgG2	1,0E-03	1,8E-02	16,99
Fv4-M58	5,4E-04	9,5E-03	17,64
Fv4-M73	5,1E-04	5,1E-03	10,06

Mười kiểu dòng vô tính liên kết phụ thuộc vào độ pH thu được đều cho thấy khả năng liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng. Hơn nữa, tất cả Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73 đều được phát hiện là có mức liên kết phụ thuộc vào độ pH được cải thiện so với H3pI/L73-IgG1, trong khoảng thời gian cho đến khi kháng thể không còn trong huyết tương cũng như khoảng thời gian mà thụ thể IL-6 hòa tan và thụ thể IL-6 kiểu màng được liên kết bởi kháng thể trong cơ thể được phát hiện là được kéo dài đáng kể so với WT, như được thể hiện ở khi đầu chó trong ví dụ 9.

Ví dụ 15: Thử nghiệm PK/PD về các kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH có các vùng biến đổi và vùng ổn định đã được tối ưu hóa bằng cách sử dụng khi đầu chó

Cấu trúc kháng thể kháng thụ thể IL-6 có ái lực cao đã biết

Vector biểu hiện tế bào động vật có vú được tạo cấu trúc để biểu hiện kháng thể kháng thụ thể IL-6 có ái lực cao VQ8F11-21 hIgG1 được mô tả trong US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1, các trình tự axit amin 19 và 27), dưới dạng kháng thể kháng thụ thể IL-6 có ái lực cao đã biết. Vùng biến đổi của kháng thể đã được tạo cấu trúc bằng PCR bằng cách tổ hợp các oligo-ADN tổng hợp (PCR ghép). Vùng ổn định đã được khuếch đại bằng PCR từ vector biểu hiện đã sử dụng trong ví dụ 1. Vùng biến đổi của kháng thể và vùng ổn định của kháng thể này được gắn với nhau bằng PCR ghép và được cài vào vector để biểu hiện ở động vật có vú. Các đoạn ADN của chuỗi H và chuỗi L thu được được cài vào vector biểu hiện tế bào động vật có vú để tạo cấu trúc vector biểu hiện chuỗi H và vector biểu hiện chuỗi L đang nói đến. Trình tự nucleotit của các vector biểu hiện thu được được xác định bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung

bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Việc biểu hiện và tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng các vectơ biểu hiện đã tạo cấu trúc. Việc biểu hiện và tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1 để thu kháng thể kháng thụ thể IL-6 có ái lực cao (Ab có ái lực cao).

Thử nghiệm PK/PD ở khi đầu chó

Dược động học và tác dụng dược lý được đánh giá ở khi đầu chó đối với các kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH H3pI/L73-IgG1 và Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73, và Fv4-M73 và kháng thể kháng thụ thể IL-6 có ái lực cao đã biết (Ab ái lực cao). H3pI/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 hoặc Fv4-M73 được sử dụng cho khi đầu chó với liều duy nhất 0,5mg/kg qua đường trong tĩnh mạch, trong khi Ab có ái lực cao được sử dụng với liều duy nhất 1,0mg/kg qua đường trong tĩnh mạch. Các mẫu máu được thu gom trước khi sử dụng và theo thời gian. Nồng độ trong huyết tương của mỗi kháng thể được đo theo cách tương tự như trong ví dụ 9. Khoảng thời gian theo nồng độ trong huyết tương của H3pI/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 và Fv4-M73 cũng như Ab có ái lực cao được thể hiện trên FIG. 21. Để đánh giá tác dụng dược lý về mức độ trung hòa thụ thể IL-6 kiểu màng của khi đầu chó, IL-6 của khi đầu chó được sử dụng qua đường dưới da ở vùng thắt lưng của động vật này hằng ngày với liều 5µg/kg từ ngày 3 đến ngày 10 (từ ngày 6 đến ngày 10 với Ab ái lực cao) sau khi sử dụng kháng thể, theo cách tương tự như trong ví dụ 9. Nồng độ CRP của mỗi động vật được đo ở thời điểm 24 giờ sau mỗi lần sử dụng. Khoảng nồng độ theo thời gian của CRP với mỗi kháng thể sử dụng được thể hiện trên Fig.22. Để đánh giá tác dụng dược lý về mức độ trung hòa thụ thể IL-6 hòa tan của khi đầu chó, nồng độ thụ thể IL-6 hòa tan của khi đầu chó không liên kết trong huyết tương của khi đầu chó được đo theo cách tương tự như trong ví dụ 9. Khoảng nồng độ theo thời gian của thụ thể IL-6 hòa tan của khi đầu chó không liên kết với mỗi kháng thể sử dụng được thể hiện trên Fig.23.

Kết quả là, nồng độ kháng thể trong huyết tương được duy trì ở mức cao đối với mỗi Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 và Fv4-M73 so với H3pI/L73-IgG1, trong khi nồng độ CRP và nồng độ thụ thể IL-6 hòa tan của khi đầu chó không liên kết

được duy trì ở mức thấp. Cụ thể, kết quả này cho thấy rằng thời gian các kháng thể này liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng và thụ thể IL-6 hòa tan (hay nói cách khác là khoảng thời gian trung hòa) được kéo dài so với H3pI/L73-IgG1.

Ngoài ra, các kháng thể kháng thụ thể IL-6 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH này được xác nhận về tác dụng trung hòa và tác dụng kéo dài của chúng là bằng hoặc cao hơn so với tác dụng của kháng thể kháng thụ thể IL-6 có ái lực cao đã biết (Ab có ái lực cao) được sử dụng với liều 1,0mg/kg, chỉ ở một nửa liều này, tức là 0,5mg/kg. Do đó, các kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH này được chứng minh là có tác dụng trung hòa và tác dụng ổn định tốt hơn so với tác dụng của kháng thể kháng thụ thể IL-6 có ái lực cao đã biết.

Các kháng thể được thể hiện trong Bảng 12 không được sử dụng trong thử nghiệm PK/PD bằng cách sử dụng khí đầu chó như trong thử nghiệm này cũng đã được xác nhận là có mức liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 kiểu màng được cải thiện so với H3pI/L73-IgG1. Do đó, thời gian các kháng thể này liên kết với thụ thể IL-6 kiểu màng và thụ thể IL-6 hòa tan (hay nói cách khác là khoảng thời gian trung hòa và tác dụng trung hòa kéo dài) cũng được tin là được kéo dài so với H3pI/L73-IgG1.

Trong ví dụ 9, đối với H3pI/L73-IgG1, thời gian để kháng thể không còn trong huyết tương cũng như thời gian để kháng thể trong cơ thể liên kết với thụ thể IL-6 hòa tan và thụ thể IL-6 kiểu màng (tác dụng trung hòa kéo dài) được phát hiện là được kéo dài đáng kể so với WT. Do đó, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 và Fv4-M73, có tác dụng trung hòa kéo dài tốt hơn so với H3pI/L73-IgG1, được cho là có tác dụng trung hòa kéo dài được cải thiện đáng kể so với WT.

Khác với kháng thể kháng thụ thể IL-6, các kháng thể kháng thụ thể IL-6 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH được tạo ra để liên kết mạnh với kháng nguyên ở độ pH huyết tương (độ pH=7,4) nhưng chỉ liên kết yếu với kháng nguyên ở độ pH thể nhân (độ pH=5,8), có thể làm giảm liều lượng và tần số sử dụng cho bệnh nhân, và do đó, chúng có thể làm giảm đáng kể tổng liều lượng sử dụng. Do đó, kháng thể kháng thụ thể IL-6

có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH được cho là đặc biệt hữu ích làm được phẩm để sử dụng làm chất đối kháng IL-6.

Ví dụ 16: Cấu trúc kháng thể kháng IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH

Biểu hiện và tính chế kháng thể kháng IL-6

Trong các Ví dụ từ 1 đến 15, nhiều kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 đều được tạo ra thành công bằng cách tác động tới sự phụ thuộc này thông qua việc đưa đoạn thay thế histidin và đoạn tương tự vào vùng biến đổi, cụ thể là các trình tự CDR của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người. Đã phát hiện ra rằng tất cả các kháng thể này đều liên kết lặp lại với thụ thể IL-6 và chứng tỏ mức cải thiện đáng kể về PK/PD.

Do đó, đã xác nhận được rằng khả năng phụ thuộc vào độ pH của kháng thể liên kết với kháng nguyên có thể được áp dụng cho kháng thể khác liên kết với kháng nguyên không phải thụ thể IL-6 bằng cách sử dụng phương pháp tương tự. IL-6 của người được chọn làm kháng nguyên này, và kháng thể kháng IL-6 bao gồm chuỗi H (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 62) và chuỗi L (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 63), kháng thể này liên kết với IL-6 như được mô tả trong WO 2004/039826, (“Kháng thể kháng IL6 kiểu đại”) đã được tạo cấu trúc. Bằng cách sử dụng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, các mảnh gen mã hóa các trình tự axit amin của kháng thể đang nói đến được cài vào vectơ biểu hiện tế bào động vật có vú để tạo cấu trúc vectơ biểu hiện chuỗi H và vectơ biểu hiện chuỗi L đang nói đến. Trình tự nucleotit của vectơ biểu hiện thu được được xác định bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể kháng IL6 kiểu đại được biểu hiện và tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

Cấu trúc của kháng thể kháng IL-6 phụ thuộc vào độ pH

Để tạo ra khả năng phụ thuộc vào độ pH của kháng thể liên kết với IL-6, các đoạn thay thế histidin đã được đưa vào các axit amin trong CDR của kháng thể kháng IL6 (kháng IL6 kiểu đại) bao gồm chuỗi H (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 62) và chuỗi L (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 63). Bằng cách thay thế histidin trong các axit amin của CDR và sau đó sàng lọc, một số dòng vô tính có sự liên kết phụ thuộc vào

độ pH được thu. Mức liên kết ở độ pH=5,5 giảm đáng kể so với mức liên kết ở độ pH=7,4. Các vị trí thay thế histidin trong các dòng vô tính phụ thuộc vào độ pH được thể hiện trong Bảng 13. Các ví dụ bao gồm “Kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 1” bao gồm chuỗi H (c1) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 64) và chuỗi L (c1) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 65), và “Kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 2” bao gồm chuỗi H (c1) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 64) và chuỗi L (c2) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 66). Kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 1 và kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 2 được biểu hiện và tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

Bảng 13: Vị trí thay thế histidin trong các dòng phụ thuộc vào độ pH

H32, H59, H61, H99
L53, L54, L90, L94

Phân tích sự liên kết của các dòng phụ thuộc vào độ pH với IL-6 của người

Việc phân tích động học của các phản ứng kháng nguyên-kháng thể ở độ pH=5,5 và độ pH=7,4 đã được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) đối với 3 loại kháng thể bào chế được như được mô tả ở trên: kháng thể kháng IL6 kiểu đại, kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 1 và kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 2 (dung dịch đệm: DPBS(-) (độ pH=7,4 hoặc 5,5), NaCl 150mM). Kháng thể được liên kết với chip cảm biến đã được cố định protein tái tổ hợp A/G (recomb-protein A/G (Pierce)) bằng phương pháp liên hợp với amin, và tiếp theo IL-6 của người (Toray) được điều chỉnh tới nồng độ thích hợp được tiêm lên chip làm chất phân tích. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Hằng số tốc độ kết hợp k_a (1/Ms) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/s) được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)), và hằng số phân ly KD (M) được tính dựa trên các trị số này (Bảng 14). Hơn nữa, tỷ lệ ái lực ở độ pH=5,5 và độ pH=7,4 được tính toán đối với mỗi dòng để đánh giá sự liên kết phụ thuộc vào độ pH.

Bảng 14: So sánh sự liên kết của các dòng phụ thuộc vào độ pH với IL-6

Mẫu	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	KD(pH=5,5)/KD(pH=7,4)
Kiểu đại	pH=7,4	2,05E+07	3,91E-04	1,91E-11	0,8
	pH=5,5	1,52E+07	2,45E-04	1,61E-11	

Dòng vô tính 1	pH=7,4	1,07E+07	4,71E-03	4,38E-10	10,3
	pH=5,5	2,05E+06	9,26E-03	4,52E-09	
Dòng vô tính 2	pH=7,4	8,96E+06	2,63E-03	2,94E-10	13,5
	pH=5,5	2,76E+06	1,10E-02	3,98E-09	

Tỷ lệ ái lực ở độ pH=5,5 và độ pH=7,4 ((KD)(độ pH=5,5)/(KD)(độ pH=7,4)) được tính toán, tỷ lệ này chỉ ra mức liên kết phụ thuộc vào độ pH với IL-6 của người là 0,8, 10,3 và 13,5 lần lượt đối với kháng thể kháng IL6 kiểu đại, kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 1 và kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 2. Nghĩa là khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH của mỗi dòng cao gấp 10 lần so với khả năng của WT. Cảm biến đồ của kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 2 ở độ pH=7,4 và độ pH=5,5 được thể hiện trên FIG. 26.

Do đó, nhận thấy rằng như trong trường hợp kháng thể kháng thụ thể IL-6, kháng thể kháng IL-6 liên kết phụ thuộc vào độ pH, mà liên kết mạnh với kháng nguyên trong điều kiện trung tính của huyết tương nhưng liên kết yếu trong điều kiện axit nội thể nhân, có thể được tạo cấu trúc bằng cách đưa đoạn thay thế histidin hoặc đoạn tương tự chủ yếu vào các trình tự axit amin của CDR. Như được chỉ ra ở các Ví dụ từ 1 đến 15, kháng thể kháng thụ thể IL-6 có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH sẽ liên kết lặp lại với thụ thể IL-6 và PK/PD được cải thiện đáng kể. Nghĩa là thấy rằng kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 1 và kháng thể kháng IL6 dòng vô tính 2, có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH, liên kết lặp lại với nhiều kháng nguyên với PK/PD được cải thiện đáng kể so với kháng thể kháng IL6 kiểu đại.

Ví dụ 17: Cấu trúc của kháng thể kháng thụ thể IL-31 liên kết phụ thuộc vào độ pH
Biểu hiện và tính chế kháng thể kháng thụ thể IL-31

Trong các ví dụ từ 1 đến 15, nhiều kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6 đều được tạo ra thành công bằng cách tạo ra sự phụ thuộc này thông qua việc đưa các đoạn thay thế histidin và đoạn tương tự, vào vùng biến đổi, cụ thể là các trình tự CDR của các kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người. Đã phát hiện ra rằng tất cả các kháng thể này đều liên kết lặp lại với thụ thể IL-6 và chứng tỏ mức cải thiện đáng kể về PK/PD.

Do đó, đã xác nhận được rằng khả năng phụ thuộc vào độ pH của kháng thể liên kết với kháng nguyên có thể được tạo cho kháng thể khác mà liên kết với kháng nguyên

không phải thụ thể IL-6 bằng cách sử dụng phương pháp tương tự. Thụ thể IL-31 của chuột nhắt được lựa chọn làm kháng nguyên, và kháng thể kháng thụ thể IL-31 bao gồm chuỗi H (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 67) và chuỗi L (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 68), kháng thể này liên kết với thụ thể IL-31 của chuột nhắt như được mô tả trong WO 2007/142325, (“Kháng thể kháng IL31R kiểu đại”) đã được tạo cấu trúc. Bằng cách sử dụng phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, các đoạn gen mã hóa các trình tự axit amin của kháng thể nghiên cứu được cài vào vector biểu hiện tế bào động vật có vú để cấu trúc vector biểu hiện chuỗi H và vector biểu hiện chuỗi L đang nói đến. Trình tự nucleotit của vector biểu hiện thu được được xác định bằng phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể kháng IL31R kiểu đại được biểu hiện và tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

Cấu trúc của kháng thể kháng thụ thể IL-31 phụ thuộc vào độ pH

Để có khả năng phụ thuộc vào độ pH của kháng thể liên kết với thụ thể IL-31, các đột biến thay thế histidin được đưa vào các axit amin trong CDR của kháng thể kháng thụ thể IL-31 (kháng IL31R kiểu đại) bao gồm chuỗi H (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 67) và chuỗi L (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 68). Bằng cách các đột biến thay thế histidin trong các axit amin của CDR và sau đó sàng lọc, một số dòng vô tính có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH được thu. Mức liên kết ở độ pH=5,5 giảm đáng kể so với mức liên kết ở độ pH=7,4. Vị trí của đột biến thay thế histidin trong các dòng vô tính phụ thuộc vào độ pH được thể hiện trong Bảng 15. Một ví dụ là “Kháng thể kháng IL31R dòng vô tính 1” bao gồm chuỗi H (c1) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 69) và chuỗi L (WT). Kháng thể kháng IL31R dòng vô tính 1 được biểu hiện và tinh chế bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 1.

