(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) **1-0021665**

(51)[7] **C07K 16/18**, A61K 39/395, C12N 15/12, 15/63, 5/10, C12P 19/08

(13) **B**

(21) 1-2011-01796
(22) 07.04.2010
(86) PCT/JP2010/056294 07.04.2010
(87) WO2010/117011A1 14.10.2010
(30) 2009-094613 09.04.2009 JP
(45) 25.09.2019 378
(43) 30.01.2012 286
(73) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)
3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-8426, Japan
(72) HIRUMA, Yoshiharu (JP), TSUDA, Eisuke (JP), TAKIZAWA, Takeshi (JP), NAKAYAMA, Makiko (JP)
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG SIGLEC-15 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường protein mục tiêu được mã hóa bằng gen được biểu hiện mạnh trong các tế bào hủy xương. Cụ thể là sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể nhận biết đặc hiệu Siglec-15 của người và có hoạt tính ức chế sự hình thành tế bào hủy xương và tương tự.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất hữu dụng là chất ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự chuyển hóa xương bất thường và phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Xương được biết đến là cơ quan vận động được tái tạo liên tục bằng sự hình thành và sự tái hấp thu được lặp lại để thay đổi hình thái riêng của nó và duy trì các mức canxi huyết. Xương khỏe duy trì sự cân bằng giữa sự hình thành xương bởi các tế bào tạo xương và sự tái hấp thu xương bởi các tế bào hủy xương, và khối lượng xương là hằng số được duy trì. Ngược lại, khi sự cân bằng giữa sự hình thành xương và sự tái hấp thu xương bị mất, sự chuyển hóa xương bất thường như bệnh loãng xương xảy ra (WO 07/093042 và Endocrinological Review, (1992) 13, pp. 66-80).

Các nhân tố điều khiển sự chuyển hóa xương, nhiều hormon hệ thống và các xytokin cục bộ đã được công bố, và các nhân tố này kết hợp với chất khác để hình thành và duy trì xương (WO 07/093042 và Endocrinological Review, (1996) 17, pp. 308-332). Là sự thay đổi trong mô xương do lão hóa, sự xuất hiện của bệnh loãng xương được biết đến rộng rãi, nhưng cơ chế của sự xuất hiện của nó bao quanh các nhân tố khác nhau như sự giảm tiết các hormon giới tính và sự bất bình thường trong các thụ thể đối với các hormon này; sự khác nhau trong sự biểu hiện xytokin cục bộ trong xương; sự biểu hiện của các gen lão hóa; và sự phân hóa tế bào hủy xương hoặc tế bào tạo xương bị lỗi hoặc sai chức năng, và do đó khó có thể coi nó là hiện tượng sinh lý liên quan đến tuổi tác đơn giản. Bệnh loãng xương thời kỳ đầu một cách rộng rãi được chia thành bệnh loãng xương sau mãn kinh do sự giảm tiết estrogen và bệnh loãng xương tuổi già do sự

lão hóa, nhưng sự tiến bộ của nghiên cứu cơ bản về các cơ chế điều hòa sự hình thành xương và sự tái hấp thu xương là bản chất để làm sáng tỏ cơ chế của sự xuất hiện của nó và để phát triển các chất điều trị cho nó.

Các tế bào hủy xương là các tế bào đa nhân thu được từ các tế bào gốc tạo máu, và bằng cách giải phóng các ion clorit và các ion hydro trên bề mặt xương nơi các tế bào hủy xương bám vào, các tế bào hủy xương axit hóa khoảng hở giữa bề mặt xương và các tế bào hủy xương và cũng tiết ra catepsin K là proteaza axit hoặc tương tự (American Journal of Physiology, (1991) 260, C1315-C1324). Điều này gây ra sự biến chất của canxi phosphat, hoạt hóa các proteaza axit và sự biến chất của các protein cốt xương, dẫn đến sự tái hấp thu xương.

Các tế bào tiền tế bào hủy xương tiền đã được phát hiện được phân hóa thành các tế bào hủy xương bằng sự kích thích bằng RANKL (chất hoạt hóa thụ thể của phối tử NF-κB) được biểu hiện trên màng tế bào của các tế bào tạo xương/các tế bào đệm có mặt trên bề mặt xương (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, (1998) 95, pp. 3597-3602, và Cell, (1998) 93, pp. 165-176). Đã được bộc lộ rằng RANKL là protein màng được tạo ra bởi các tế bào tạo xương/các tế bào đệm, sự biểu hiện của nó được điều khiển bởi nhân tố tái hấp thu xương, RANKL tạo ra sự phân hóa của các tế bào tiền tế bào hủy xương thành các tế bào hủy xương đa nhân trưởng thành, và tương tự (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, (1998) 95, pp. 3597-3602, và Journal of Bone and Mineral Research, (1998) 23, S222). Hơn nữa, những con chuột nhắt bị bất hoạt không có RANKL đã được phát hiện để phát triển bệnh giống bệnh đặc xương, và do đó, RANKL đã được chứng tỏ là nhân tố gây ra sự phân hóa tế bào hủy xương sinh lý (Nature, (1999) 397, pp. 315-323).

Các dược phẩm để điều trị các bệnh chuyển hóa xương hoặc làm ngắn thời gian điều trị, các bisphosphonat, vitamin D3 hoạt tính, canxitonin và các dẫn

xuất của chúng, các hormon như estradiol, SERMs (selective estrogen receptor modulators - các bộ điều biến thụ thể estrogen chọn lọc), ipriflavon, vitamin K_2 (menatetrenon), PTH, các chế phẩm canxi, và tương tự được sử dụng. Tuy nhiên, các chất dược lý này không luôn là sự thỏa đáng trong các kết quả điều trị và sự phát triển chất dược lý có hiệu quả điều trị tiềm năng hơn đang là nhu cầu.

Các màng tế bào của các tế bào miễn dịch được bao phủ bằng một lớp phủ dày đặc các glycan khác nhau như các glycan được sial hóa được nhận biết bởi các protein liên kết glycan khác nhau. Các lectin giống globulin miễn dịch liên kết với axit Sialic (Sialic-acid binding globulin immunoglobulin -like lectins) (sau đây được đề cập đến là "siglecs") là họ của các protein màng dạng I nhận biết các glycan được sial hóa và liên kết thêm vào. Nhiều siglecs được biểu hiện trên các màng tế bào của các tế bào miễn dịch và nhận biết axit sialic có mặt tương tự trên các màng tế bào của các tế bào miễn dịch và điều khiển sự tương tác tế bào hoặc chức năng tế bào và được coi là có liên quan trong các phản ứng miễn dịch (Nature Reviews Immunology, (2007) 7, pp. 255-266). Tuy nhiên, cũng có nhiều phân tử siglec mà các chức năng sinh lý của nó chưa được rõ ràng. Siglec-15 (Sialic-acid binding globulin immunoglobulin -like lectin 15 – lectin giống globulin miễn dịch liên kết với axit sialic 15) là phân tử được công bố mới nhất thuộc Siglecs (xem, ví dụ, tài liệu phi sáng chế 10) và giống phân tử được gọi tên là CD33L3 (CD33 molecule-like 3). Phân tử này được bảo tồn tiến hóa cao từ cá đến người và đã được phát hiện là được biểu hiện mạnh trong các tế bào hình cây và/hoặc các đại thực bào của các hạch lympho và hạch lách người. Hơn nữa, là kết quả của kiểm tra liên kết sử dụng mẫu dò axit sialic, đã phát hiện ra Siglec-15 của người liên kết với Neu5Acα2-6GalNAc và các Siglec-15 của chuột nhắt liên kết hơn nữa với Neu5Acα2-3Galβ1-4Glc, và tương tự (xem, ví dụ, Glycobiology, (2007) 17, pp. 838-846). Cho đến gần đây, vai trò sinh lý của Siglec-15 vẫn chưa được làm rõ, tuy nhiên, đã được báo cáo rằng sự biểu hiện của Siglec-15 tăng với sự phân hóa và sự trưởng thành của các tế bào hủy

xương, và sự phân hóa của các tế bào hủy xương bị ức chế bởi sự giảm biểu hiện của Siglec-15 bằng sự giao thoa ARN (xem, ví dụ, WO 07/093042). Hơn nữa, hiệu quả của kháng thể kháng Siglec-15 trên sự phân hóa tế bào hủy xương đã được bộc lộ lần đầu tiên trong WO 09/48072 (được công bố ngày 16/6/2009), tuy nhiên, trình tự kháng thể được cung cấp đến con người vẫn chưa được làm rõ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề cần được sáng chế giải quyết

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất gen được biểu hiện đặc trưng ở nhiều dạng khác nhau của sự chuyển hóa xương bất thường đã được thấy trong bệnh loãng xương, viêm đa khớp, sự di căn ung thư đến xương hoặc tương tự, chất ức chế sự phân hóa và sự trưởng thành của các tế bào hủy xương và hoạt tính của chúng, và chất điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường.

Cách thức giải quyết các vấn đề

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu để giải thích cơ chế của sự phân hóa, trưởng thành và hoạt động của tế bào hủy xương để tìm ra chất có hiệu quả điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra sự biểu hiện của gen Siglec-15 tăng với sự phân hóa và sự trưởng thành của các tế bào hủy xương, và cũng phát hiện ra sự phân hóa của các tế bào hủy xương bị ức chế bởi kháng thể liên kết đặc hiệu với Siglec-15. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã được làm tương thích với người kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột thu được, và từ đó hoàn thành sáng chế.