Bảng 15: Vị trí của đột biến thay thế histidin trong các dòng vô tính phụ thuộc vào độ pH

H33

Phân tích liên kết của các dòng vô tính phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-31 hòa tan

Việc phân tích động học của các phản ứng kháng nguyên-kháng thể ở độ pH=5,5 và độ pH=7,4 đã được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) đối với 2 loại kháng thể được tạo ra như được mô tả ở trên: kháng thể kháng IL31R kiểu đại và kháng thể kháng IL31R dòng vô tính 1 (dung dịch đệm: DPBS(-) (độ pH=7,4 hoặc 5,5), NaCl 150mM, Tween 20 0,01%, NaN₃ 0,02%). Kháng thể được liên kết với chip cảm biến đã được cố định protein tái tổ hợp A/G (recomb-protein A/G (Pierce)) bằng phương pháp liên hợp với amin, và tiếp theo thụ thể IL-31 hòa tan của chuột nhắt (được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong WO 2007/142325) được điều chỉnh tới nồng độ thích hợp được tiêm vào đó làm chất phân tích. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 25°C. Hằng số tốc độ kết hợp k_a (1/Ms) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/s) được tính bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)), và hằng số phân ly KD (M) được tính dựa trên các trị số này (Bảng 16). Hơn nữa, tỷ lệ ái lực ở độ pH=5,5 và độ pH=7,4 được tính đối với mỗi dòng để đánh giá sự liên kết phụ thuộc vào độ pH.

Bảng 16: So sánh sự liên kết của các dòng phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-31 của chuột nhắt

Mẫu	pH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	KD(pH=5,5)/KD(pH=7,4)
Kiểu đại	pH=7,4	1,40E+05	3,40E-03	2,30E-08	3,2
	pH=5,5	5,10E+05	3,80E-03	7,40E-08	
Dòng vô tính 1	pH=7,4	1,70E+05	3,30E-03	2,20E-08	1000,0
	pH=5,5	1,10E+03	2,40E-02	2,20E-05	

Tỷ lệ ái lực ở độ pH=5,5 và độ pH=7,4 ($(KD)(\text{độ pH}=5,5)/(KD)(\text{độ pH}=7,4)$) được tính toán, tỷ lệ này chỉ ra mức liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-31 của chuột nhắt, là 3,2 và 1000 lần lượt đối với kháng thể kháng IL31R kiểu đại và kháng thể kháng IL31R dòng vô tính 1. Nghĩa là, khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH của kháng thể kháng IL31R dòng vô tính 1 cao gấp 300 lần khả năng liên kết của WT. Cảm biến đồ của kháng thể kháng IL31R dòng vô tính 1 ở độ pH=7,4 và độ pH=5,5 được thể hiện trên FIG. 27.

Do đó, nhận thấy rằng, như trong trường hợp kháng thể kháng thụ thể IL-6 và

liên kết mạnh với kháng nguyên trong điều kiện trung tính của huyết tương nhưng liên kết yếu trong điều kiện axit nội thể nhân, có thể được tạo cấu trúc bằng cách đưa các đột biến thay thế histidin hoặc đột biến tương tự chủ yếu vào các trình tự axit amin của CDR. Như được chỉ ra trong các Ví dụ từ 1 đến 15, kháng thể kháng thụ thể IL-6 có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH sẽ liên kết lặp lại với thụ thể IL-6 và PK/PD được cải thiện đáng kể. Nghĩa là, đề xuất rằng kháng thể kháng IL31R dòng vô tính 1, có khả năng liên kết phụ thuộc vào độ pH, liên kết lặp lại với nhiều kháng nguyên với PK/PD được cải thiện đáng kể so với kháng thể kháng IL31R kiểu đại.

Ví dụ 18: Liên kết lặp lại với kháng nguyên bằng kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH

Biểu hiện và tính chất kháng thể được sử dụng cho chuột nhắt

Bốn kháng thể kháng thụ thể IL-6 được làm giống như của người được mô tả dưới đây đã được tạo ra. Do các kháng thể liên kết không phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6, WT-IgG1 bao gồm H (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 9) và L (WT) (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 10), và H54/L28-IgG1 bao gồm H54 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 70) và L28 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 12) được biểu hiện và tính chất bằng phương pháp được chỉ ra trong ví dụ 1. Khi các kháng thể liên kết phụ thuộc vào độ pH với thụ thể IL-6, H170/L82-IgG1 trong ví dụ 3 bao gồm H170 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 4) và L82 (trình tự axit amin: SEQ ID NO: 7), và Fv4-IgG1 trong ví dụ 10 bao gồm VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) và VL3-CK (SEQ ID NO: 27), được biểu hiện và tính chất bằng phương pháp được chỉ ra trong ví dụ 1.

Phân tích sự liên kết của mỗi loại kháng thể với thụ thể IL-6 hòa tan

Việc phân tích động học của các phản ứng kháng nguyên-kháng thể ở độ pH=7,4 và độ pH=5,8 được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T100 (GE Healthcare) đối với 4 loại kháng thể được tạo ra: WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 và Fv4-IgG1 (dung dịch đệm: MES 10mM (độ pH=7,4 hoặc độ pH=5,8), NaCl 150mM, chất hoạt động bề mặt-P20 0,05%). Các kháng thể này được liên kết trên chip cảm biến đã được cố định recomb-protein A/G (Pierce) bằng phương pháp liên hợp amin, và SR344 được điều chỉnh tới nồng độ thích hợp được tiêm vào đó làm chất phân tích. Việc kết hợp với

và phân ly ra khỏi SR344 của mỗi loại kháng thể được ghi lại dựa trên thời gian thực. Tất cả các phép đo đều được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Hằng số tốc độ kết hợp k_a (1/Ms) và hằng số tốc độ phân ly k_d (1/s) được tính bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Biacore T100 (Biacore T100 Evaluation Software) (GE Healthcare), và hằng số phân ly KD (M) được tính dựa trên các trị số này (Bảng 17).

Bảng 17: So sánh tốc độ kết hợp (k_a), tốc độ phân ly (k_d), và hằng số phân ly của mỗi loại kháng thể kháng thụ thể IL-6 hòa tan (SR344)

Mẫu	pH=7,4			pH=5,8			Phụ thuộc độ pH	
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	k_d (pH=5,8)/ k_d (pH=7,4)	k_d (pH=5,8)/ k_d (pH=7,4)
WT-IgG1	4,9E+05	9,4E-04	1,9E-09	8,9E+05	2,7E-03	3,1E-09	2,9	1,6
H54/L28-IgG1	8,3E+05	1,4E-03	1,7E-09	2,4E+06	2,7E-03	1,1E-09	2,0	0,7
H170/L28-IgG1	6,7E+05	1,1E-03	1,6E-09	1,2E+05	1,3E-02	1,0E-07	11,4	61,9
Fv4-IgG1	9,8E+05	9,5E-04	9,7E-10	1,4E+06	3,7E-02	2,6E-08	38,8	27,3

Tỷ lệ ái lực (KD) ở độ pH=5,8 và độ pH=7,4 đối với mỗi kháng thể được tính. Tỷ lệ KD, tỷ lệ này chỉ ra sự liên kết phụ thuộc vào độ pH với SR344, là 1,6, 0,7, 61,9 và 27,3 lần lượt đối với WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 và Fv4-IgG1. Ngoài ra, tỷ lệ tốc độ phân ly (k_d) ở độ pH=5,8 và độ pH=7,4 đối với mỗi kháng thể đã được tính. Tỷ lệ k_d , tỷ lệ này chỉ ra tốc độ phân ly phụ thuộc vào độ pH với SR344, là 2,9, 2,0, 11,4 và 38,8 lần lượt đối với WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 và Fv4-IgG1. Do đó, đã xác nhận được rằng H170/L82-IgG1 và Fv4-IgG1 có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, trong khi các kháng thể thông thường WT-IgG1 và H54/L28-IgG1 ít có khả năng này. Ngoài ra, do ái lực (KD) của các kháng thể này ở độ pH=7,4 là hầu như tương đương nên khả năng chúng liên kết với SR344 trong huyết tương được cho là tương đương.

Thử nghiệm được động học *in vivo* sử dụng chuột nhắt

Được động học của SR344 và kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người được đánh giá sau khi chỉ sử dụng SR344 (thụ thể IL-6 của người, bào chế được trong Ví dụ 1) hoặc sử dụng đồng thời SR344 và kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người cho chuột nhắt không biểu hiện thụ thể IL-6 của người (C57BL/6J; kháng thể kháng thụ thể IL-6 của

người không liên kết với thụ thể IL-6 của chuột nhắt). Dung dịch SR344 (5 μ g/mL) hoặc dung dịch hỗn hợp chứa SR344 và kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người (lần lượt là 5 μ g/mL và 0,1mg/mL) được sử dụng vào tĩnh mạch đuôi với liều duy nhất 10mL/kg. Do kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người có mặt với lượng dư đủ so với SR344 nên cho rằng hầu như tất cả các phân tử SR344 đều được liên kết bằng kháng thể này. Các mẫu máu đã thu ở thời điểm 15 phút, 2 giờ, 8 giờ, 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi sử dụng. Các mẫu máu đã thu được ly tâm ngay trong thời gian 15 phút ở tốc độ 15000 vòng/phút và ở nhiệt độ 4°C để thu được huyết tương. Huyết tương đã tách được bảo quản trong ngăn đá ở nhiệt độ -20°C hoặc thấp hơn cho đến khi đo. WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 và Fv4-IgG1 được mô tả ở trên được sử dụng làm kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người.

Đo nồng độ trong huyết tương của kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người bằng ELISA

Nồng độ kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người trong huyết tương của chuột nhắt được đo bằng ELISA. Mảnh kháng thể F(ab')₂ kháng IgG của người (đặc hiệu với chuỗi γ) (Sigma) được phân tán trên Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) và để qua đêm ở nhiệt độ 4°C để tạo ra các đĩa đã được cố định kháng IgG của người. Các mẫu đường cong hiệu chỉnh có nồng độ trong huyết tương là 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 và 0,0125 μ g/mL, và các mẫu huyết tương chuột nhắt đã pha loãng 100 lần hoặc nhiều hơn được bào chế. 200 μ L dung dịch SR344 20ng/mL được bổ sung vào 100 μ L mẫu đường cong hiệu chỉnh và mẫu huyết tương, và tiếp theo các mẫu này được để trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, các mẫu được phân tán vào các đĩa đã được cố định kháng IgG của người, và để trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, kháng thể kháng IL-6R của người được biotin hóa (Biotinylated Anti-Human IL-6R Antibody) (R&D) được bổ sung vào để phản ứng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) được bổ sung vào để phản ứng trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và phản ứng tạo màu được thực hiện bằng cách sử dụng TMP One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) làm cơ chất. Sau khi đập tắt phản ứng bằng dung dịch axit sulfuric 1N (Showa Chemical), độ hấp thụ ở bước sóng

450nm được đo bằng máy đọc vi đĩa. Nồng độ trong huyết tương của chuột nhắt được tính từ độ hấp thụ của đường cong hiệu chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm phân tích SOFTmax PRO (Molecular Devices). Khoảng thời gian theo nồng độ trong huyết tương sau khi sử dụng qua đường trong tĩnh mạch như đo được bằng phương pháp này được thể hiện trên FIG. 28.

Đo nồng độ SR344 trong huyết tương bằng phương pháp phát quang điện hóa

Nồng độ SR344 trong huyết tương chuột nhắt được đo bằng phương pháp phát quang điện hóa. Các mẫu đường cong hiệu chỉnh của SR344 đã điều chỉnh tới nồng độ 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 và 31,25pg/mL, và các mẫu huyết tương chuột nhắt đã pha loãng 50 lần hoặc hơn được chuẩn bị. Các mẫu này được trộn với dung dịch chứa kháng thể kháng IL-6R của người đơn dòng (Monoclonal Anti-human IL-6R Antibody) (R&D) đã được đánh dấu ruteni bằng Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery), kháng thể kháng IL-6R của người được biotin hóa (Biotinylated Anti-human IL-6R Antibody) (R&D) và WT-IgG1, và tiếp theo để phản ứng qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Nồng độ cuối cùng của WT-IgG1 là 333µg/mL, là nồng độ dư của kháng thể kháng thụ thể IL-6 của người chứa trong các mẫu, nhằm mục đích liên kết với hầu hết các phân tử SR344 trong mẫu với WT-IgG1. Tiếp theo, các mẫu được phân tán vào đĩa MA400 PR Streptavidin (MA400 PR Streptavidin Plate) (Meso Scale Discovery), và để phản ứng trong thời gian 1 ở nhiệt độ trong phòng, và rửa. Ngay sau khi phân tán Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery), việc đo được thực hiện bằng cách sử dụng máy đọc Sector PR 400 (Sector PR 400 Reader) (Meso Scale Discovery). Nồng độ của SR344 được tính dựa trên đáp ứng theo đường cong hiệu chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm phân tích SOFTmax PRO (Molecular Devices). Khoảng thời gian theo nồng độ SR344 trong huyết tương sau khi sử dụng qua đường trong tĩnh mạch như đo được bằng phương pháp này được thể hiện trên FIG. 29.

Tác dụng của sự liên kết phụ thuộc vào độ pH

Đối với khoảng thời gian theo nồng độ kháng thể WT-IgG1 và H54/L28-IgG1, các kháng thể này không chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, và H170/L82-IgG1 và Fv4-IgG1, các kháng thể này chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, khoảng thời gian

theo nồng độ là hầu như giống nhau đối với WT-IgG1, H54/L28-IgG1 và Fv4-IgG1, trong khi H170/L82-IgG1 được loại bỏ nhanh hơn không đáng kể. Số liệu về khoảng thời gian theo nồng độ trong huyết tương được phân tích bằng phần mềm phân tích được động học WinNonlin (Pharsight). Thời gian bán thải trong huyết tương của WT-IgG1, H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1 và H170/L28-IgG1 lần lượt là 21,0, 28,8, 26,2 và 7,5 ngày.

Như được mô tả trong ví dụ 2, khi kháng nguyên là kháng nguyên hòa tan, kháng thể được sử dụng sẽ liên kết với kháng nguyên trong huyết tương, và được giữ lại trong huyết tương dưới dạng phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Nói chung, khác với thời gian lưu kháng thể trong huyết tương rất dài (tốc độ loại bỏ là rất thấp) do chức năng của FcRn, thời gian lưu kháng nguyên trong huyết tương là ngắn (tốc độ loại bỏ là cao). Do đó, kháng nguyên được liên kết với kháng thể có thời gian lưu trong huyết tương được kéo dài giống như thời gian lưu của kháng thể (tốc độ loại bỏ là rất thấp). Tương tự, khi kháng nguyên của kháng thể thụ thể IL-6 được làm giống như của người, SR344 (thụ thể IL-6 hòa tan của người), được sử dụng một mình, SR344 được loại bỏ rất nhanh (thời gian bán thải trong huyết tương: 0,2 ngày). Tuy nhiên, trong trường hợp sử dụng đồng thời SR344 với kháng thể thông thường, WT-IgG1 hoặc H54/L28-IgG1, các kháng thể này không chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, tốc độ loại bỏ của SR344 giảm đáng kể, và thời gian lưu trong huyết tương của SR344 được kéo dài (thời gian bán thải trong huyết tương: 5,3 ngày đối với WT-IgG1, 6,3 ngày đối với H54/L28-IgG1). Điều này là do hầu như tất cả các phân tử SR344 molecules đều được liên kết bởi các kháng thể được sử dụng cùng nhau, và do đó SR344 được các kháng thể này liên kết có thời gian lưu trong huyết tương được kéo dài giống như thời gian lưu của kháng thể, do chức năng của FcRn như được mô tả ở trên.

Trong trường hợp sử dụng đồng thời SR344 với kháng thể H170/L82-IgG1 hoặc Fv4-IgG1, các kháng thể này chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, việc loại bỏ SR344 là rất nhanh (thời gian bán thải trong huyết tương: 1,3 ngày đối với H170/L82-IgG1, 0,6 ngày đối với Fv4-IgG1), so với trường hợp sử dụng đồng thời với WT-IgG1 hoặc H54/L28-IgG1. Xu hướng này là đặc biệt rõ rệt đối với Fv4-IgG1. Do ái lực của Fv4-IgG1 ở độ pH=7,4 là tương đương hoặc mạnh hơn ái lực của WT-IgG1 và

H54/L28-IgG1, được cho rằng gần như tất cả các phân tử SR344 đều được liên kết với Fv4-IgG1. Ngay cả khi Fv4-IgG1 chứng tỏ thời gian lưu trong huyết tương tương đương hoặc lâu hơn không đáng kể và tốc độ loại bỏ chậm hơn so với WT-IgG1 và H54/L28-IgG1, thì việc loại bỏ SR344 đã liên kết với Fv4-IgG1 là rất nhanh. Điều này có thể giải thích được bằng kỹ thuật theo sáng chế như được thể hiện trên FIG. 4. Trong trường hợp các kháng thể thông thường không chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, thì phức hợp kháng thể-kháng nguyên hòa tan được hấp thụ vào thể nhân bằng quá trình ẩm bào trong huyết tương, và liên kết với FcRn được biểu hiện trong thể nhân trong điều kiện axit nội thể nhân. Do phức hợp kháng thể-kháng nguyên hòa tan đã liên kết với FcRn chuyển tới bề mặt tế bào như thường lệ, và lại quay về huyết tương, kháng nguyên đã liên kết với kháng thể có thời gian lưu trong huyết tương được kéo dài giống như thời gian lưu của kháng thể (việc loại bỏ là rất chậm). Mặt khác, trong trường hợp các kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, kháng nguyên sẽ phân ly ra khỏi kháng thể trong điều kiện axit nội thể nhân, và do đó chỉ có kháng thể liên kết với FcRn và quay trở lại huyết tương. Do kháng nguyên đã phân ly ra khỏi kháng thể bị phân hủy trong lysosom mà không quay trở lại huyết tương nên việc loại bỏ kháng nguyên là rất nhanh so với trường hợp các kháng thể không chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH. Tức là trong trường hợp sử dụng đồng thời SR344 với kháng thể WT-IgG1 hoặc H54/L28-IgG1, các kháng thể này không chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, việc loại bỏ SR344 với mức độ tương tự như kháng thể, do SR344 liên kết với WT-IgG1 hoặc H54/L28-IgG1 cả trong huyết tương lẫn trong thể nhân. Trái lại, trong trường hợp sử dụng đồng thời SR344 với kháng thể H170/L82-IgG1 hoặc Fv4-IgG1, các kháng thể này chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, việc loại bỏ SR344 là rất nhanh, do SR344 phân ly ra khỏi kháng thể trong môi trường có độ pH thấp nội thể nhân. Nghĩa là, do các kháng thể H170/L28-IgG1 và Fv4-IgG1, các kháng thể chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH, phân ly ra khỏi SR344 trong môi trường có độ pH thấp nội thể nhân nên phần lớn H170/L82-IgG1 hoặc Fv4-IgG1 đã quay trở lại huyết tương bằng FcRn được tin là không được liên kết với SR344. Do đó, như được thể hiện trên FIG. 4, cho thấy rằng bằng cách phân ly ra khỏi kháng nguyên trong môi trường có độ pH thấp nội thể nhân và

quay trở lại huyết tương bằng FcRn mà không liên kết với kháng nguyên, kháng thể chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH có thể lại liên kết với kháng nguyên trong huyết tương. Cũng đã biết rằng bằng cách lặp lại quy trình này, kháng thể chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH có thể liên kết lặp lại với nhiều kháng nguyên. Điều này phù hợp với số liệu Biacore được thể hiện trong ví dụ 7, cho thấy rằng các kháng thể phụ thuộc vào độ pH có thể liên kết lặp lại với các kháng nguyên. Do đó, bằng cách tăng cường sự liên kết phụ thuộc vào độ pH của kháng thể với kháng nguyên, số lần liên kết với kháng nguyên lặp lại có thể tăng lên.

Khi kháng nguyên là kháng nguyên hòa tan, và kháng nguyên này liên kết với kháng thể trong điều kiện trung tính của huyết tương, nhưng phân ly ra khỏi kháng thể trong thể nhân và kháng thể quay trở lại huyết tương bằng FcRn, kháng thể này lại có thể liên kết với kháng nguyên trong điều kiện trung tính của huyết tương. Do đó, kháng thể có khả năng phân ly ra khỏi kháng nguyên trong điều kiện axit nội thể nhân có thể liên kết với kháng nguyên nhiều lần. So với khi kháng nguyên đã liên kết với kháng nguyên không phân ly ra khỏi kháng thể này trong thể nhân (tức là kháng nguyên đã liên kết với kháng thể sẽ quay trở lại huyết tương), nếu kháng nguyên đã liên kết với kháng thể phân ly ra khỏi kháng thể này trong thể nhân thì tốc độ loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương gia tăng, do kháng nguyên này được chuyển tới lysosom và bị phân hủy. Do đó, tốc độ loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương có thể được sử dụng làm chỉ số để xác định kháng thể nào liên kết với kháng nguyên nhiều lần. Việc xác định tốc độ loại bỏ kháng nguyên trong huyết tương có thể thực hiện được, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng nguyên và kháng thể *in vivo*, và tiếp theo đo nồng độ kháng nguyên trong huyết tương sau khi sử dụng, như được thể hiện trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Kháng thể có sự liên kết phụ thuộc vào độ pH có thể liên kết lặp lại với nhiều kháng nguyên khác với trường hợp kháng thể thông thường không chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH. Do đó, lượng kháng thể được sử dụng có thể giảm đáng kể, và khoảng thời gian sử dụng có thể kéo dài hơn.

Sự liên kết lặp lại với nhiều kháng nguyên trong cơ chế này là dựa trên phản ứng kháng nguyên-kháng thể phụ thuộc vào độ pH. Do đó, bất kể loại kháng nguyên nào,

nếu kháng thể chứng tỏ sự liên kết phụ thuộc vào độ pH liên kết với kháng nguyên ở độ pH=7,4 của huyết tương nhưng phân ly ra khỏi kháng nguyên ở độ pH axit nội thể nhân có thể được tạo cấu trúc, tiếp theo kháng thể này có thể liên kết lặp lại với nhiều kháng nguyên. Do đó, kỹ thuật theo sáng chế hữu ích ở chỗ nó có thể áp dụng không chỉ cho các kháng thể kháng thụ thể IL-6, IL-6 và thụ thể IL-31, mà còn đối với kháng thể bất kỳ kháng kháng nguyên bất kỳ, bất kể loại kháng nguyên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Dược phẩm chứa kháng thể có thời gian bán thải kéo dài trong huyết thanh, trong đó ít nhất một axit amin trong vùng biến đổi được thay thế bằng histidin, hoặc ít nhất một histidin được cài vào vùng biến đổi, trong đó kháng thể này có trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, được xác định là tỷ số của KD đối với kháng nguyên ở độ $pH=5,8$ và KD đối với kháng nguyên ở độ $pH=7,4$, nằm trong khoảng từ 2 đến 10000.
2. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, được xác định là tỷ số của KD đối với kháng nguyên của kháng thể ở độ $pH=5,8$ và KD đối với kháng nguyên của kháng thể ở độ $pH=7,4$, bằng 10 hoặc lớn hơn.
3. Dược phẩm theo điểm 1, trong đó trị số $KD(pH=5,8)/KD(pH=7,4)$, được xác định là tỷ số của KD đối với kháng nguyên của kháng thể ở độ $pH=5,8$ và KD đối với kháng nguyên của kháng thể ở độ $pH=7,4$, bằng 40 hoặc lớn hơn.
4. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể có hoạt tính đối kháng.
5. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể liên kết với kháng nguyên màng hoặc kháng nguyên hòa tan.
6. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể là kháng thể liên kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, thụ thể IL-2, thụ thể IL-6, thụ thể OSM, gp130, thụ thể IL-5, CD40, CD4, Fas, osteopontin, CRTH2, CD26, PDGF-D, CD20, yếu tố hóa ứng động tế bào mono, CD23, TNF- α , HMGB-1, $\alpha 4$ integrin, ICAM-1, CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BLYS, HLA-DR, TGF- β , CD52, và thụ thể IL-31.