Do đó, sáng chế bao gồm các đối tượng sau:

(1) Kháng thể liên kết với polypeptit chứa các gốc axit amin từ 39 đến 165 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và ức chế sự hình thành tế bào hủy xương và/hoặc sự tái hấp thu xương tế bào hủy xương, hoặc đoạn chức năng

của kháng thể.

(2) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (1), khác biệt ở chỗ:

chuỗi nặng chứa vùng biến đổi có CDRH1, CDRH2, và CDRH3, và CDRH1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44, CDRH2 chứa bất kỳ một trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 97, và CDRH3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46; và

trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi có CDRL1, CDRL2, và CDRL3, và CDRL1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47, CDRL2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48, và CDRL3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49.

(3) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (2), khác biệt ở chỗ chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 132 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43.

(4) Đoạn chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ từ (1) đến (3) được chọn từ nhóm bao gồm Fab, F(ab')2, Fab' và Fv.

(5) Kháng thể theo điểm bất kỳ từ (1) đến (3), khác biệt ở chỗ là scFv.

(6) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ từ (1) đến (4), khác biệt ở chỗ kháng thể là kháng thể khảm.

(7) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (6), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 237 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43.

(8) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm bất kỳ từ (1)

đến (4), và (6), khác biệt ở chỗ kháng thể được làm tương thích với người.

(9) Kháng thể theo điểm (7) hoặc (8), trong đó chuỗi nặng chứa vùng bảo toàn của chuỗi nặng G2 globulin miễn dịch của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chuỗi nhẹ κ globulin miễn dịch của người.

(10) Kháng thể ức chế sự hình thành tế bào hủy xương và/hoặc sự tái hấp thu xương tế bào hủy xương hoặc đoạn chức năng của kháng thể, trong đó kháng thể chứa:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

a1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51;

a2) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53;

a3) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55;

a4) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;

a5) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59;

a6) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99;

a7) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101;

a8) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 95% so với một trong các trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ a1) đến a7);

a9) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 99% so với một trong

các trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ a1) đến a7); và

a10) trình tự axit amin bao gồm sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung một đến vài gốc axit amin trong một trong các trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ a1) đến a7); và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

b1) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61;

b2) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63;

b3) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65;

b4) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 132 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67;

b5) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69;

b6) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71;

b7) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103;

b8) trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105;

b9) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 95% so với một trong các trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ b1) đến b8);

b10) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 99% so với một trong các trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ b1) đến b8); và

b11) trình tự axit amin bao gồm sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung một đến vài gốc axit amin trong một trong các trình tự axit amin bất kỳ được chọn từ b1) đến b8).

(11) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61.

(12) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63.

(13) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65.

(14) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 132 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67.

(15) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

(16) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71.

(17) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

(18) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

(19) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình

tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103.

(20) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105.

(21) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61.

(22) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63.

(23) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65.

(24) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 237 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67.

(25) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc

axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

(26) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71.

(27) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

(28) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

(29) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103.

(30) Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể theo điểm (10), khác biệt ở chỗ chứa chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105.

(31) Dược phẩm, khác biệt ở chỗ chứa ít nhất một trong các kháng thể hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này theo điểm (1) đến (30).

(32) Dược phẩm theo điểm (31), khác biệt ở chỗ dược phẩm này là chất điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường.

(33) Dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường, khác biệt ở chỗ chứa ít nhất một trong các kháng thể hoặc các đoạn

chức năng của các kháng thể này theo điểm (1) đến (30) và ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các bisphosphonat, vitamin D3 hoạt tính, canxitonin và các dẫn xuất của chúng, các hormon như estradiol, SERMs (selective estrogen receptor modulators - các bộ điều biến thụ thể estrogen chọn lọc), ipriflavon, vitamin K_2 (menatetrenon), các chế phẩm canxi, PTH (hormon tuyến cận giáp), các chất kháng viêm không steroit, các thụ thể TNF hòa tan, các kháng thể kháng TNF-α hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các kháng thể kháng PTHrP (protein liên quan đến hormon tuyến cận giáp) hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các chất đối kháng thụ thể IL-1, các kháng thể kháng thụ thể IL-6 hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các kháng thể kháng RANKL hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, và OCIF (nhân tố ức chế sự sản sinh tế bào hủy xương).

(34) Dược phẩm theo điểm (32) hoặc (33), trong đó sự chuyển hóa xương bất thường được chọn từ nhóm bao gồm bệnh loãng xương, sự phân hủy xương kèm theo viêm đa khớp, sự tăng canxi huyết ác tính, sự phân hủy xương kèm theo bệnh u đa tủy hoặc sự di căn ung thư đến xương, khối u tế bào khổng lồ, bệnh thiếu xương, rụng răng do viêm nha chu, thoái hóa xương xung quanh vùng liên kết với răng giả, sự phân hủy xương trong bệnh viêm tủy xương mãn tính, bệnh Paget của xương, bệnh loạn dưỡng xương thận, và bệnh xương thủy tinh.

(35) Dược phẩm theo điểm (34), khác biệt ở chỗ sự chuyển hóa xương bất thường là bệnh loãng xương, sự phân hủy xương kèm theo viêm đa khớp, hoặc sự phân hủy xương kèm theo sự di căn ung thư đến xương.

(36) Dược phẩm theo điểm (35), khác biệt ở chỗ sự chuyển hóa xương bất thường là bệnh loãng xương.

(37) Dược phẩm theo điểm (36), khác biệt ở chỗ bệnh loãng xương là bệnh loãng xương sau mãn kinh, bệnh loãng xương tuổi già, bệnh loãng xương thứ cấp do việc sử dụng các thuốc điều trị như steroit hoặc sự suy giảm khả năng

miễn dịch, hoặc bệnh loãng xương kèm theo viêm đa khớp.

(38) Phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường, khác biệt ở chỗ sự cung cấp ít nhất một trong các kháng thể hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này theo điểm (1) đến (30).

(39) Phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường, khác biệt ở chỗ sự cung cấp cùng lúc hoặc liên tục ít nhất một trong các kháng thể hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này theo điểm (1) đến (30) và ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các bisphosphonat, vitamin D3 hoạt tính, canxitonin và các dẫn xuất của chúng, các hormon như estradiol, SERMs (selective estrogen receptor modulators - các bộ điều biến thụ thể estrogen chọn lọc), ipriflavon, vitamin K_2 (menatetrenon), các chế phẩm canxi, PTH (hormon tuyến cận giáp), các chất kháng viêm không steroit, các thụ thể TNF hòa tan, các kháng thể kháng TNF-α hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các kháng thể kháng PTHrP (protein liên quan đến hormon tuyến cận giáp) hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các chất đối kháng thụ thể IL-1, các kháng thể kháng thụ thể IL-6 hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các kháng thể kháng RANKL hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, và OCIF (nhân tố ức chế sự sản sinh tế bào hủy xương).

(40) Phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa theo điểm (38) hoặc (39), khác biệt ở chỗ sự chuyển hóa xương bất thường là bệnh loãng xương, sự phân hủy xương kèm theo viêm đa khớp, hoặc sự phân hủy xương kèm theo sự di căn ung thư đến xương.

(41) Phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa theo điểm (40), khác biệt ở chỗ sự chuyển hóa xương bất thường là bệnh loãng xương.

(42) Phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa theo điểm (41), khác biệt ở chỗ bệnh loãng xương là bệnh loãng xương sau mãn kinh, bệnh loãng xương tuổi già, bệnh loãng xương thứ cấp do việc sử dụng các thuốc điều trị như steroit

hoặc sự suy giảm khả năng miễn dịch, hoặc bệnh loãng xương kèm theo viêm đa khớp.

(43) Polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm (3), (7), và (10) đến (30).

(44) Polynucleotit theo điểm (43), khác biệt ở chỗ chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 40 và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 396 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 42.

(45) Polynucleotit theo điểm (44), khác biệt ở chỗ chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 40 và trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 711 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 42.

(46) Polynucleotit theo điểm (43), khác biệt ở chỗ chứa:

(a) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nucleotit sau:

a1) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50;

a2) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52;

a3) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54;

a4) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 56;

a5) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58;

a6) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98;

a7) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 100;

a8) trình tự nucleotit của polynucleotit lai với polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với bất kỳ một trong các trình tự nucleotit được chọn từ a1) đến a7) dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và

a9) trình tự nucleotit bao gồm sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung một đến vài nucleotit trong một trong các trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ a1) đến a7); và

(b) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nucleotit sau:

b1) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 60;

b2) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62;

b3) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 64;

b4) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 396 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 66;

b5) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68;

b6) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70;

b7) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 102;

b8) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 104;

b9) trình tự nucleotit của polynucleotit lai với polynucleotit chứa trình tự

nucleotit bổ sung với bất kỳ một trong các trình tự nucleotit được chọn từ b1) đến b8) dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và

b10) trình tự nucleotit bao gồm sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung một đến vài nucleotit trong một trong các trình tự nucleotit bất kỳ được chọn từ b1) đến b8).

(47) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 60.

(48) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62.

(49) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 64.

(50) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 396 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 66.

(51) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 56, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68.

(52) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu

trong SEQ ID NO: 58, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70.

(53) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68.

(54) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 100, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68.

(55) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 102.

(56) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 104.