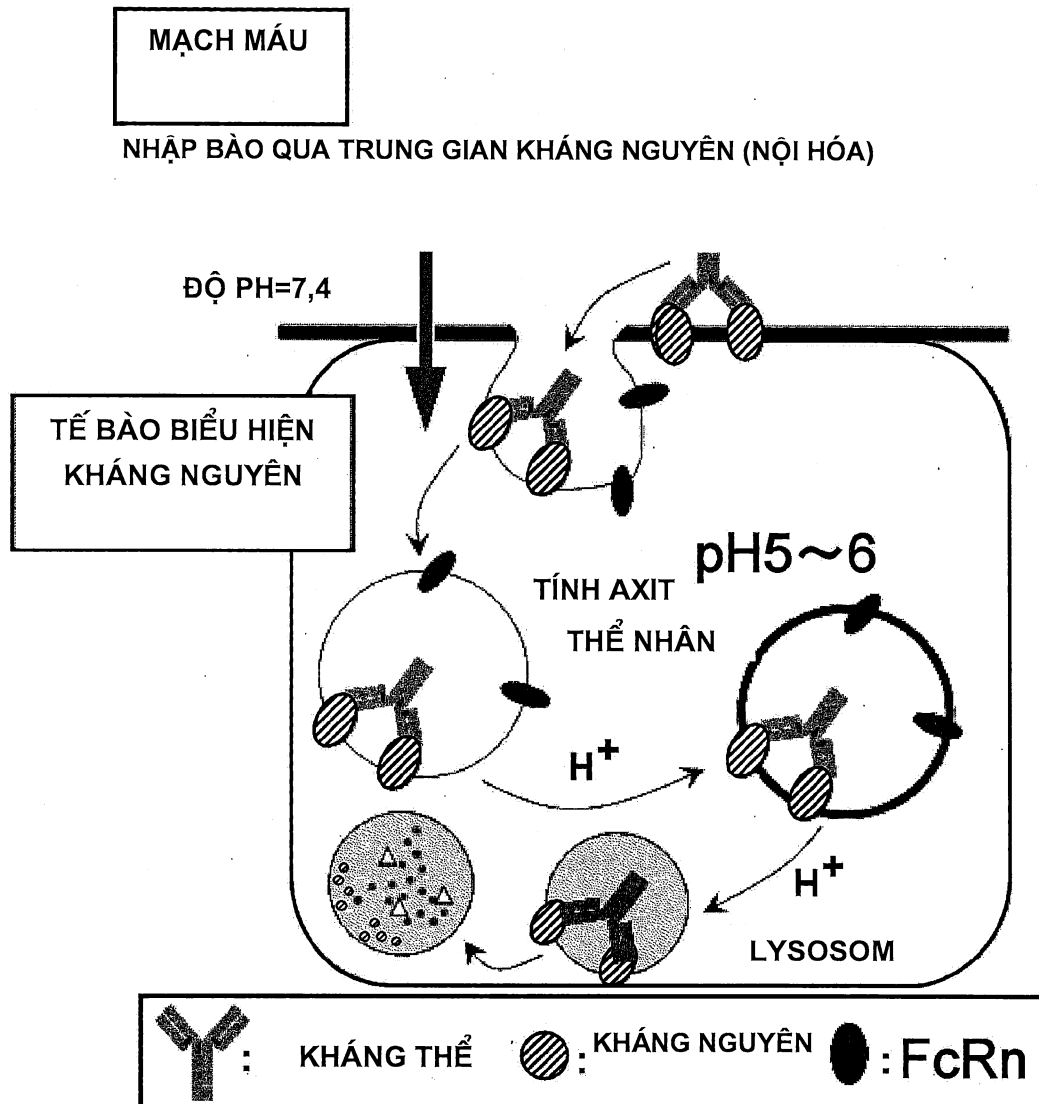


FIG. 1

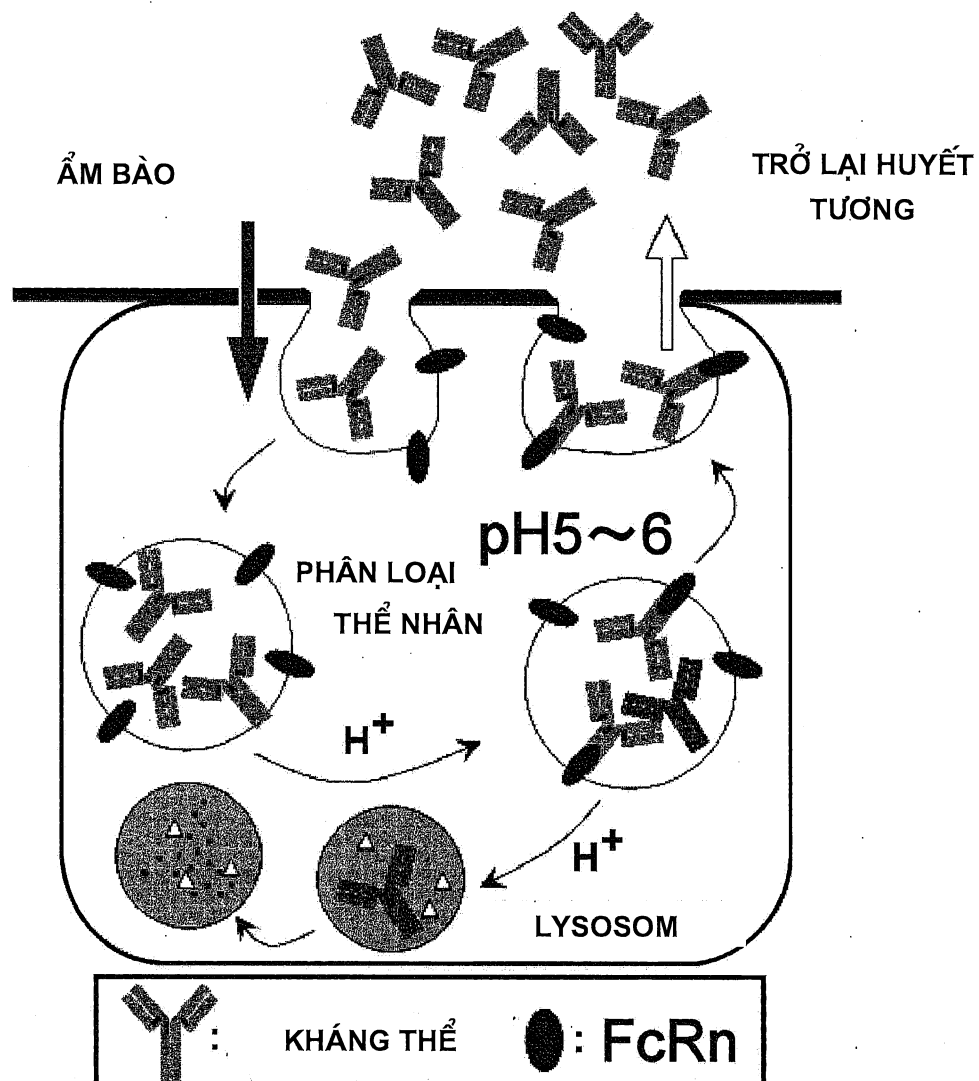


FIG. 2

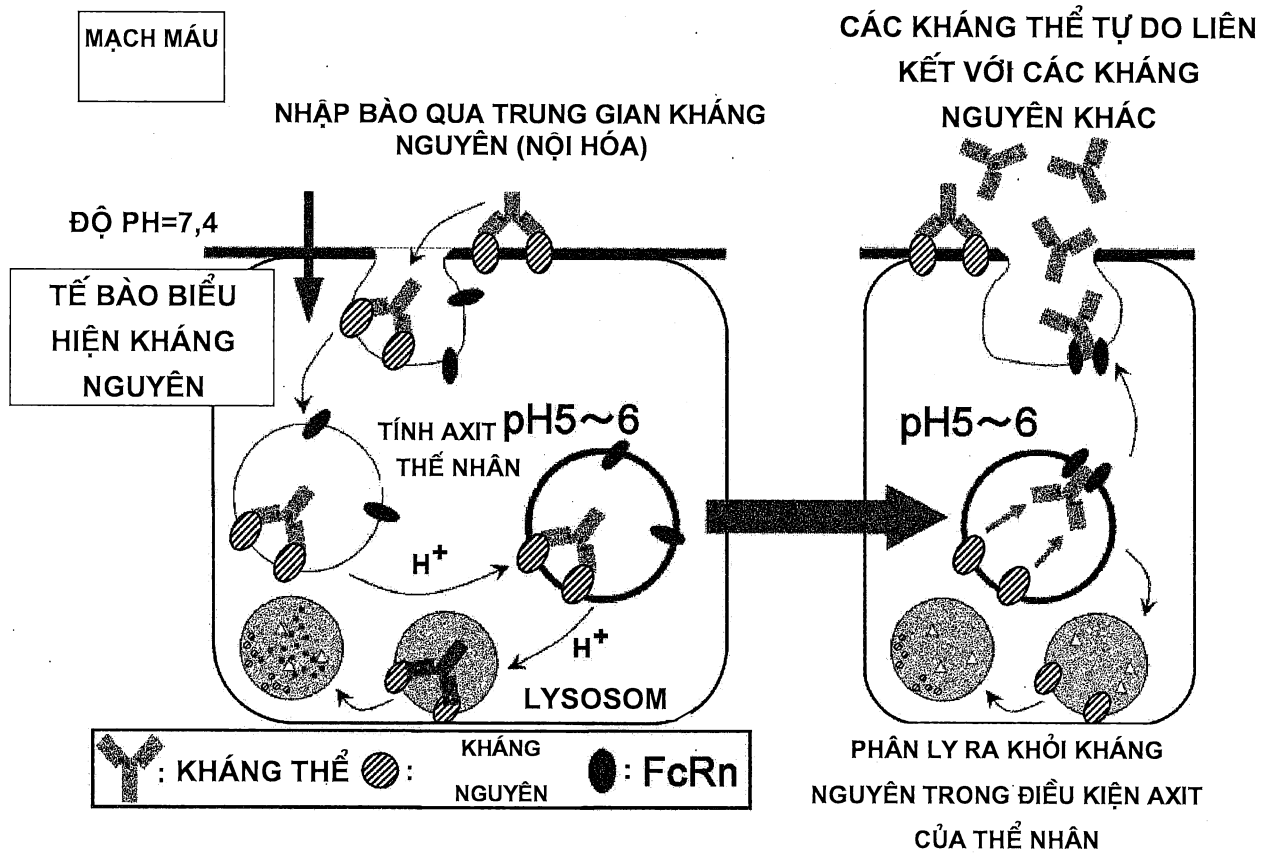


FIG. 3

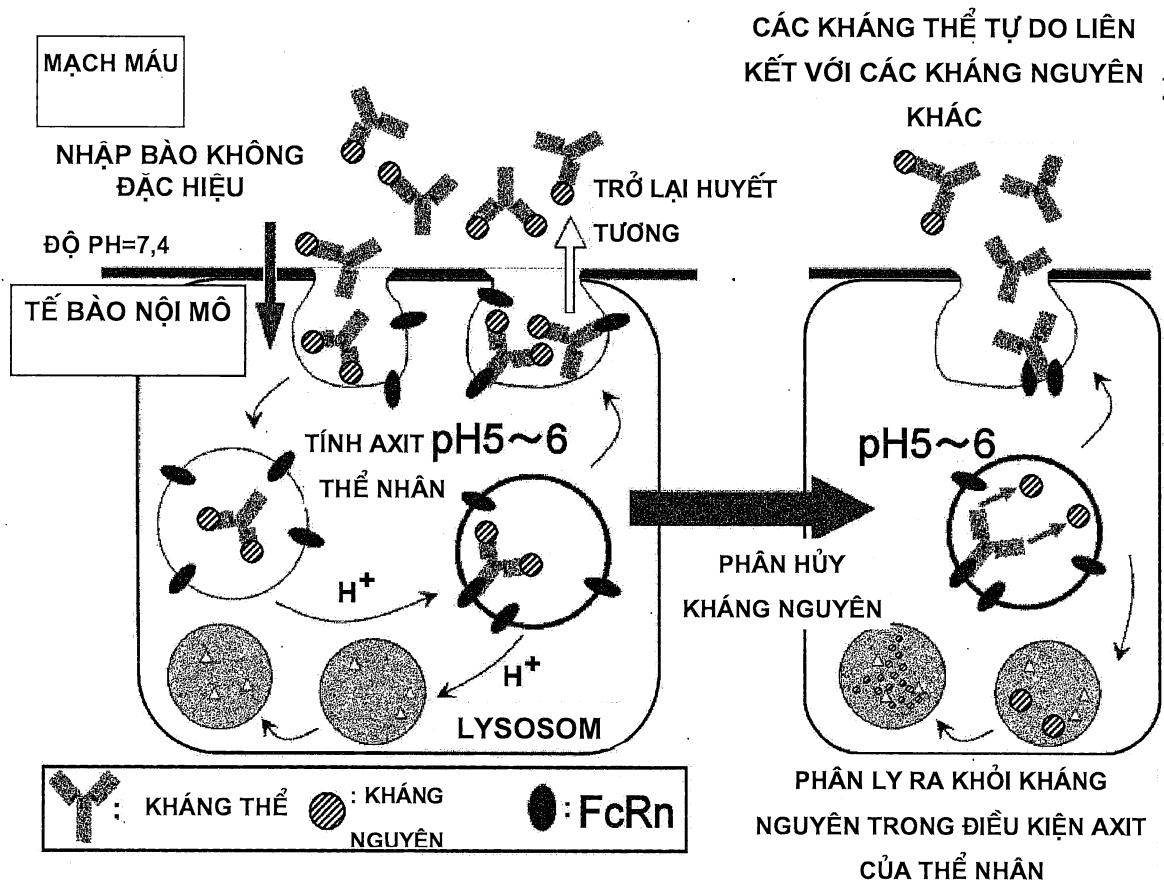


FIG. 4

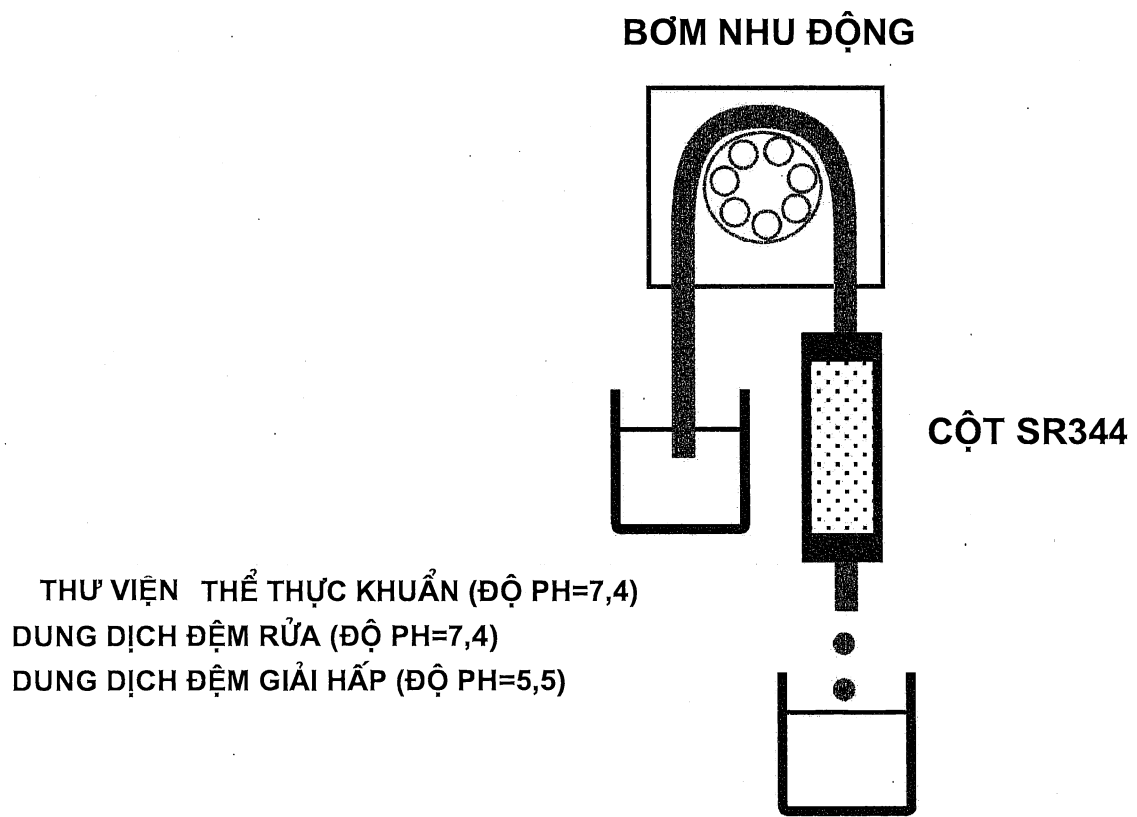


FIG. 5

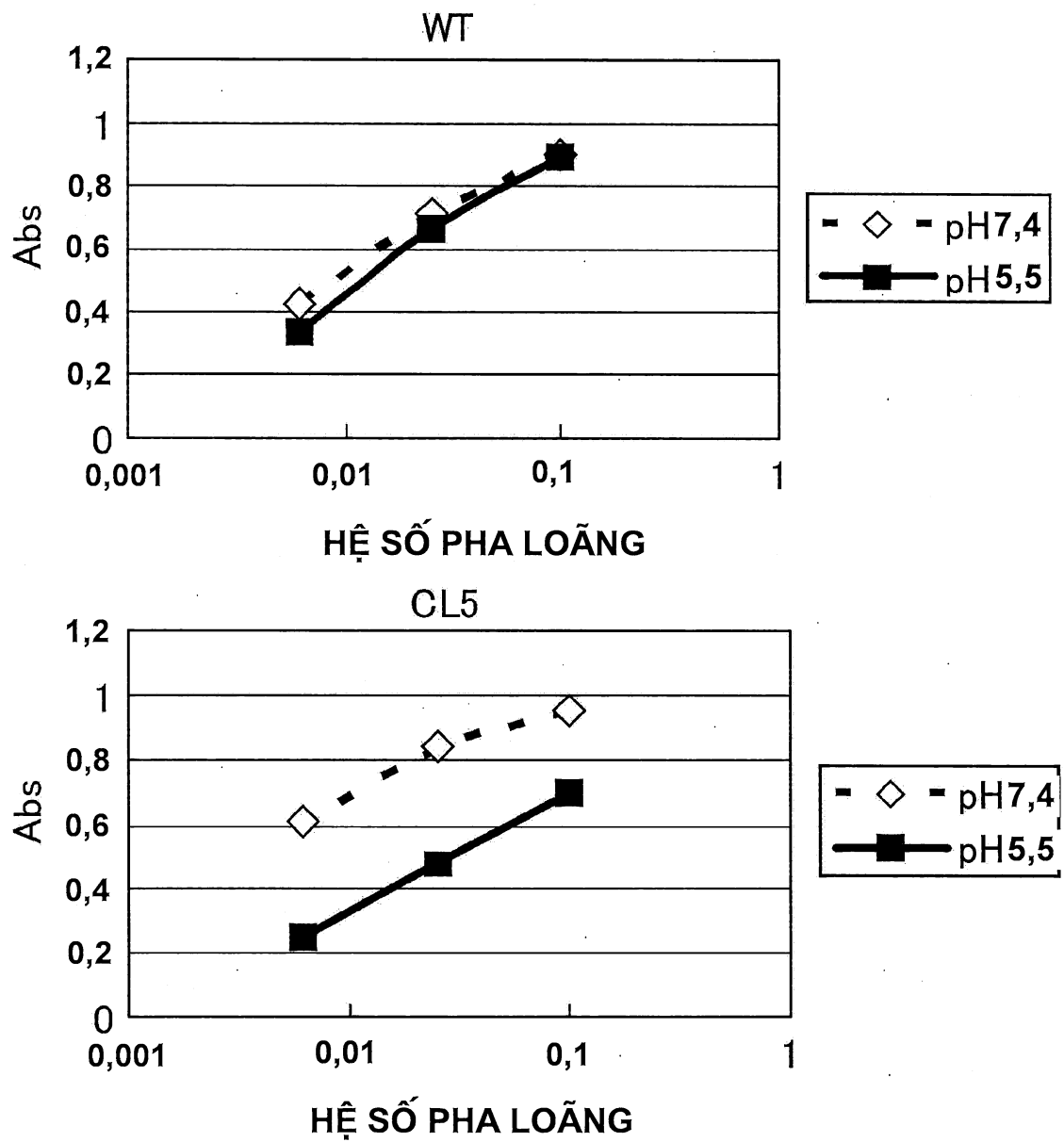


FIG. 6

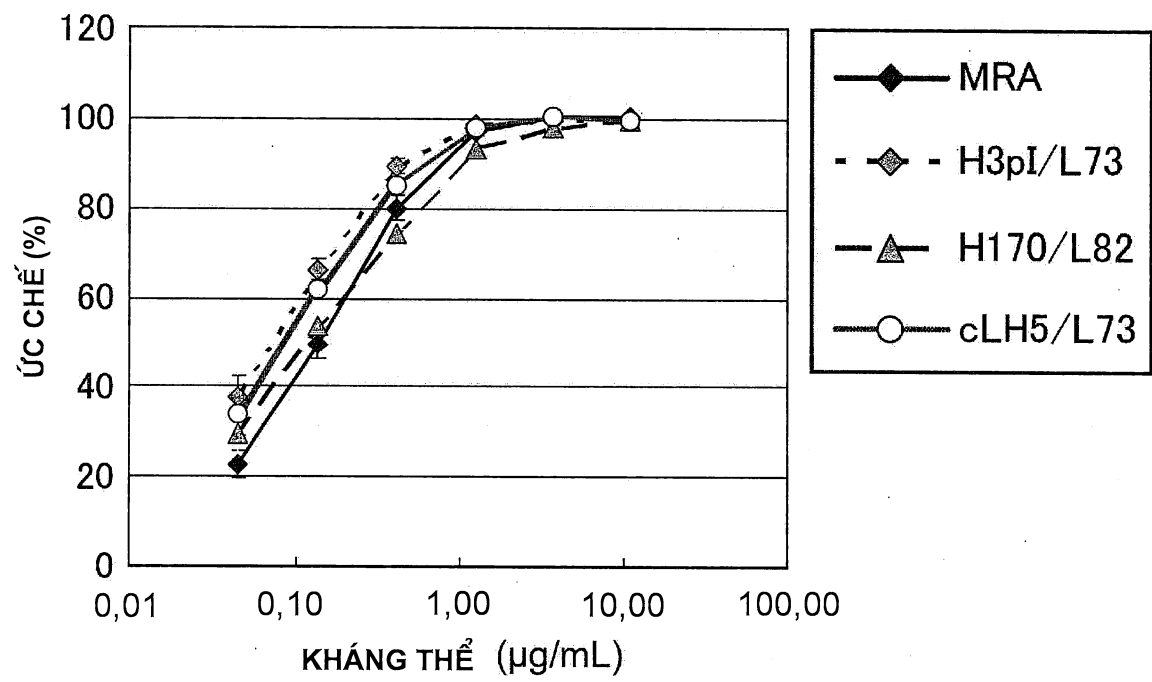


FIG. 7

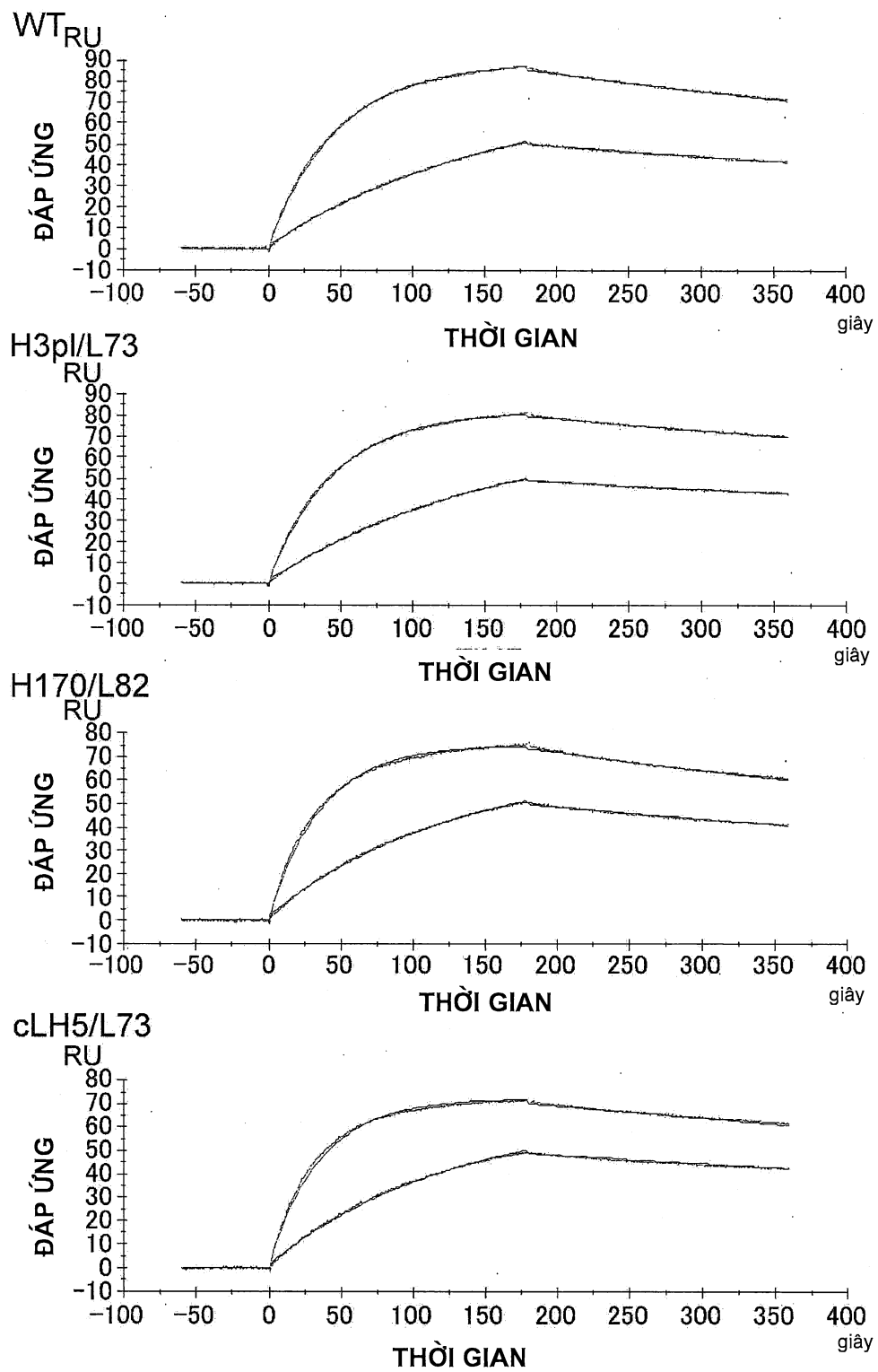


FIG. 8

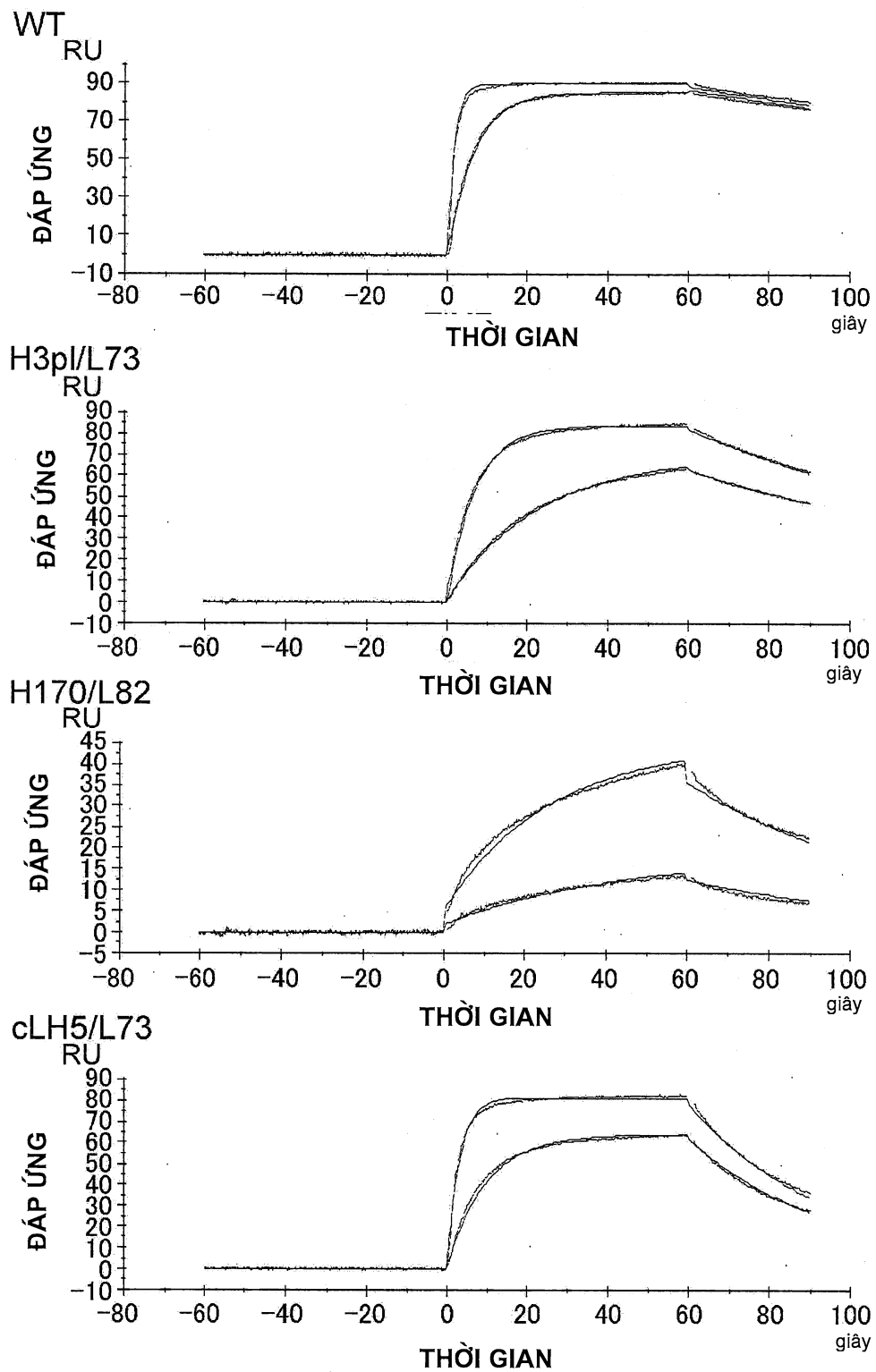


FIG. 9

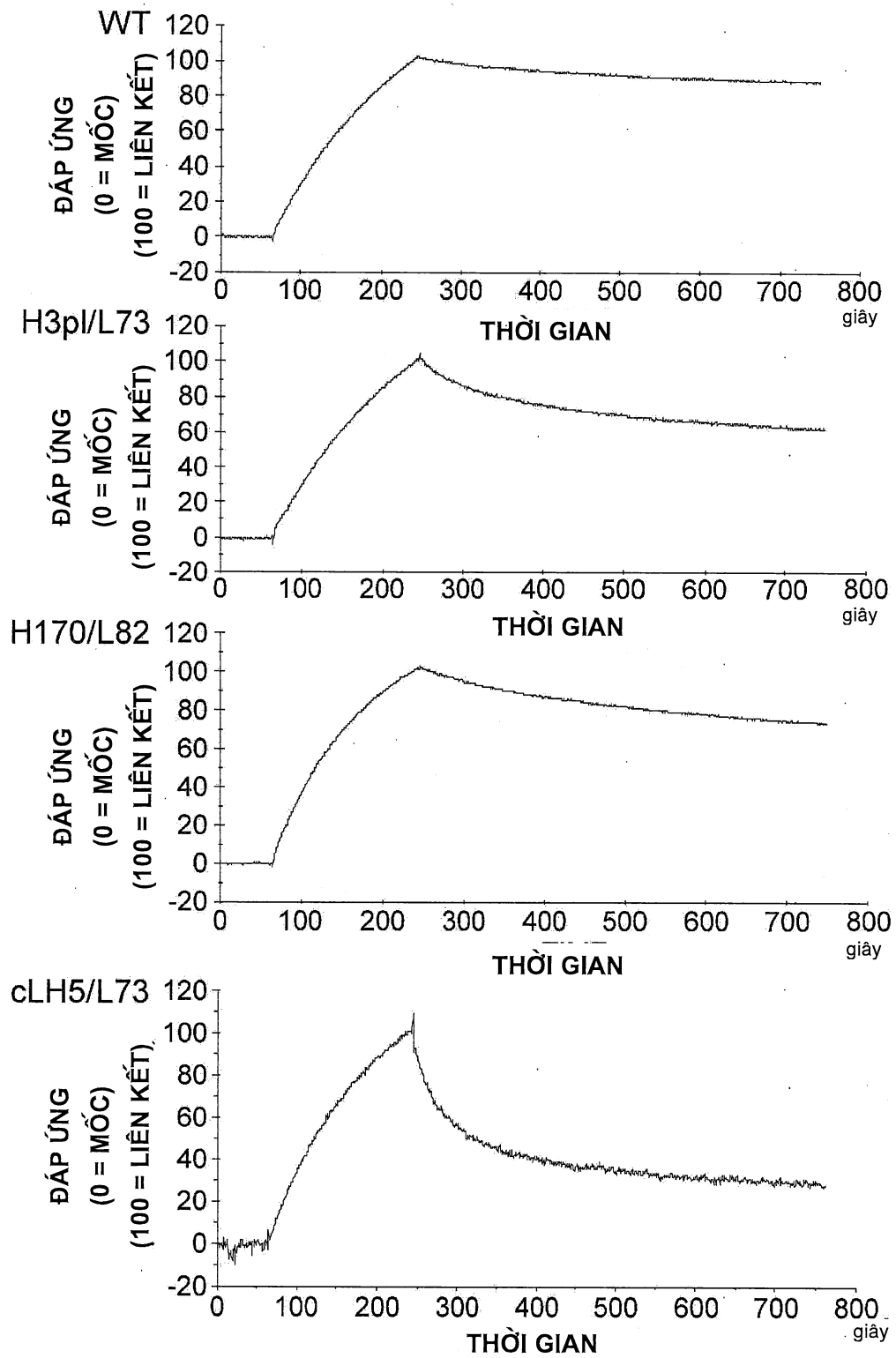


FIG. 10

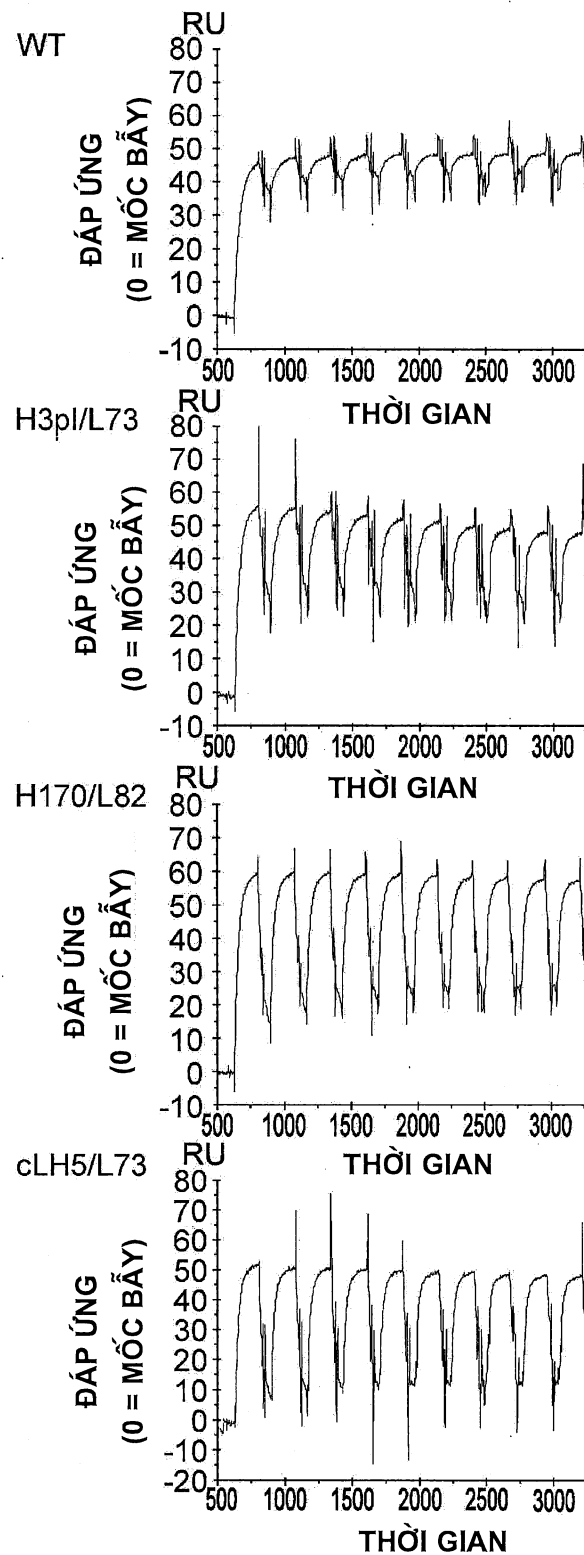


FIG. 11

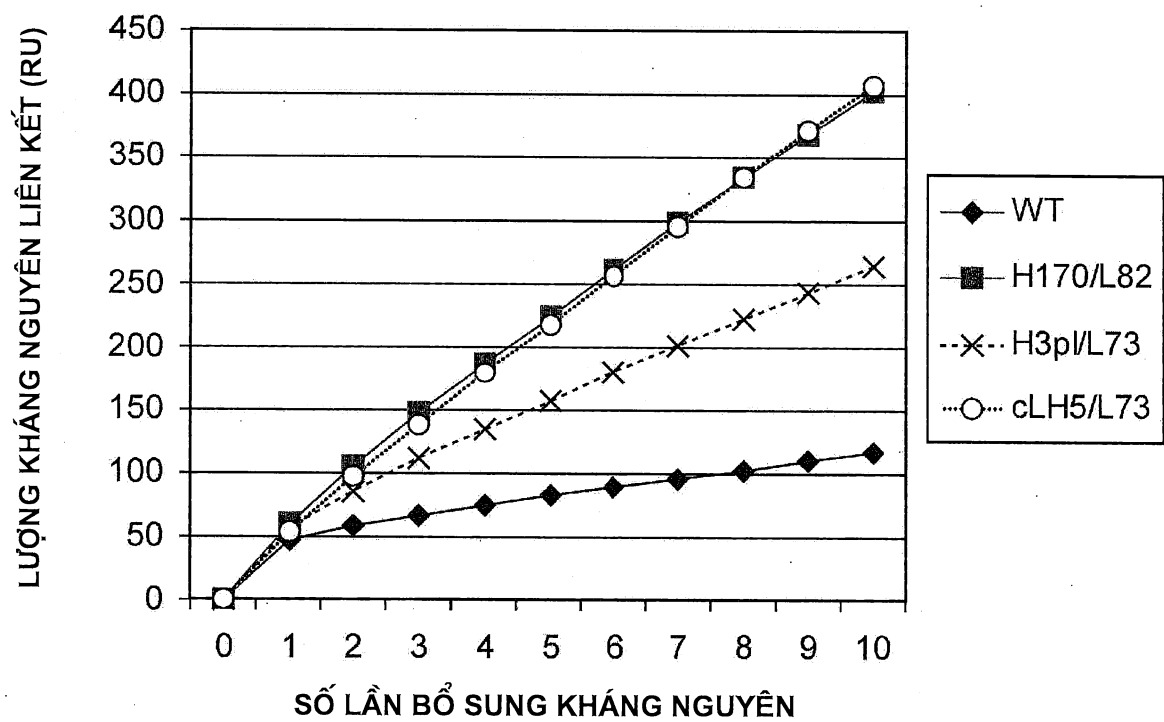


FIG. 12

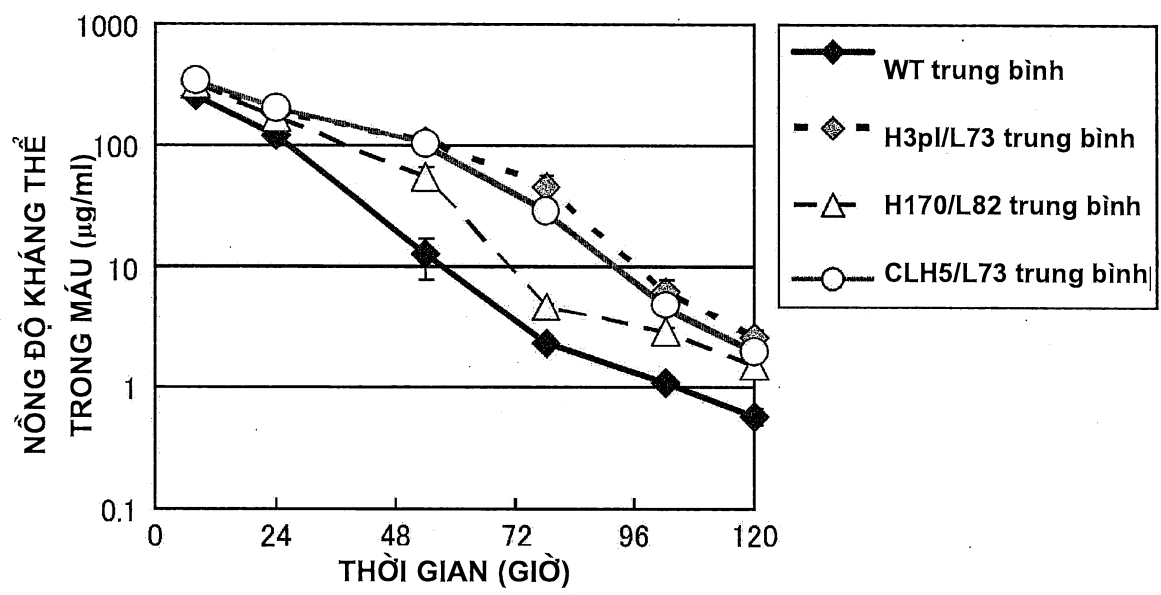


FIG. 13

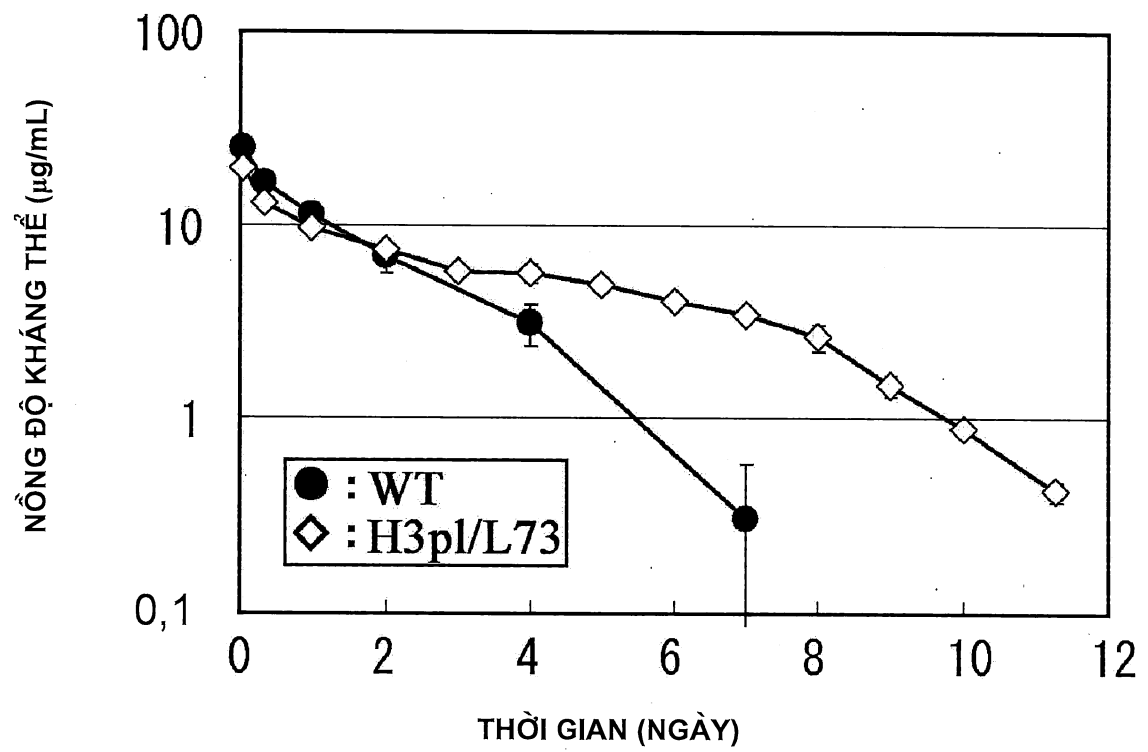


FIG. 14

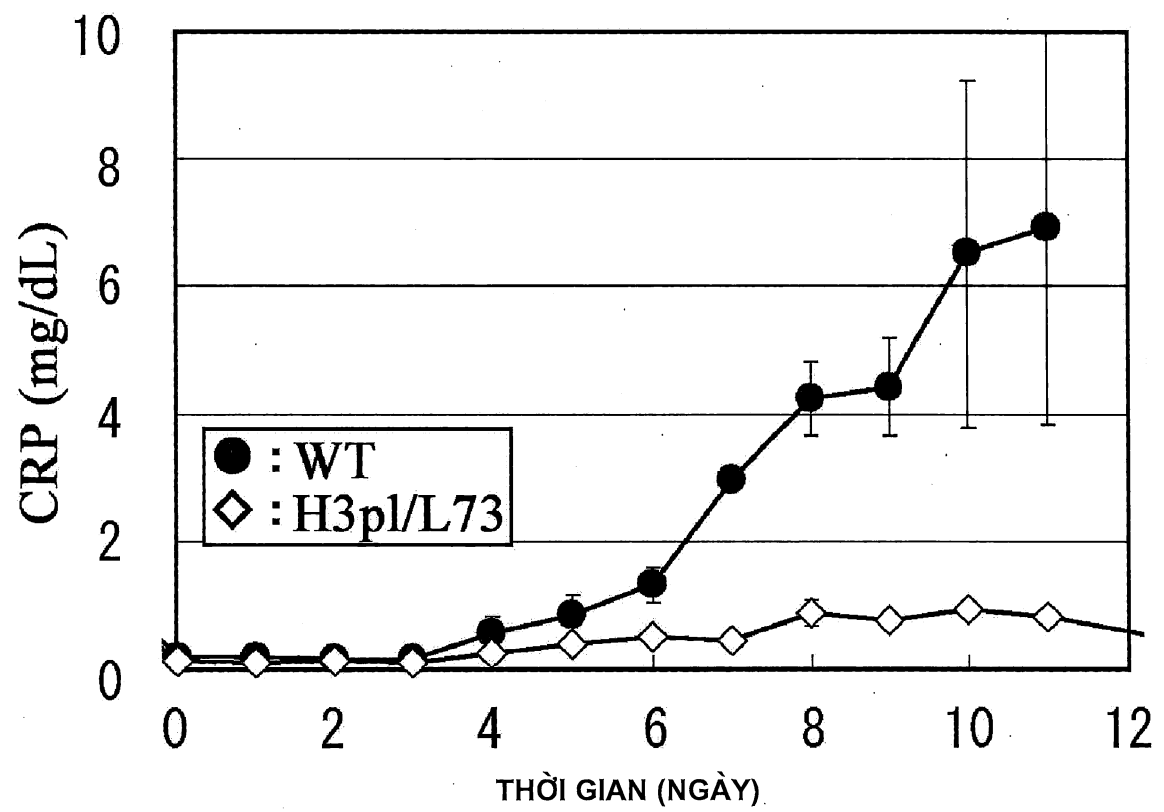


FIG. 15

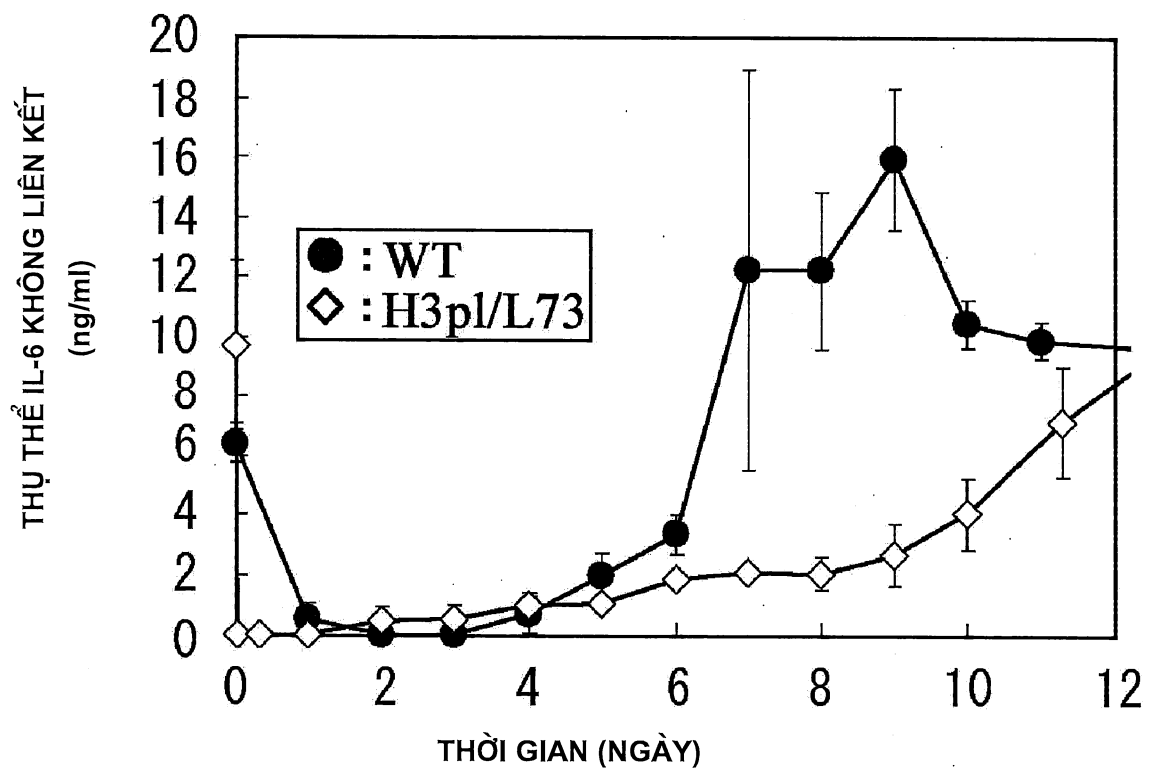


FIG. 16

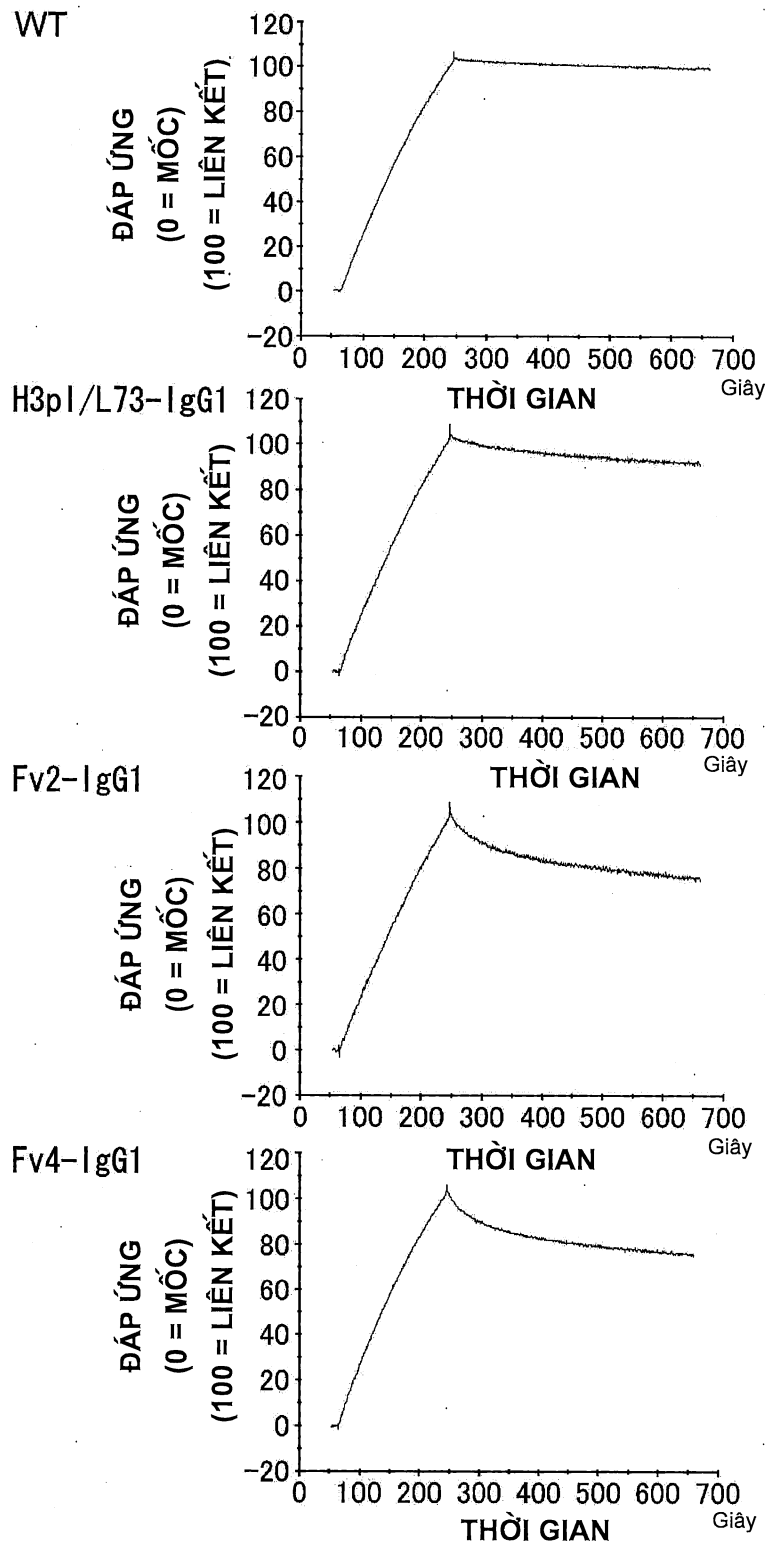


FIG. 17

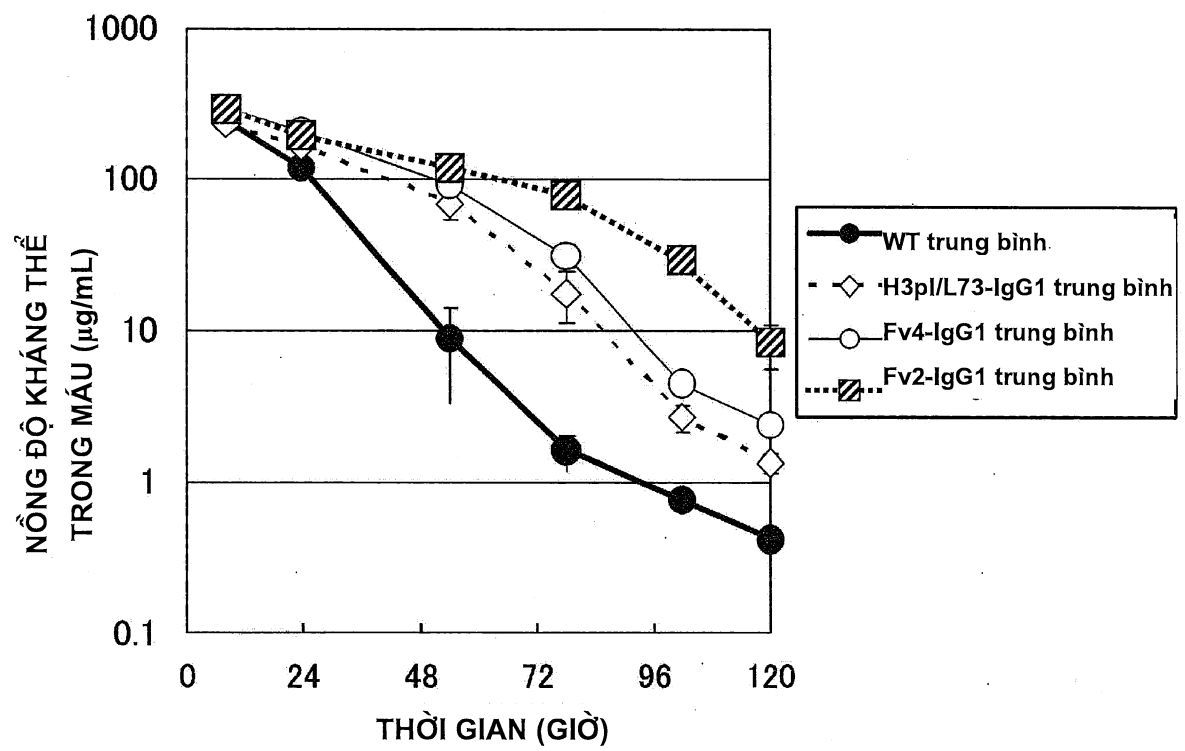


FIG. 18

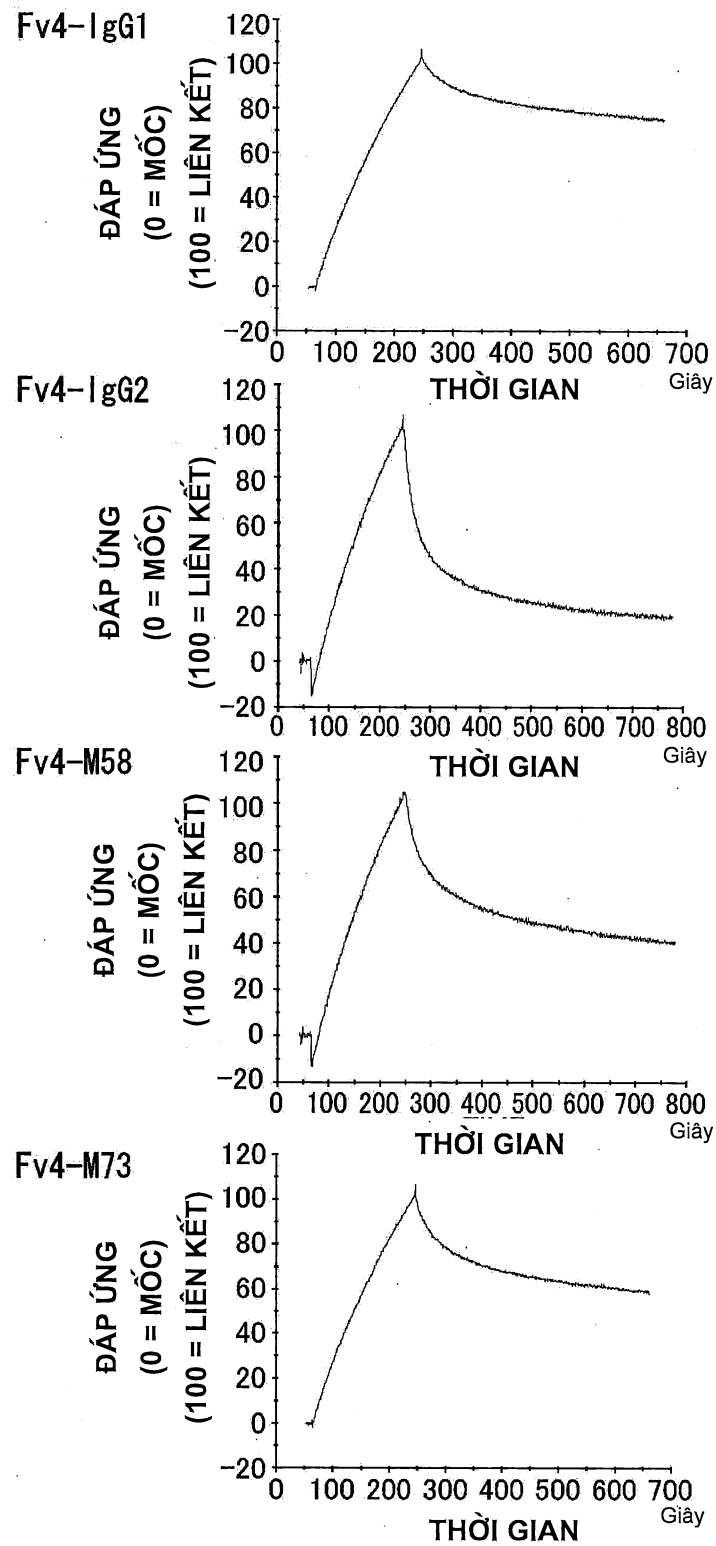


FIG. 19

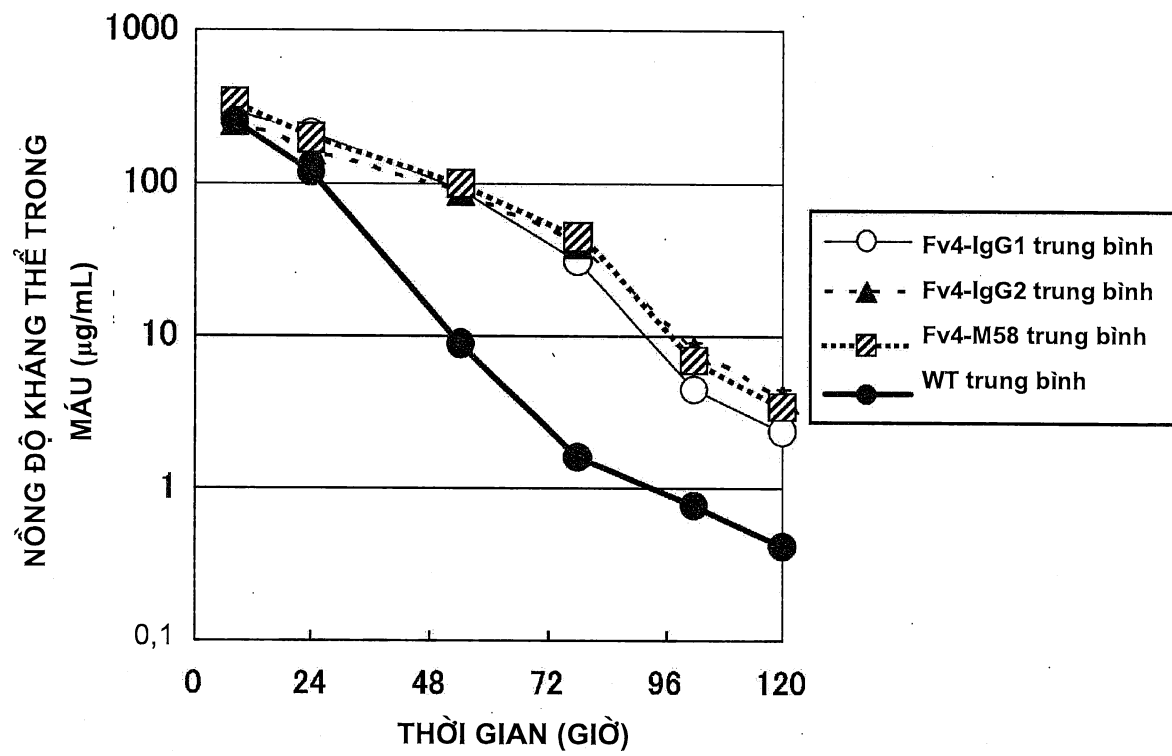


FIG. 20

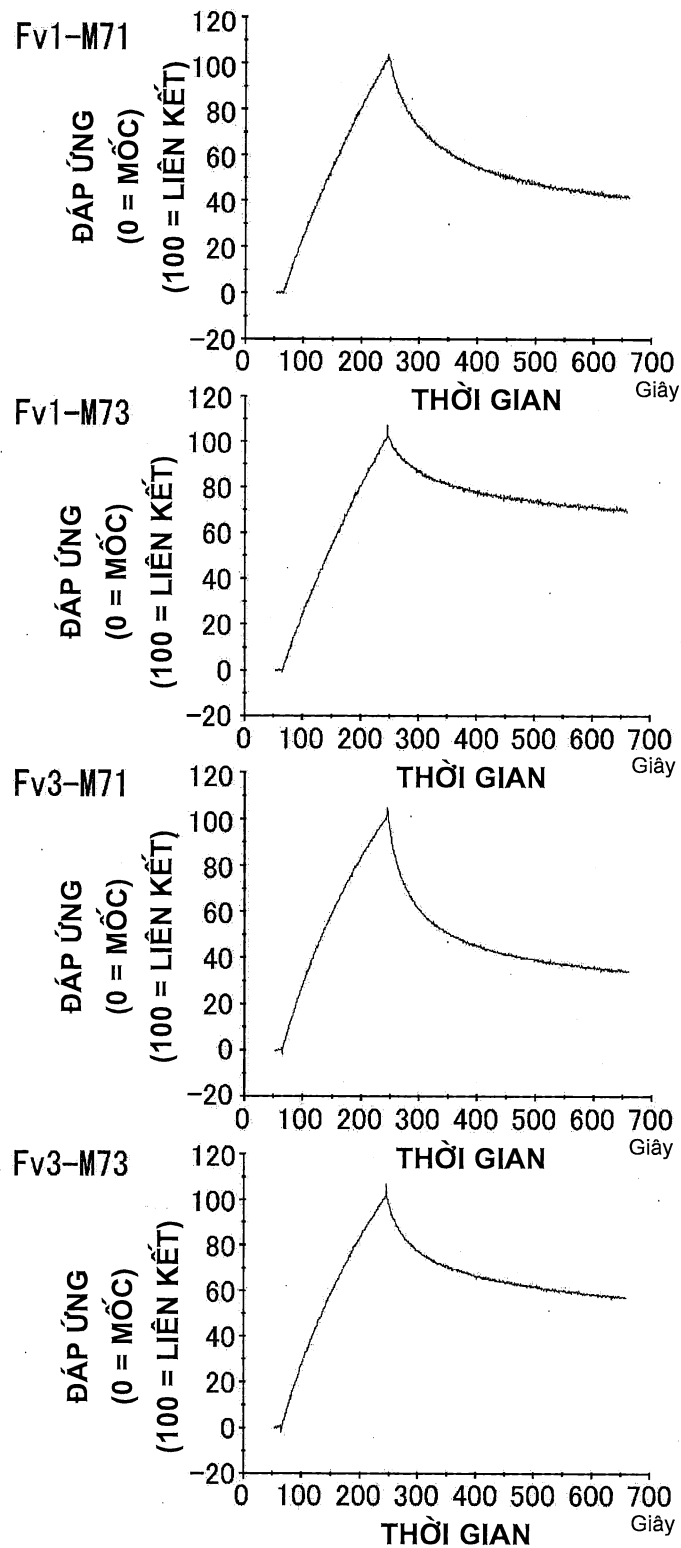


FIG. 21

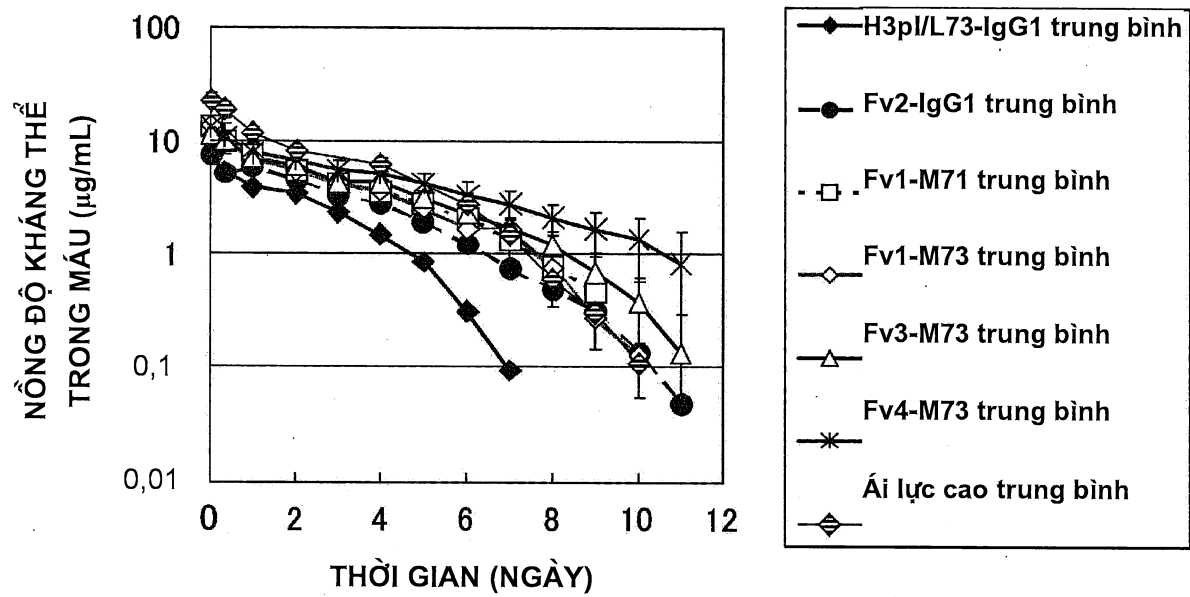


FIG. 22

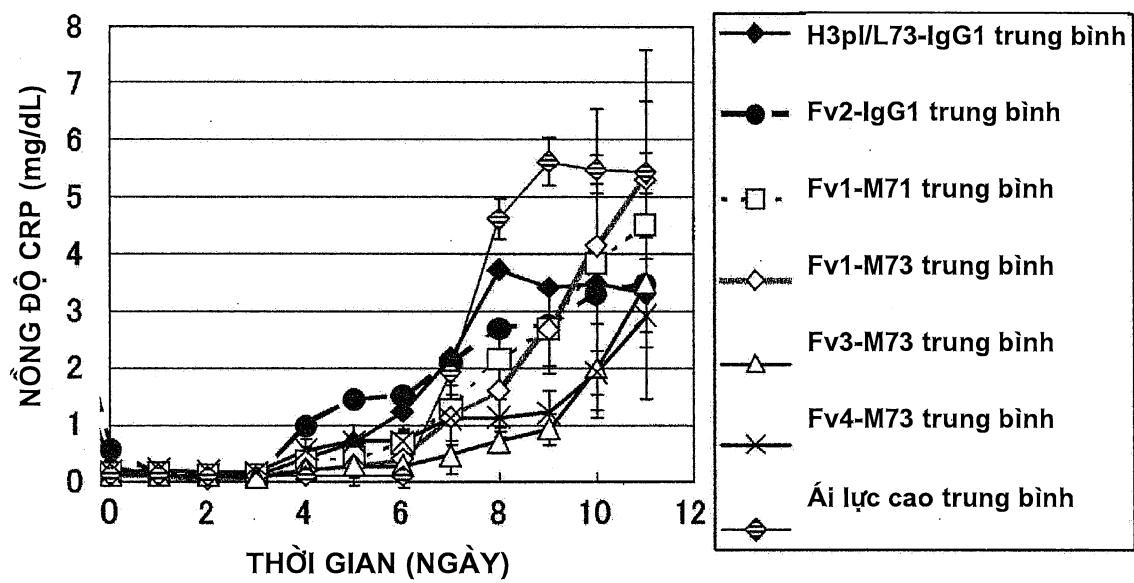


FIG. 23

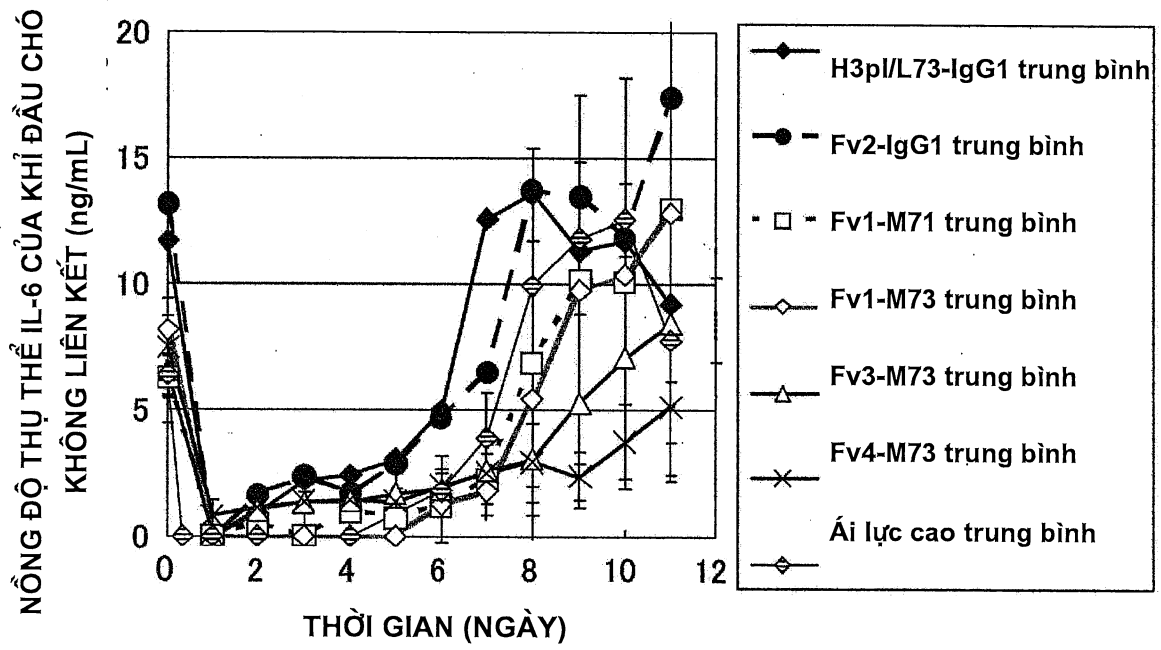


FIG. 24

CHUỐI NẶNG									