(57) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 60.

(58) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62.

(59) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa

trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 64.

(60) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 711 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 66.

(61) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 56, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68.

(62) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70.

(63) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68.

(64) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 100, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68.

(65) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 102.

(66) Polynucleotit theo điểm (46), khác biệt ở chỗ chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 104.

(67) Vectơ, chứa một trong các polynucleotit bất kỳ theo điểm (43) đến (66).

(68) Tế bào chủ được biến nạp, chứa một trong các polynucleotit bất kỳ theo điểm (43) đến (66).

(69) Tế bào chủ được biến nạp, chứa vectơ theo điểm (67).

(70) Phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm (3), (7), và (10) đến (30), bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ theo điểm (68) hoặc (69), và làm tinh sạch kháng thể từ sản phẩm nuôi cấy tạo thành.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Theo sáng chế, chất điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường có cơ chế hoạt động là để cho sự phân hóa và sự trưởng thành của các tế bào hủy xương và hoạt hóa sự tái hấp thu xương của chúng có thể thu được.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các kết quả của việc đánh giá độ tinh sạch của Siglec-15-His của chuột nhắt được tinh sạch bằng phép sắc ký cột cao áp HisTrap và Phép sắc ký cột nguồn Q qua sự điện di SDS polyacrylamit và sự nhuộm bạc.

Fig.2 thể hiện các kết quả của việc phát hiện các đặc tính của Siglec-15-His của chuột nhắt được tinh sạch bằng phép sắc ký cột cao áp HisTrap và Phép sắc ký cột nguồn Q qua sự điện di SDS polyacrylamit và phép lai Westen (Westen blotting) sử dụng kháng thể kháng V5-HRP.

Fig.3 thể hiện các kết quả của việc đánh giá độ tinh sạch của Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tinh sạch bằng phép sắc ký cột Protein A HiTrap qua sự

điện di SDS polyacrylamit và sự nhuộm bạc.

Fig.4 thể hiện các kết quả của việc kiểm tra sự liên kết của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột to đĩa nuôi cấy chứa Siglec-15 của chuột nhắt được cố định trên đó bằng phương pháp ELISA. Ký hiệu (◆) biểu thị kháng thể #1A1, ký hiệu (■) biểu thị kháng thể #3A1, ký hiệu (▲) biểu thị kháng thể #8A1, ký hiệu (×) biểu thị kháng thể #24A1, ký hiệu (●) biểu thị kháng thể #32A1, ký hiệu (○) biểu thị kháng thể #34A1, ký hiệu (+) biểu thị kháng thể #39A1, ký hiệu (-) biểu thị kháng thể #40A1, ký hiệu (—) biểu thị kháng thể #41B1, ký hiệu (◇) biểu thị kháng thể #61A1, và ký hiệu (□) biểu thị IgG đối chứng.

Fig.5 thể hiện các kết quả của việc kiểm tra hiệu quả của the sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (#3A1, #8A1, hoặc #32A1) đến sự phân hóa tế bào hủy xương (sự kích thích bằng RANKL) of các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt. Ngẫu nhiên là, the đối chứng IgG của chuột trong hình vẽ is a negative control common to các Fig.5 và 6.

Fig.6 thể hiện các kết quả của việc kiểm tra hiệu quả của sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (#34A1, #39A1, hoặc #40A1) đến sự phân hóa tế bào hủy xương (sự kích thích bằng RANKL) of các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt. Ngẫu nhiên là, the kháng thể đa dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của thỏ No. 3 trong hình vẽ là đối chứng dương tính thông thường đối với các Fig.5 và 6.

Fig.7 thể hiện các kết quả của việc đánh giá độ tinh sạch của Siglec-15-His của người được tinh sạch bằng phép sắc ký cột cao áp HisTrap và Phép sắc ký cột nguồn Q qua sự điện di SDS polyacrylamit và sự nhuộm bạc.

Fig.8 thể hiện các kết quả của việc đánh giá độ tinh sạch của Siglec-15-Fc của người được tinh sạch bằng Cột protein A chromatography qua sự điện di SDS polyacrylamit.

Fig.9 thể hiện các kết quả của việc kiểm tra sự liên kết của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột với đĩa chứa Siglec-15-Fc của người được cố định trên đó bằng phương pháp ELISA. Ký hiệu (◆) biểu thị kháng thể #1A1, ký hiệu (■) biểu thị kháng thể #3A1, ký hiệu (▲) biểu thị kháng thể #8A1, ký hiệu (×) biểu thị kháng thể #24A1, ký hiệu (●) biểu thị kháng thể #32A1, ký hiệu (○) biểu thị kháng thể #34A1, ký hiệu (+) biểu thị kháng thể #39A1, ký hiệu (-) biểu thị kháng thể #40A1, ký hiệu (—) biểu thị kháng thể #41B1, ký hiệu (◇) biểu thị kháng thể #61A1, và ký hiệu (□) biểu thị IgG đối chứng.

Fig.10 thể hiện các ảnh chụp hiển vi mô tả, bằng sự nhuộm màu TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương khổng lồ từ các tế bào tiền tế bào hủy xương bình thường của người bằng sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột.

Fig.11 thể hiện các ảnh chụp hiển vi mô tả, bằng sự nhuộm màu TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương khổng lồ từ các tế bào tiền tế bào hủy xương bình thường của người bằng sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1).

Fig.12 là đồ thị thể hiện sự ức chế hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào hủy xương của người bình thường bằng sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) (N=6).

Fig.13A là đồ thị thể hiện hiệu quả của việc tăng mật độ khoáng của xương ở xương sống thắt lưng khi kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được cung cấp cho các con chuột bị cắt buồng trứng trong 4 tuần; và Fig.13B là đồ thị thể hiện hiệu quả của việc giảm bài tiết deoxypyridinolin nước tiểu khi kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được cung cấp cho các con chuột bị cắt buồng trứng trong 4 tuần.

Fig.14 là đồ thị thể hiện rằng kháng thể #32A1 đơn dòng kháng Siglec-15

của chuột nhắt của chuột liên kết với vùng vị trí V của Siglec-15 của người ELISA cạnh tranh.

Fig.15 là đồ thị thể hiện rằng kháng thể #32A1 của chuột và kháng thể khảm của người từ đó về cơ bản có cùng ái lực đối với Siglec-15-Fc của chuột nhắt bằng ELISA cạnh tranh.

Fig.16 thể hiện các đồ thị mô tả, bằng hoạt tính enzym của TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt bằng sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) và kháng thể khảm của chúng (N=3).

Fig.17 thể hiện các ảnh chụp hiển vi mô tả, bằng sự nhuộm màu TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương khổng lồ từ các tế bào tiền tế bào hủy xương bình thường của người bằng sự bổ sung kháng thể khảm của người của kháng thể #32A1 đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột.

Fig.18 là hình ảnh trong đó khẳng định rằng 6 loại kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người liên kết với protein Siglec-15 của chuột nhắt trong cách thức phụ thuộc nồng độ kháng thể bằng phương pháp ELISA sử dụng đĩa nuôi cấy chứa Siglec-15 của chuột nhắt được cố định trên đó.

Fig.19 là hình ảnh trong đó khẳng định rằng 6 loại kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người liên kết với Protein Siglec-15 của người trong cách thức phụ thuộc nồng độ kháng thể bằng phương pháp ELISA sử dụng đĩa nuôi cấy chứa Siglec-15-Fc của người được cố định trên đó.

Fig.20 thể hiện các ảnh chụp hiển vi mô tả, bằng sự nhuộm màu TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương khổng lồ của chuột nhắt dưới sự kích thích bằng TNFα bằng sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) hoặc kháng thể khảm của chúng.

Fig.21 thể hiện các đồ thị mô tả, bằng hoạt tính enzym của TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt dưới sự kích thích bằng TNFα bằng sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) hoặc kháng thể khảm của chúng (N=3).

Fig.22 thể hiện các đồ thị mô tả, bằng hoạt tính enzym của TRAP, sự ức chế chuột sự hình thành tế bào hủy xương bằng sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột (kháng thể #8A1 hoặc #32A1) (N=3).

Fig.23 thể hiện trình tự nucleotit được tách dòng của chuỗi nặng #32A1 của chuột và trình tự axit amin của chúng.

Fig.24 thể hiện trình tự nucleotit được tách dòng của chuỗi nhẹ #32A1 của chuột và trình tự axit amin của chúng.

Fig.25 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể #32A1 khảm của người và trình tự axit amin của chúng.

Fig.26 thể hiện trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể #32A1 khảm của người và trình tự axit amin của chúng.

Fig.27 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T1H và trình tự axit amin của chúng.

Fig.28 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T2H và trình tự axit amin của chúng.

Fig.29 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T3H và trình tự axit amin của chúng.

Fig.30 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T5H và trình tự axit amin của chúng.

Fig.31 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T6H và trình tự axit amin của chúng.

Fig.32 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T1L và trình tự axit amin của

chúng.

Fig.33 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T2L và trình tự axit amin của chúng.

Fig.34 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T3L và trình tự axit amin của chúng.

Fig.35 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T4L và trình tự axit amin của chúng.

Fig.36 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T5L và trình tự axit amin của chúng.

Fig.37 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-T6L và trình tự axit amin của chúng.

Fig.38 thể hiện các trình tự axit amin của h#32A1-T7H, h#32A1-T8H, và h#32A1-T9H.

Fig.39 thể hiện các trình tự axit amin của h#32A1-T10H, h#32A1-T11H, và h#32A1-T12H.

Fig.40 thể hiện các trình tự axit amin của h#32A1-T7L, h#32A1-T8L, h#32A1-T9L, h#32A1-T10L, và h#32A1-T11L.

Fig.41 thể hiện các trình tự axit amin của h#32A1-T12L, h#32A1-T13L, h#32A1-T14L, h#32A1-T15L, và h#32A1-T16L.

Fig.42 thể hiện các trình tự axit amin của h#32A1-T17L, h#32A1-T18L, h#32A1-T19L, h#32A1-T20L, và h#32A1-T21L.

Fig.43 thể hiện các trình tự axit amin của h#32A1-T22L, h#32A1-T23L, h#32A1-T24L, và h#32A1-T25L.

Fig.44 thể hiện các đồ thị mô tả, bằng hoạt tính enzym của TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt bằng sự bổ sung kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người

(h#32A1-T1, h#32A1-T2, hoặc h#32A1-T3). Ngẫu nhiên là, kháng thể #32A1 của chuột trong hình vẽ là đối chứng dương tính thông thường đối với các Fig.44 và 45.

Fig.45 thể hiện các đồ thị mô tả, bằng hoạt tính enzym của TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt bằng sự bổ sung kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người (h#32A1-T4, h#32A1-T5, hoặc h#32A1-T6).

Fig.46 thể hiện các đồ thị mô tả, bằng hoạt tính enzym của TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt bằng sự bổ sung kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người (h#32A1-H1-1/L5 hoặc h#32A1-H5/L5). Ngẫu nhiên là, kháng thể #32A1 của chuột và kháng thể #32A1 khảm của người trong hình vẽ là các đối chứng dương tính thông thường đối với các Fig.46 và 47.

Fig.47 thể hiện các đồ thị mô tả, bằng hoạt tính enzym của TRAP, sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt bằng sự bổ sung kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người (h#32A1-H1-1/L2-16 hoặc h#32A1-H-1/L2-15).

Fig.48 thể hiện các đồ thị mô tả sự ức chế hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào hủy xương của người bình thường bằng sự bổ sung kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5, hoặc h#32A1-T6). Ngẫu nhiên là, kháng thể #32A1 của chuột và kháng thể #32A1 khảm của người trong hình vẽ là các đối chứng dương tính thông thường đối với các Fig.48 và 49.

Fig.49 thể hiện các đồ thị mô tả sự ức chế hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào hủy xương của người bình thường bằng sự bổ sung kháng thể kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột được làm tương thích với người (h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, hoặc

h#32A1-H1-1/L2-15).

Fig.50 là nhiệt đồ được thu để xác định khả năng cân bằng nhiệt của kháng thể h#32A1-H5/L5.

Fig.51 là nhiệt đồ được thu để xác định khả năng cân bằng nhiệt của kháng thể h#32A1-H1-1/L5.

Fig.52 là nhiệt đồ được thu để xác định khả năng cân bằng nhiệt của kháng thể h#32A1-H1-1/L2-15.

Fig.53 là nhiệt đồ được thu để xác định khả năng cân bằng nhiệt của kháng thể h#32A1-H1-1/L2-16.

Fig.54 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-H1-1 và trình tự axit amin của nó.

Fig.55 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-H5 và trình tự axit amin của nó.

Fig.56 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-L2-15 và trình tự axit amin của nó.

Fig.57 thể hiện trình tự nucleotit của h#32A1-L2-16 và trình tự axit amin của nó.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ "gen" theo sáng chế bao gồm không chỉ ADN, mà còn mARN, cADN, và cARN.

Thuật ngữ "polynucleotit" theo sáng chế được sử dụng với cùng nghĩa là "axit nucleic" và cũng bao gồm ADN, ARN, các mẫu dò, các oligonucleotit, và các mồi.

Các thuật ngữ "polypeptit" và "protein" theo sáng chế được sử dụng không có sự khác biệt.

Thuật ngữ "đoạn ARN" theo sáng chế đề cập đến đoạn gen chứa ARN.

Thuật ngữ "tế bào" theo sáng chế cũng bao gồm các tế bào trong các cá thể động vật và các tế bào được nuôi cấy.

Thuật ngữ "Siglec-15" theo sáng chế được sử dụng với cùng nghĩa là "protein Siglec-15".

Thuật ngữ "sự hình thành tế bào hủy xương" theo sáng chế được sử dụng với cùng nghĩa là "sự phân hóa tế bào hủy xương" hoặc "sự trưởng thành của tế bào hủy xương".

Thuật ngữ "đoạn chức năng của kháng thể" theo sáng chế đề cập đến đoạn một phần của kháng thể có hoạt tính liên kết kháng nguyên và bao gồm Fab, F(ab')2, Fv, scFv, các diabody, các kháng thể tuyến tính, các kháng thể đa hiệu được hình thành từ các đoạn kháng thể, và tương tự. Thuật ngữ cũng bao gồm Fab' là đoạn gen đơn trong vùng biến đổi của kháng thể thu được bằng việc xử lý F(ab')2 dưới ccs điều kiện khử. Tuy nhiên, thuật ngữ không bị giới hạn bởi các phân tử này miễn là đoạn gen có ái lực liên kết đối với kháng nguyên. Hơn nữa, các đoạn chức năng bao gồm không chỉ đoạn gen thu được bằng việc xử lý phân tử có chiều dài đầy đủ của protein kháng thể bằng enzym thích hợp, mà protein còn được tạo ra trong tế bào chủ thích hợp sử dụng gen kháng thể được cải biến về mặt di truyền.

Thuật ngữ "nhân tố quyết định kháng nguyên" theo sáng chế đề cập đến peptit thành phần hoặc cấu trúc bậc ba thành phần của Siglec-15 mà kháng thể kháng Siglec-15 cụ thể liên kết. Nhân tố quyết định kháng nguyên được đề cập ở trên là peptit thành phần của Siglec-15 có thể được xác định bằng phương pháp được biết rõ đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này như phân tích miễn dịch. Tuy nhiên, ví dụ phương pháp sau đây có thể được tiến hành. Các cấu trúc thành phần khác nhau của Siglec-15 được điều chế. Trong sự điều chế các cấu trúc thành phần, kỹ thuật tổng hợp oligopeptit đã biết có thể được sử dụng. Ví dụ, một loạt các polypeptit có chiều dài bị giảm thích hợp thu được bằng cách cắt ngắn liên tiếp Siglec-15 từ đầu C hoặc đầu N được tiến hành sử dụng kỹ

thuật tái tổ hợp di gen đã biết rõ đối với những người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau đó, khả năng phản ứng của kháng thể chống lại các polypeptit này được kiểm tra và vị trí nhận biết được xác định áng chừng. Tiếp theo, các peptit có chiều dài ngắn hơn được tổng hợp và sự phản ứng với các peptit này được kiểm tra, qua đó nhân tố quyết định kháng nguyên có thể được xác định. Hơn nữa, nhân tố quyết định kháng nguyên là cấu trúc bậc ba thành phần của Siglec-15 liên kết với kháng thể Siglec-15 cụ thể có thể được xác định bằng định rõ các gốc axit amin của Siglec-15 liền kề với kháng thể bằng phép phân tích cấu trúc bằng tia X. Nếu kháng thể kháng Siglec-15 thứ hai liên kết với peptit thành phần hoặc cấu trúc bậc ba thành phần mà kháng thể kháng Siglec-15 thứ nhất liên kết, có thể được xác định kháng thể thứ một và kháng thể thứ hai cùng chung một nhân tố quyết định kháng nguyên. Hơn nữa, bằng việc khẳng định kháng thể kháng Siglec-15 thứ hai cạnh tranh với kháng thể kháng Siglec-15 thứ một để liên kết với Siglec-15 (tức là, kháng thể thứ hai ức chế sự liên kết giữa Siglec-15 và kháng thể thứ một), có thể được xác định kháng thể thứ một và kháng thể thứ hai cùng chung nhân tố quyết định kháng nguyên cho dù trình tự hoặc cấu trúc của nhân tố quyết định kháng nguyên cụ thể không được xác định. Hơn nữa, khi kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai liên kết với cùng nhân tố quyết định kháng nguyên và thì kháng thế thứ nhất có ảnh hưởng rõ rệt là hoạt tính trung hòa kháng nguyên, kháng thể thứ hai có thể được cho rằng có cùng hoạt tính.

Đã biết là mỗi chuỗi nặng và nhẹ của phân tử kháng thể có ba vùng quyết định tính bù (complementarity determining regions - CDR). Vùng quyết định tính bù cũng được gọi là vùng dị biến, và có mặt trong vùng biến đổi của mỗi chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể. Là vị trí có khả năng biến đổi cao trong cấu trúc ban đầu, và có ba CDR riêng rẽ trong cấu trúc ban đầu của mỗi chuỗi polypeptit nặng và nhẹ. Trong bản mô tả này, đối với các vùng quyết định tính bù của kháng thể, các vùng quyết định tính bù của chuỗi nặng được thể hiện

bằng CDRH1, CDRH2, và CDRH3 từ vị trí đầu amin của trình tự axit amin của chuỗi nặng, và các vùng quyết định tính bù của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng CDRL1, CDRL2, và CDRL3 từ vị trí đầu amin của trình tự axit amin của chuỗi nhẹ. Các vị trí này gần với cái khác trong cấu trúc bậc ba và xác định tính đặc hiệu đối với kháng nguyên mà kháng thể liên kết.

Cụm từ "sự lai được tiến hành dưới các điều kiện nghiêm ngặt" theo sáng chế đề cập đến sự lai được tiến hành dưới các điều kiện ở đó sự nhận biết có thể đạt được bằng cách tiến hành phép lai ở 68°C trong dung dịch lai có giá trị thương mại, ExpressHyb Hybridization Solution (được sản xuất bởi Clontech, Inc.) hoặc tiến hành lai ở 68°C trong sự có mặt của 0,7 đến 1,0 M NaCl sử dụng màng ADN được cố định trên đó, tiếp theo tiến hành rửa ở 68°C sử dụng 0,1 đến 2 x dung dịch SSC (1 x dung dịch SSC gồm 150 mM NaCl và 15 mM natri xitrat) hoặc dưới các điều kiện tương đương khác.

1. Siglec-15

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra gen Siglec-15 được biểu hiện đặc trưng trong các khối u tế bào khổng lồ và cũng đã phát hiện ra mức biểu hiện của gen Siglec-15 tăng khi dòng tế bào thu được từ bạch cầu đơn nhân phân hóa thành các tế bào hủy xương.

Đối với Siglec-15 được sử dụng trong sáng chế, Siglec-15 được tinh sạch trực tiếp từ các bạch cầu đơn nhân hoặc các tế bào tủy xương của người, động vật có vú không phải người (như chuột bạch, chuột, chuột nhắt, thỏ, lợn, cừu, gia súc, hoặc khỉ) hoặc gà và được sử dụng, hoặc phần màng tế bào của các tế bào được đề cập ở trên được điều chế và có thể được sử dụng. Hơn nữa, Siglec-15 có thể thu được bằng sự tổng hợp *in vitro* của chúng hoặc sự sản xuất của chúng trong tế bào chủ qua kỹ thuật di truyền. Trong sự sản suất bằng kỹ thuật di truyền, cụ thể, cADN Siglec-15 được tổng hợp thành vectơ có khả năng biểu hiện cADN Siglec-15, và Siglec-15 được tổng hợp trong dung dịch chứa enzym, chất nền, và chất năng lượng được yêu cầu để phiên mã và dịch mã,

hoặc tế bào tiền nhân hoặc nhân thật được biến đổi để biểu hiện Siglec-15, qua đó protein này có thể được thu.

cADN trình tự nucleotit của Siglec-15 của người được đăng ký trong GenBank với số đăng ký NM_213602 và nêu trong SEQ ID NO: 1 trong phần danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó nêu trong SEQ ID NO: 2 trong phần danh mục trình tự. Trình tự nucleotit của cADN Siglec-15 của chuột nhắt được đăng ký trong GenBank bằng số đăng ký XM_884636 và nêu trong SEQ ID NO: 3 trong phần danh mục trình tự, và trình tự axit amin của nó nêu trong SEQ ID NO: 4 trong phần danh mục trình tự. Mature Siglec-15 của người từ đó trình tự tín hiệu bị loại tương ứng với trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 328 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2. Hơn nữa, Siglec-15 của chuột nhắt từ đó trình tự tín hiệu bị loại tương ứng với trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 341 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4. Ngẫu nhiên là, Siglec-15 đôi khi được gọi là tương tự kháng nguyên CD33 3, tương tự phân tử CD33 3, tương tự CD33 3, hoặc CD33L3, và tất cả sự biểu hiện của chúng như phân tử.

cADN Siglec-15 có thể được thu bằng, ví dụ, Phương pháp gọi là PCR trong đó phản ứng chuỗi polymeaza (sau đây được đề cập đến là "PCR") được tiến hành sử dụng thư viện cADN biểu hiện cADN Siglec-15 là khuôn và các mồi khuếch đại đặc hiệu cADN Siglec-15 (Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, 487-49).

Hơn nữa, polynucleotit lai với polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với ít nhất một trình tự nucleotit được chọn từ các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và 3 trong phần danh mục trình tự dưới các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa protein có hoạt tính sinh học có thể so sánh với của Siglec-15 cũng được quan tâm là cADN Siglec-15. Hơn nữa, polynucleotit là vùng biến nối được sao chép từ các locut Siglec-15 của người hoặc chuột nhắt hoặc polynucleotit lai với trình tự bổ sung với nó dưới các điều kiện nghiêm ngặt và

mã hóa protein có hoạt tính sinh học có thể so sánh với của Siglec-15 cũng được quan tâm là cADN Siglec-15.

Hơn nữa, protein chứa trình tự axit amin bao gồm sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự bổ sung một hoặc vài các axit amin trong ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ các trình tự axit amin được thể hiện bằng các SEQ ID NO: 2 và 4 trong phần danh mục trình tự hoặc trình tự axit amin thu được bằng cách loại trình tự tín hiệu từ bất kỳ các trình tự này và có hoạt tính sinh hoạc có thể so sánh với của Siglec-15 cũng được quan tâm là Siglec-15. Hơn nữa, protein chứa trình tự axit amin được mã hóa bởi vùng bởi vùng biến đổi ghép nối được sao chép từ các locut Siglec-15 của người hoặc chuột nhắt hoặc trình tự axit amin bao gồm sự thay thế, sự loại bỏ hoặc sự bổ sung một hoặc vài các axit amin trong đó và có hoạt tính sinh học có thể so sánh với của Siglec-15 cũng được quan tâm là Siglec-15.

2. Nhận biết sự chuyển hóa xương bất thường

Phép phân tích mức biểu hiện của gen Siglec-15 trong nhóm của các mẫu kiểm tra từ các mô xương người khác nhau cho thấy mức biểu hiện của gen tăng lên đáng kể trong khối u tế bào khổng lồ (GCT) là khối u xương với số lượng lớn các tế bào khổng lồ đa nhân tương tự tế bào hủy xương sinh ra và khác biệt ở chỗ các giá trị y học của sự phá hủy xương tiêu xương (Bullough et al., Atlas of Orthopedic Pathology 2nd edition, pp. 17,6-17,8, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1992)).

Cũng đã phát hiện ra mức biểu hiện của gen Siglec-15 tăng khi dòng tế bào thu được từ bạch cầu đơn nhân to được phân hóa thành các tế bào hủy xương.

Vì vậy, Siglec-15 được coi là liên quan tới các bệnh ở người như GCT trong đó sự tái hấp thu xương được tăng lên. Theo cách khác, xác định mức biểu hiện của gen Siglec-15 và/hoặc Siglec-15 trong mỗi tế bào và/hoặc mỗi mô cho phép xác định tình trạng sự chuyển hóa xương bất thường được đi kèm bởi sự

biểu hiện quá mức của Siglec-15. Sự chuyển hóa xương bất thường theo sáng chế đề cập đến rối loạn khác biệt ở chỗ sự mất xương mạng lưới, và các ví dụ cụ thể về chúng bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, bệnh loãng xương (bệnh loãng xương sau mãn kinh, bệnh loãng xương tuổi già, bệnh loãng xương thứ cấp do việc sử dụng các thuốc điều trị như steroit hoặc sự suy giảm khả năng miễn dịch, hoặc bệnh loãng xương kèm theo viêm đa khớp), sự phân hủy xương kèm theo viêm đa khớp, sự tăng canxi huyết ác tính, sự phân hủy xương kèm theo bệnh u đa tủy hoặc sự di căn ung thư đến xương, khối u tế bào khổng lồ, bệnh thiếu xương, rụng răng do viêm nha chu, thoái hóa xương xung quanh vùng liên kết với răng giả, sự phân hủy xương trong bệnh viêm tủy xương mãn tính, bệnh Paget của xương, bệnh loạn dưỡng xương thận, và bệnh xương thủy tinh.

Theo sáng chế, "mẫu kiểm tra" được sử dụng để kiểm tra mức biểu hiện của gen Siglec-15 và/hoặc Siglec-15 đề cập đến mẫu từ mô của tủy xương, xương, tuyến tiền liệt, tinh hoàn, dương vật, bong bóng, thận, khoang miệng, hầu, môi, lưỡi, lợi, thượng hầu, thực quản, bụng, ruột non, ruột già, ruột kết, gan, túi mật, tụy, mũi, phổi, mô mềm, da, vú, tử cung, buồng trứng, não, tuyến giáp, hạt lympho, cơ, mô béo hoặc tương tự, hoặc máu, dịch cơ thể, chất bài tiết, hoặc tương tự được thu từ đối tượng liểm tra, mẫu xét nghiệm y tế, v.v., tuy nhiên, theo sáng chế, máu hoặc tủy xương được ưu tiên hơn.

Đối với RANKL được biết liên quan tới sự phân hóa tế bào hủy xương, chuột nhắt bất hoạt gen được tạo ra, và kiểu hình khi chức năng của RANKL bị mất được phân tích (Young-Yun Kong, et. al., Nature (1999) 397, pp. 315-323). Bằng cách tạo ra chuột nhắt bất hoạt gen thiếu Siglec-15 theo cùng cách như trên, kiểu hình khi chức năng của Siglec-15 bị mất được phân tích.

3. Sản xuất kháng thể kháng Siglec-15

Kháng thể của sáng chế, chống lại Siglec-15, có thể thu được bằng cách gây miễn dịch cho động vật với Siglec-15 hoặc polypeptit tùy ý được chọn từ

trình tự axit amin của Siglec-15, và thu thập và làm tinh sạch kháng thể được sản xuất *in vivo* theo quy trình thông thường. Các loài sinh vật của Siglec-15 được sử dụng là kháng nguyên không bị giới hạn bởi loài người, và động vật có thể được gây miễn dịch với Siglec-15 được thu từ động vật khác người như chuột nhắt hoặc chuột. Trong trường hợp này, bằng cách kiểm tra phản ứng qua lại giữa kháng thể liên kết với Siglec-15 khác loài thu được và Siglec-15 của người, kháng thể thích hợp với bệnh của người có thể được lựa chọn.

Hơn nữa, kháng thể đơn dòng có thể thu được bằng dung hợp các tế bào sản sinh kháng thể sản sinh ra kháng thể chống lại Siglec-15 với các tế bào u tủy để tạo ra khối tế bào lai theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler và Milstein, Nature, (1975) 256, pp. 495-497; Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, pp. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)).

Ngẫu nhiên là, Siglec-15 được sử dụng là kháng nguyên có thể thu được bằng kỹ thuật di truyền để làm cho tế bào chủ tạo ra gen Siglec-15.

Một cách cụ thể, vectơ có khả năng biểu hiện gen Siglec-15 được tạo ra, và vectơ tạo thành được chuyển vào trong tế bào ký chủ để biểu hiện gen, và sau đó được biểu hiện Siglec-15 được tinh sạch. Dưới đây, phương pháp thu kháng thể chống lại Siglec-15 sẽ được mô tả cụ thể.

(1) Điều chế kháng nguyên

Các ví dụ về kháng nguyên được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng Siglec-15 bao gồm Siglec-15, polypeptit chứa trình tự axit amin một phần chứa ít nhất 6 axit amin liên tiếp nhau của Siglec-15, và dẫn xuất thu được bằng cách bổ sung trình tự axit amin thu được hoặc vật mang thêm vào đó.

Siglec-15 có thể được tinh sạch trực tiếp từ các mô khối u của người hoặc các tế bào khối u và được sử dụng. Hơn nữa, Siglec-15 có thể thu được bằng cách tổng hợp nó *in vitro* hoặc bằng cách gây cho tế bào ký chủ sản xuất nó bằng kỹ thuật di truyền.

Đối với kỹ thuật di truyền, một cách cụ thể, cADN Siglec-15 được tích hợp vào trong vectơ có khả năng biểu hiện cADN Siglec-15 và Siglec-15 được tổng hợp trong dung dịch chứa enzym, chất nền, và chất tạo năng lượng được ưu cầu cho sự phiên mã và sự dịch mã, hoặc tế bào ký chủ tiền nhân hoặc nhân thật khác được biến đổi để biểu hiện Siglec-15, qua đó kháng nguyên có thể được thu.

Hơn nữa, kháng nguyên có thể cũng được thu là protein được tiết ra bằng cách biểu hiện protein dung hợp được thu bằng cách ghép vùng ngoại bào của Siglec-15, là protein màng, với vùng bảo toàn của kháng thể trong hệ thống vectơ ký chủ thích hợp.

cADN Siglec-15 có thể được thu bằng, ví dụ, còn gọi là phương pháp PCR trong đó phản ứng chuỗi polymeaza (sau đây được đề cập đến là "PCR") được tiến hành sử dụng thư viện cADN biểu hiện cADN Siglec-15 là khuôn và các mồi khuếch đại đặc hiệu cADN Siglec-15 (xem Saiki, R. K., et al., Science, (1988) 239, pp. 487-489).

Sự tổng hợp *in vitro* của polypeptit, ví dụ, Hệ thống dịch mã nhanh - Rapid Translation System (RTS) được sản xuất bởi Roche Diagnostics, Inc. có thể được lấy làm ví dụ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Các ví dụ về ký chủ tiền nhân bao gồm *E.coli* và Bacillus subtilis. Để biến đổi tế bào ký chủ với gen mục tiêu, tế bào ký chủ được biến đổi sử dụng vectơ plasmit chứa đơn vị sao chép, nghĩa là, gốc sao chếp thu được từ các loài tương thích với ký chủ, và trình tự điều khiển. Hơn nữa, vectơ ưu tiên có trình tự có khả năng áp đặt sự chọn lọc kiểu hình trên tế bào bị biến đổi.

Các ví dụ về tế bào ký chủ nhân thật bao gồm các tế bào động vật có xương sống, các tế bào côn trùng, và các tế bào nấm men. Các tế bào động vật có xương sống là, ví dụ, các chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. và Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) của các tế

bào COS khỉ không đuôic (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), các nguyên bào sợi chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và Các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (các tế bào CHO; ATCC: CCL-61); và tương tự thường được sử dụng, tuy nhiên, chúng không bị giới hạn bởi nó.

Do đó thể biến đổi thu được có thể được nuôi cấy theo quy trình thông thường, và bằng sự nuôi cấy thể biến đổi, polypeptit mục tiêu được tạo ra trong nội bào hoặc ngoại bào.

Môi trường thích hợp được sử dụng để nuôi cấy có thể được chọn từ các môi trường nuôi cấy được sử dụng thông thường khác nhau phụ thuộc vào tế bào ký chủ được sử dụng. Nếu *E.coli* được sử dụng, ví dụ, môi trường LB được bổ sung kháng sinh như ampixillin hoặc IPMG cần thiết có thể được sử dụng.

Protein tái tổ hợp được điều chế nội bào hoặc ngoại bào bằng thể biến đổi qua sự nuôi cấy có thể được tách và được tinh sạch bằng bất kỳ phương pháp tách đã biết khác nhau sử dụng tính chất vật lý hoặc hóa học của protein.

Các ví dụ cụ thể về các phương pháp bao gồm sự xử lý bằng sự kết tủa, sự siêu lọc protein thông thường, các dạng khác nhau của phép sắc ký lỏng như sắc ký rây phân tử (phương pháp lọc gel), sắc ký hút bám, sắc ký trao đổi ion, và sắc ký ái lực, sự thẩm tách, và sự kết hợp của chúng.

Hơn nữa, bằng cách gắn nhãn sáu gốc histidin vào protein tái tổ hợp để được biểu hiện, protein có thể được tinh sạch hiệu quả bằng cột ái lực niken. Như một sự lựa chọn, bằng cách gắn vùng IgG Fc vào protein tái tổ hợp để được biểu hiện, protein có thể được tinh sạch hiệu quả bằng cột protein A.

Bằng cách kết hợp các phương pháp đã đề cập ở trên, lượng lớn polypeptit mục tiêu có thể được tạo ra rễ ràng với hiệu suất cao và độ tinh sạch cao.

(2) Sản xuất kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15

Các ví dụ về kháng thể liên kết đặc hiệu với Siglec-15 bao gồm kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với Siglec-15, và phương pháp thu kháng thể được

mô tả bên dưới.

Sự sản xuất kháng thể đơn dòng nói chung yêu cầu các bước tiến hành sau:

(a) tinh chế biopolyme được sử dụng làm kháng nguyên;

(b) tạo ra các tế bào sản sinh kháng thể bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng việc tiêm kháng nguyên, thu máu, phân tích hàm lượng kháng thể của nó để xác định khi nào lá lách được cắt bỏ;

(c) tạo ra các tế bào u tủy (sau đây được đề cập đến là "u tủy");

(d) dung hợp các tế bào sản xuất kháng thể với u tủy;

(e) sàng lọc nhóm khối tế bào lai sản xuất kháng thể mong muốn;

(f) chia các khối tế bào lai thành các dòng tế bào đơn (tách dòng);

(g) một cách tùy ý, nuôi cấy tế bào lai hoặc nuôi động vật được cấy tế bào lai để sản xuất lượng lớn kháng thể đơn dòng;

(h) kiểm tra kháng thể đơn dòng được tạo ra như vậy về hoạt tính sinh học và tính đặc hiệu liên kết, hoặc thử nghiệm kháng thể này về các tính chất dưới dạng chất phản ứng được đánh dấu; và tương tự.

Dưới đây, phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả chi tiết theo các bước trên, tuy nhiên, phương pháp không bị giới hạn ở đó, và, ví dụ, các tế bào sản sinh kháng thể và u tủy có thể được sử dụng khác với các tế bào lá lách.

(a) Tinh chế kháng nguyên

Về kháng nguyên, Siglec-15 được điều chế bằng phương pháp như được mô tả ở trên hoặc peptit riêng phần của nó có thể được sử dụng.

Hơn nữa, đoạn màng được tạo ra từ các tế bào tái tổ hợp biểu hiện Siglec-15 hoặc các tế bào tái tổ hợp biểu hiện Siglec-15, và peptit riêng phần của protein của sáng chế cũng được tổng hợp hóa học bằng phương pháp đã biết bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể cũng được sử dụng là

kháng nguyên.

(b) Điều chế các tế bào sản sinh kháng thể

Kháng nguyên được thu trong bước (a) được trộn với tá dược như tá dược hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh của Freund, hoặc nhôm kali sulfat và hỗn hợp tạo thành được sử dụng làm chất miễn dịch để gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm. Về động vật thí nghiệm, động vật bất kỳ được sử dụng trong phương pháp tạo tế bào lai đã biết có thể được sử dụng mà không gặp bất kỳ vấn đề gì. Cụ thể, ví dụ, chuột nhắt, chuột, dê, cừu, gia súc, ngựa, hoặc tương tự có thể được sử dụng. Tuy nhiên, từ quan điểm dễ dàng có được của các tế bào u tủy được dung hợp với các tế bào sản sinh kháng thể được chiết, chuột nhắt hoặc chuột được ưu tiên sử dụng làm động vật được gây miễn dịch.

Hơn nữa, chủng chuột nhắt hoặc chuột được sử dụng không bị giới hạn cụ thể, và trong trường hợp của chuột nhắt, ví dụ, các chủng khác nhau như A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, và 129 có thể được sử dụng, và trong trường hợp của chuột, ví dụ, Wistar, Low, Lewis, Sprague, Dawley, ACI, BN, Fischer, và tương tự có thể được sử dụng.

Các con chuột nhắt và các con chuột có thể mua từ các nhà chọn giống/các nhà phân phối các động vật thí nghiệm, ví dụ, CLEA Japan, Inc. và Charles River Laboratories Japan, Inc.

Trong số này, xét về khả năng tương thích của sự dung hợp với các tế bào u tủy như được mô tả dưới đây, trong trường hợp của chuột nhắt, chủng BALB/c, và trong trường hợp của chuột, các chủng Wistar và Low được đặc biệt ưu tiên làm động vật được gây miễn dịch.

Hơn nữa, xét về mức độ tương đồng kháng nguyên giữa người và chuột, cũng được ưu tiên sử dụng là chuột nhắt có các chức năng sinh học bị giảm để loại bỏ các tự kháng thể, tức là, chuột nhắt mắc bệnh tự miễn.

Độ tuổi của chuột nhắt hoặc chuột ở thời điểm gây miễn dịch tốt hơn là từ 5 đến 12 tuần tuổi, tốt hơn nữa là từ 6 đến 8 tuần tuổi.

Để gây miễn dịch cho động vật bằng Siglec-15 hoặc sự tái tổ hợp của chúng, ví dụ, phương pháp đã biết được mô tả chi tiết trong, ví dụ, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964), hoặc tương tự có thể được sử dụng.

Trong số các phương pháp gây miễn dịch này, phương pháp cụ thể được ưu tiên trong sáng chế là, ví dụ, như sau.

Đó là, đầu tiên, đoạn protein màng đóng vai trò là kháng nguyên hoặc các tế bào biểu hiện kháng nguyên được động vật dùng theo đường trong da hoặc trong màng bụng.

Tuy nhiên, sự kết hợp của cả hai đường dùng là được ưu tiên để tăng hiệu quả gây miễn dịch, và khi sự dùng trong da được tiến hành trong nửa đầu tiên và sự dùng trong màng bụng được tiến hành trong nửa còn lại hoặc chỉ ở liều cuối cùng, hiệu quả gây miễn dịch có thể được tăng lên.

Lịch cung cấp kháng nguyên khác nhau phụ thuộc vào loại động vật được gây miễn dịch, sự khác nhau của các cá thể, hoặc tương tự. Tuy nhiên, nhìn chung, lịch cung cấp trong đó tần suất cung cấp kháng nguyên là 3 đến 6 lần và khoảng cách giữa các liều là 2 đến 6 tuần được ưu tiên, và lịch cung cấp trong đó tần suất cung cấp kháng nguyên là 3 đến 4 lần và khoảng cách giữa các liều là 2 đến 4 tuần được ưu tiên hơn.

Hơn nữa, liều kháng nguyên khác nhau phụ thuộc vào loại động vật được gây miễn dịch, các sự khác nhau của cá thể, hoặc tương tự, tuy nhiên, liều dùng nhìn chung được đặt ra từ 0,05 đến 5 mg, ưu tiên hơn khoảng từ 0,1 đến 0,5 mg.

Sự gây miễn dịch tăng thêm được tiến hành từ 1 đến 6 tuần, ưu tiên từ 2

đến 4 tuần, ưu tiên hơn từ 2 đến 3 tuần sau sự cung cấp kháng nguyên được mô tả ở trên.

Liều kháng nguyên tại thời điểm tiến hành sự gây miễn dịch tăng thêm khác nhau phụ thuộc vào loại hoặc kích thước động vật hoặc tương tự, tuy nhiên, trong trường hợp của chuột nhắt, liều dụng nhìn chung được đặt từ 0,05 đến 5 mg, ưu tiên là 0,1 đến 0,5 mg, ưu tiên hơn là khoảng từ 0,1 đến 0,2 mg.

Các tế bào lá lách hoặc các tế bào lympho bao gồm các tế bào sản sinh kháng thể được loại ra vô trùng từ động vật được gây miễn dịch từ 1 đến 10 ngày, ưu tiên là 2 đến 5 ngày, ưu tiên hơn là 2 đến 3 ngày sau sự gây miễn dịch tăng thêm.

Tại thời điểm này, hàm lượng kháng thể được đo, và nếu con vật có hàm lượng kháng thể tăng đáng kể được sử dụng là nguồn cung cấp các tế bào sản xuất kháng thể, quy trình tiếp theo có thể được tiến hành hiệu quả hơn.

Các ví dụ về phương pháp xác định hàm lượng kháng thể được sử dụng ở đây bao gồm phương pháp RIA và phương pháp ELISA, nhưng phương pháp không bợi giới hạn bởi nó.

Ví dụ, nếu phương pháp ELISA được sử dụng, phép đo hàm lượng kháng thể trong sáng chế có thể được tiến hành theo các quy trình được mô tả bên dưới.

Đầu tiên, kháng nguyên được tinh sạch hoặc được tinh sạch một phần được hút bám lên trên bề mặt của thể rắn như đĩa 96 giếng đối với ELISA, và bề mặt thể rắn không chứa kháng ngyên được hút bám trên đó được phủ bằng protein không liên quan tới kháng nguyên như abumin huyết thanh bò (sau đây được đề cập đến là "BSA"). Sau khi rửa bề mặt, bề mặt này được đưa vào trong sự tiếp xúc với mẫu được pha loãng hàng loạt (ví dụ, huyết thanh chuột nhắt) là kháng thể ban đầu cho phép kháng thể trong mẫu liên kết với kháng nguyên.

Hơn nữa, là kháng thể cấp hai, kháng thể được dán nhãn bằng enzym chống

lại kháng thể chuột nhắt được bổ sung và được cho liên kết với kháng thể chuột nhắt. Sau khi rửa, chất nền đối với enzym được bổ sung và sự thay đổi trong sự hút bám xảy ra do sự phát triển màu thu được bằng sự biến chất của chất nền hoặc tương tự được xác định và hàm lượng kháng thể được tính dựa trên phép đo này.

Sự tách các tế bào sản xuất kháng thể từ các tế bào lá lách hoặc các tế bào lympho có thể được tiến hành theo phương pháp đã biết (ví dụ, Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977), 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature (1977), 266, p. 495).

Ví dụ, trong trường hợp của các tế bào lá lách, phương pháp chung trong đó các tế bào sản xuất kháng thể được tách bằng cách làm đồng nhất là lách để thu các tế bào qua phương pháp lọc bằng lưới lọc thép không gỉ và làm huyền phù các tế bào trong Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) có thể được thực hiện.

(c) Điều chế các tế bào u tủy (sau đây được đề cập đến là "u tủy")

Các tế bào u tủy được sử dụng cho sự dung hợp tế bào không bị giới hạn cụ thể và các tế bào thích hợp có thể được chọn từ các dòng tế bào đã biết. Tuy nhiên, trong sự xem xét sự thuận tiện khi khối tế bào lai được chọn từ các tế bào được dung hợp, được ưu tiên sử dụng chủng thiếu hụt HGPRT (hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferaza) mà quy trình chọn lọc nó đã được xây dựng.

Một cách cụ thể hơn, các ví dụ về chủng thiếu hụt HGPRT bao gồm X63-Ag8(X63), NS1-ANS/1(NS1), P3X63-Ag8.U1(P3U1), X63-Ag8,653(X63,653), SP2/0-Ag14(SP2/0), MPC11-45,6TG1,7(45,6TG), F0, S149/5XXO, và BU,1 thu được từ các con chuột nhắt; 210.RSY3.Ag,1,2,3(Y3) thu được từ các con chuột; và U266AR(SKO-007), GM1500·GTG-A12(GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2(HMy2) và

8226AR/NIP4-1(NP41) thu được từ người.

Các chủng thiếu hụt HGPRT này sẵn có từ, ví dụ, Bộ sưu tập giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection (ATCC)) hoặc tương tự.

Các chủng tế bào này được nuôi cấy cấp hai trong môi trường thích hợp như môi trường 8-azaguanin [môi trường thu được bằng cách bổ sung 8-azaguanin vào môi trường RPMI-1640 được bổ sung bằng glutamin, 2-mercaptoetanol, gentamixin, và huyết thanh nhau thai bê (sau đây được đề cập đến là "FCS")]; Iscove's Modified Dulbecco's Medium (sau đây được đề cập đến là "IMDM"), hoặc Dulbecco's Modified Eagle Medium (sau đây được đề cập đến là "DMEM"). Trong trường hợp này, 3 đến 4 ngày trước khi tiến hành sự dung hợp tế bào, các tế bào được nuôi cấy cấp hai trong môi trường bình thường [ví dụ, môi trường ASF104 (được sản xuất bởi Ajinomoto Co., Ltd.) chứa FCS 10%] để thu không ít hơn 2 x 10^7 tế bào vào ngày dung hợp tế bào.

(d) Sự dung hợp tế bào

Sự dung hợp giữa các tế bào sản xuất kháng thể và các tế bào u tủy có thể được tiến hành thích hợp theo phương pháp đã biết (Weir, D. M. Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. và Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1964), v.v.), dưới cách điều kiện để tỉ lệ sống của các tế bào không bị giảm quá mức.

Phương pháp như, phương pháp hóa học trong đó các tế bào sản xuất kháng thể và các tế bào u tủy được trộn trong dung dịch chứa polyme như polyetylen glycol ở nồng độ cao, phương pháp vật lý sử dụng kích thích điện, hoặc tương tự có thể được sử dụng.

Trong số các phương pháp này, ví dụ cụ thể về phương pháp hóa học được mô tả bên dưới.

Đó là, trong trương hợp khi polyetylen glycol được sử dụng trong dung

dịch chứa polyme ở nồng độ cao, các tế bào sản xuất kháng thể và các tế bào u tủy được trộn trong dung dịch polyetylen glycol có trọng lượng phân tử 1500 đến 6000, ưu tiên hơn là 2000 đến 4000 ở nhiệt độ từ 30 đến 40°C, ưu tiên là từ 35 đến 38°C trong 1 đến 10 phút, ưu tiên là 5 đến 8 phút.

(e) Chọn lọc nhóm khối tế bào lai

Phương pháp chọn lọc khối tế bào lai thu được bằng sự dung hợp tế bào đã đề cập ở trên không bị giới hạn cụ thể. Thường là, phương pháp chọn lọc HAT (hypoxanthin, aminopterin, tymidin) (Kohler et al., Nature (1975), 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550) được sử dụng.

Phương pháp này hiệu quả khi khối tế bào lai được thu sử dụng các tế bào u tủy của chủng thiếu hụt HGPRT không thể sống sót trong sự có mặt của aminopterin.

Nghĩa là, bằng cách nuôi cấy các tế bào không được dung hợp và khối tế bào lai trong môi trường HAT, chỉ khối tế bào lai chịu được aminopterin được phép chọn lọc để sống sót và sinh sôi.

(f) Tách thành dòng tế bào đơn (tách dòng)

Phương pháp tách dòng đối với khối tế bào lai là, phương pháp đã biết như phương pháp metylxenluloza, phương pháp ageroza mềm, hoặc phương pháp pha loãng giới hạn có thể được sử dụng (xem, ví dụ, Barbara, B. M. và Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980)). Trong số các phương pháp này, một cách cụ thể, phương pháp pha loãng giới hạn được ưu tiên.

Trong phương pháp này, chủng tế bào nguyên bào sợi thu được từ bào thai chuột hoặc các tế bào cung cấp như các tế bào lá lách, các tế bào tuyến ức, hoặc các tế bào cổ trướng chuột nhắt bình thường được nhân lên trong đĩa vi cấy.

Trong khi đó, khối tế bào lai được pha loãng trong môi trường để thu được mật độ tế bào từ 0,2 đến 0,5 tế bào trong mỗi 0,2 ml. Phần chia 0,1 ml dung dịch

khối tế bào lai được pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng và việc nuôi cấy được tiếp tục trong khoảng 2 tuần trong khi thay thế khoảng 1/3 dung dịch nuôi cấy bằng môi trường mới tại các khoảng thời gian định trước (ví dụ, mỗi 3 ngày), qua đó các dòng khối tế bào lai có thể được sinh sôi.

Các khối tế bào lai trong các giếng hàm lượng kháng thể được khẳng định được tiến hành, ví dụ, tách dòng bằng phương pháp pha loãng giới hạn lần lượt là 2 đến 4 lần. Khối tế bào lai được khẳng định có hàm lượng kháng thể ổn định được chọn là chủng khối tế bào lại sản xuất kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15.

Các ví dụ về chủng tế bào lai được tách dòng bao gồm khối tế bào lai #32A1 được mô tả trong WO 09/48072. Tế bào lai #32A1 được lưu giữ tại the International Patent Organism Depositary of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (được đặt tại Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan) vào ngày 28 tháng 8 năm 2008, và được đặt số đăng ký FERM BP-10999 dưới tên Khối tế bào lai #32A1 kháng Siglec-15. Ngẫu nhiên là, trong bản mô tả này, kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai #32A1 được đề cập đến là "kháng thể #32A1" hoặc đơn giản là "#32A1". Hơn nữa, các kháng thể thu được trong các ví dụ về sự mô tả này khác với kháng thể #32A1 cũng được thể hiện bằng các tên kháng thể theo cùng cách. Đoạn gen một phần chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể #32A1 chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 167 của SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự. Hơn nữa, đoạn gen một phần chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể #32A1 có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 139 của SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự.

(g) Điều chế kháng thể đơn dòng bằng cách nuôi cấy khối tế bào lai

Bằng cách nuôi cấy khối tế bào lai được chọn lọc, kháng thể đơn dòng có thể được thu hiệu quả. Tuy nhiên, trước khi nuoi cấy, được ưu tiên tiến hành sàng lọc khối tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng quan tâm.

Trong sự sàng lọc này, phương pháp đã biết có thể được tiến hành.

Sự xác định hàm lượng kháng thể trong sáng chế có thể được tiến hành bằng, ví dụ, phương pháp ELISA được giải thích trong điểm (b) được mô tả ở trên.

Tế bào lai thu được bằng phương pháp được mô tả ở trên có thể được lưu giữ trong tình trạng đông lạnh trong nitơ lỏng hoặc trong tủ lạnh sâu ở -80°C hoặc thấp hơn.

Sau khi hoàn thành việc tách dòng, môi trường được thay đổi từ môi trường HT thành môi trường bình thường, và tế bào lai được nuôi cấy.

Việc nuôi cấy quy mô lớn được tiến hành bằng sự nuôi cấy quay vòng sử dụng chai nuôi cấy lớn hoặc bằng nuôi cấy xa quay (spinner culture).

Từ nổi bề mặt thu được bằng nuôi cấy quy mô lớn, kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với protein của sáng chế có thể thu được bằng sự tinh chế sử dụng phương pháp đã biết bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp lọc gel.

Hơn nữa, tế bào lai được tiêm vào trong khoang bụng của chuột nhắt cùng chủng như tế bào lai (ví dụ, BALB/c đã đề cập ở trên) hoặc chuột nhắt Nu/Nu để tăng sinh tế bào lai, qua đó cổ trướng chứa lượng lớn của kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được thu.

Trong trường hợp khi tế bào lai được cung cấp trong khoang bụng, nếu dầu thô như 2,6,10,14-tetrametyl pentadecan (pristan) được cung cấp 3 đến 7 ngày trước đó, lượng lớn cổ trướng có thể được thu.

Ví dụ, sự suy giảm khả năng miễn dịch được tiêm vào trong khoang bụng của chuột nhắt của cùng chủng như tế bào lai để bất hoạt các tế bào T. 20 ngày sau đó, 10^6 đến 10^7 các tế bào đơn dòng khối tế bào lai được làm huyền phù trong môi trường không huyết tương (0,5 ml), và dịch nổi được tiêm vào trong khoang bụng của the chuột nhắt. Nhìn chung, khi bụng được phình to và được

lấp đầy bằng cổ trướng, các cổ trướng được thu từ chuột nhắt.

Bằng phương pháp này, kháng thể đơn dòng có thể được thu ở nồng độ cao hơn khoảng 100 lần hoặc cao hơn so với trong dung dịch nuôi cấy.

Kháng thể đơn dòng thu được bằng phương pháp đã đề cập ở trên có thể được tinh sạch bằng phương pháp được mô tả trong, ví dụ, Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

Nghĩa là, các ví dụ về phương pháp bao gồm phương pháp kết tủa ammoni sulfat, phương pháp lọc gel, sắc ký trao đổi ion, và sắc ký ái lực.

Phương pháp tinh chế đơn giản là, kit tinh chế kháng thể đơn dòng có giá trị thương mại (ví dụ, Kit MAbTrap GII được sản xuất bởi Pharmacia, Inc.) hoặc tương tự có thể cũng được sử dụng.

Kháng thể đơn dòng thu được từ đó có tính đặc hiệu kháng nguyên cao đối với Siglec-15.

(h) Phân tích kháng thể đơn dòng

Phân loại và phân lớp của kháng thể đơn dòng thu được từ đó có thể được xác định như sau.

Đầu tiên, các ví dụ về phương pháp xác định này bao gồm phương pháp Ouchterlony, phương pháp ELISA và phương pháp RIA.

Phương pháp Ouchterlony đơn giản, nhưng khi nồng độ của kháng thể đơn dòng thấp, quy trình hóa đặc được yêu cầu.

Mặt khác, khi phương pháp ELISA hoặc RIA được sử dụng, bằng cách cho phản ứng dịch nổi nuôi cấy với thể rắn được hút bám kháng nguyên và sử dụng các kháng thể tương ứng với các dạng khác nhau của các phân loại và các phân lớp globulin miễn dịch là các kháng thể cấp hai, phân loại và phân lớp của kháng thể đơn dòng có thể được nhận biết.

Ngoài ra, phương pháp đơn giản hơn là, kit nhận biết được thương mại hóa (ví dụ, Kit Muose Typer được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) hoặc tương tự có thể cũng được sử dụng.

Hơn nữa, việc xác định hàm lượng protein có thể được tiến hành bằng phương pháp Folin