VH1 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	HISYSGITNYPHLQD						
VH2 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	HISYSGITNYPHLQD						
VH3 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGHSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	FISYSGITNYPNPSLQG						
VH4 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGHSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	FISYSGITNYPNPTLQG						
	*		*						
FR1	CDR1	FR2	CDR2						
VH1 : RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAAYYCAR	FLARITAHDH	WGEGTLVTVSS							
VH2 : RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAAYYCAR	FLARITAHDH	WGEGTLVTVSS							
VH3 : RVTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SLARITANDY	WGEGTLVTVSS							
VH4 : RVTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	SLARITANDY	WGEGTLVTVSS							
	*	***	***	*	*	*	*		
	FR3			CDR3	FR4				
CHUỐI NHẸ									
VL1 DIQMTQSPSSLASVGDSTITC	QASRDISSHLN	WYQQKPKGKAPPELLIY	YGSHLLS	GVPSRFSGSGGDTFTTISSEADAATYYC	GGGNRLPYT	FGGGTKVEIE			
VL2 DIQMTQSPSSLASVGDSTITC	QASRDISSHLN	WYQQKPKGKAPPELLIY	YGSHLES	GVPSRFSGSGGDTFTTISSEADAATYYC	GGGNRLPYT	FGGGTKVEIE			
VL3 DIQMTQSPSSLASVGDSTITC	QASTDISSHLN	WYQQKPKGKAPPELLIY	YGSHLLS	GVPSRFSGSGGDTFTTISSEADAATYYC	GGGNRLPYT	FGGGTKVEIE			
	*		*						
FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4			

FIG. 25

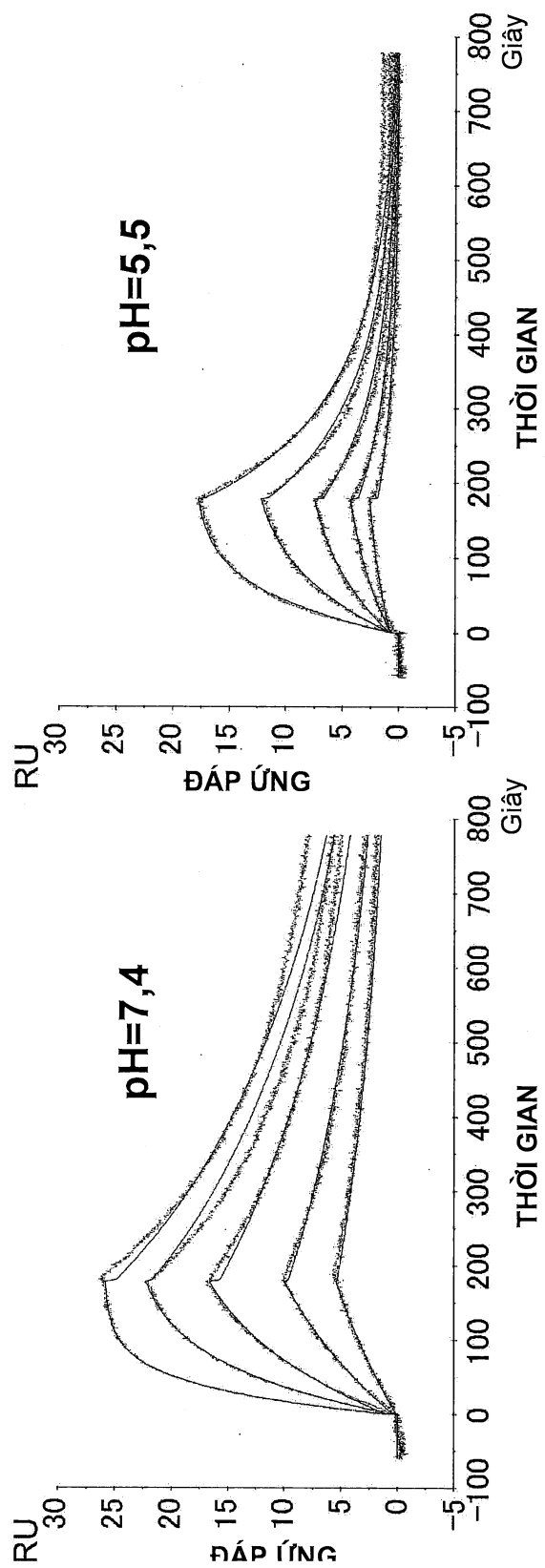


FIG. 26

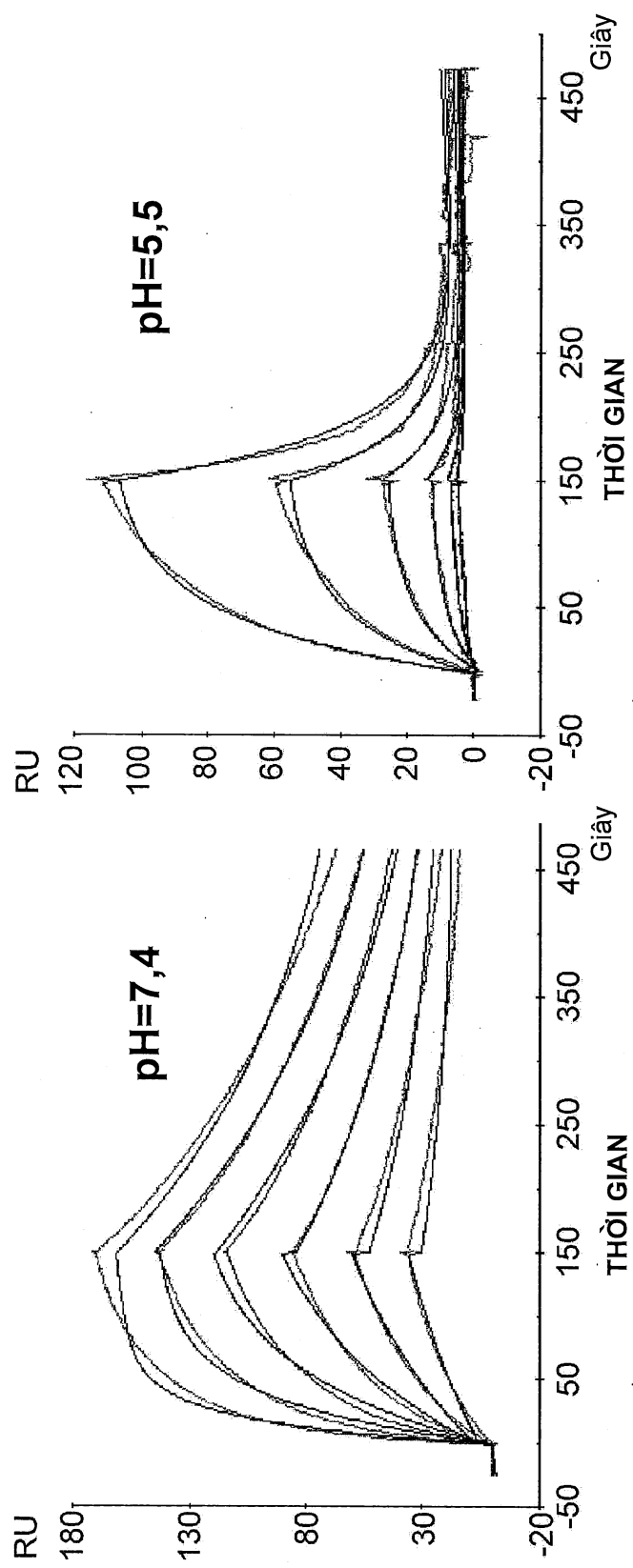


FIG. 27

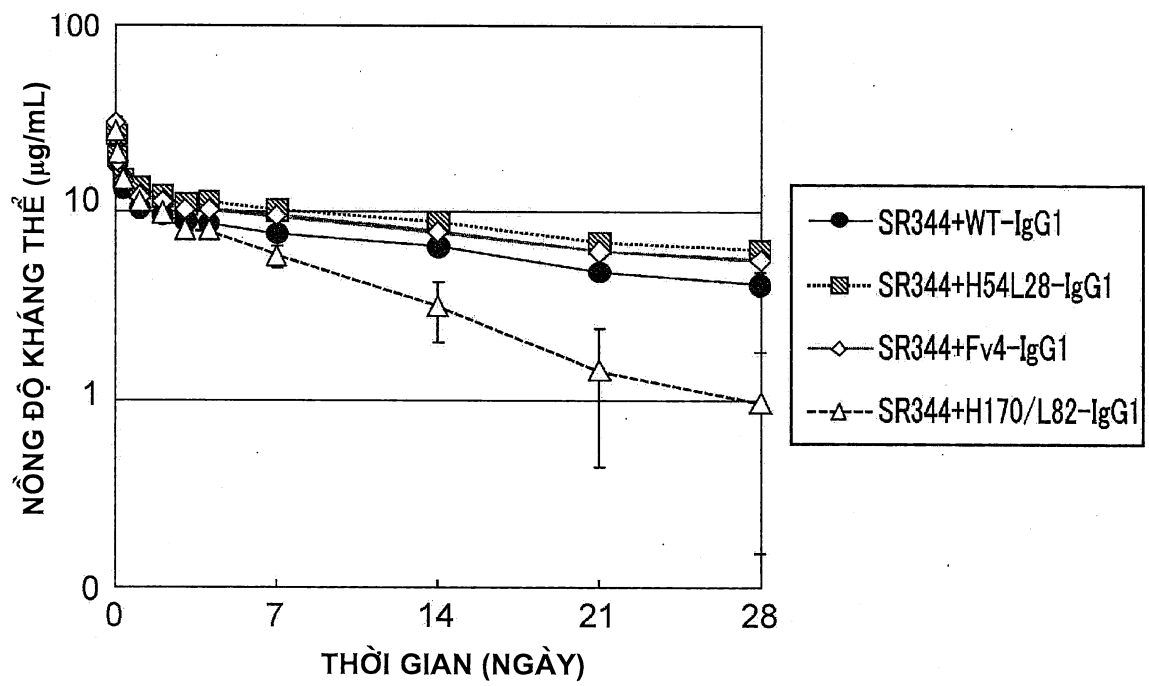


FIG. 28

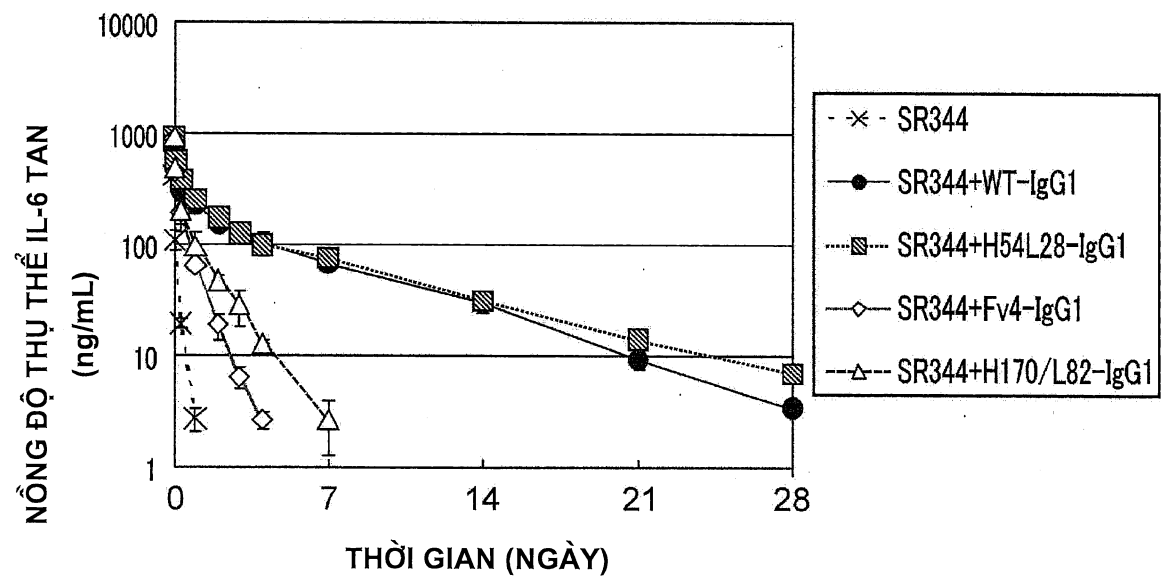


FIG. 29

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
 <120> DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ CÓ THỜI GIAN BẮN THẢI KÉO DÀI TRONG HUYẾT THANH
 <130> C1-A0801Y2P
 <140> PCT/JP2009/057309
 <141> 2009-04-10
 <150> JP 2008-104147
 <151> 2008-04-11
 <150> JP 2008-247713
 <151> 2008-09-26
 <150> JP 2009-068744
 <151> 2009-03-19
 <160> 70
 <170> PatentIn version 3.4
 <210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 2

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 4

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His His

20

25

30

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 5

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser

65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 6

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln His Ile Ser Ser His
 20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 7

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 7

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 8

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly His Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 9
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Glv Lys Glu

305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 10

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 Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35

40

45

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

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

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 11

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 12

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile

35

40

45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 13

<211> 1404

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 13

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60
gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgaaaccta gcgagaccct gagcctgacc 120
tgcgccgtgt ctggctactc aattagcgac gatcatgcct ggagctgggt tcgccagcca 180
cctggagaag gtcttgagtg gattggatac attagttata gtggaatcac aaactataat 240
ccatctctca aaggcagagt gacaatatcg agagacacca gcaagaacca gttcagcctg 300
aaactcagca gcgtgacagc cgccgacacc gcggcttatt attgtgcaag atccctagct 360
cggactacgg ctatggacta ctgggggtgaa ggcaccctcg tcacagtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaattc 720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccttgaggtc 840
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
 aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1080
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
 tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
 agcctctccc tgtctccggg taaa 1404

<210> 14
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 14
 gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagcgtgacc 60
 atcacctgtc aagccagcca ggacatcagc agttacctga attggtacca gcagaagcca 120
 ggaaaggctc cagagctgct gatctactac ggctccgaac tgcactctgg tgtgccaagc 180
 agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac ttcaccttca ccatcagcag cctcgaggca 240
 gaggacgccg ctacctacta ctgcgggcag ggtaaccggc ttccatacac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcga a 321

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 16

ttccccaccag cctgtccgcc tctg

24

<210> 17

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 17

cgtgaagcca aaggccccac tccc

24

<210> 18

<211> 32

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 18

tagaattcca ccatgctggc cgtcggctgc gc

32

<210> 19

<211> 57

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 19

attgcggccg cttatcagtg gtgatgatga tgatgtggta ccgaagaaga atcttgc

57

<210> 20

<211> 1131
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 20

```

gaattccacc atgctggccg tcggctgcgc gctgctggct gccctgctgg ccgcgccggg      60
ggcggcgctg gccccggggg gctgccctgc acaggaggtg gcgagaggtg tgctgaccag      120
tctgccagga gacagcgtga ctctgacctg cccaggggga gagccggaag acaatgccac      180
tgttcactgg gttctcagga agccagctgt aggctcccac ctcagcagat gggctggcgt      240
gggaaggagg ctgctgctga ggtcgggtgca gctccatgac tctggaaact attcatgcta      300
ccgggcccggc cgcccggctg gaactgtgca cttgctgggt gatgttcccc ccgaggagcc      360
ccagctctcc tgcttcgga agagccccct cagcaacgtt gtttgtgagt ggggtcctcg      420
gagcacccca tctccgacga ccaaggctgt gctgttggtg aggaagtttc agaacagtcc      480
ggccgaagac ttccaggagc cgtgccagta ttcccaggag tcccagaagt tctcctgcc      540
gttggcagtc ccggagggag acagctcttt ctacatagtg tccatgtgcg tcgccagtag      600
tgtcgggagc aagctcagca aaactcagac ctttcagggt tgtggaatct tgcagcctga      660
tccgcctgcc aacatcacag tcaactgccg ggccagaaac ccccgctggc tcagtgtcac      720
ctggcaagac cccactcct ggaactcatc tttctacaga ctacggtttg agctdagata      780
tcgagctgaa cggtaaaga cattcacaac atggatggtc aaggacctcc agcatcactg      840
tgtcatccac gacgcctgga gcggcctgag gcacgtgggt cagcttcgtg cccaggagga      900
gttcggggcaa ggcgagtgga gcgagtggag cccggaggcc atgggcacgc cttggacaga      960
atccaggagt cctccagctg agaacgaggt gtccaccccc acgcaggcac ctactactaa     1020
taaagatgat gataatattc tctccagaga ttctgcaaat gcgacaagcc tcccagtgca     1080
agattcttct tcggtaccac atcatcatca tcaccactga taagcggccg c              1131

```

<210> 21
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 21

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

420

425

430

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

Lys

<210> 22

<211> 449

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 22

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

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

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

130		135		140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp				
145		150		155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu				
	165		170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser				
	180		185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro				
	195		200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys				
	210		215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro				
225		230		235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser				
	245		250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp				
	260		265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn				
	275		280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val				
	290		295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu				
305		310		315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys				
	325		330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr				
	340		345	350

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 23

<211> 449

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 23

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Trp Val Asp Glu Val Glu Val His Asn

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

Lys

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 24

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

420

425

430

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

Lys

<210> 25
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 25

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

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

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

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 26

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr

85

90

95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 27

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 28

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 29

<211> 324

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 30

<211> 324

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 31
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 31

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 32
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 33

<211> 443

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 33

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 35
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36

<211> 445

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 36

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37
<211> 443
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 37

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo
 <400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 39
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 39

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo
 <400> 40

His Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo
 <400> 41

His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 42

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

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 43

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

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 44

Phe	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	His	Asp	His
1				5					10

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 45

Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 46

<211> 30

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 46

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 47

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser
20 25 30

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 48

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 49

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 50

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 51

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 52

Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 53

Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 54

Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
1 5 10

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 55

Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 56

Tyr Gly Ser His Leu Glu Ser
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 57

Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 58

<211> 23

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 58

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 59

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

<210> 60

<211> 32

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 1 5 10

<210> 62
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 62

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 63

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 63

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 64
<211> 449
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 64

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 65

<211> 213

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 65

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn His Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

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

<220>
<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 66

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser His His Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
 85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 67

<211> 456

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 67

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 Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

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

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

<210> 68

<211> 214

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 68

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Thr Val
20 25 30

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

Asp Asp Thr Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ala
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

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

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

Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125



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

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190

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

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 69

<211> 456

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 69

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 Gly Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

<210> 70

<211> 449

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự peptit được tổng hợp bằng con đường nhân tạo

<400> 70

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys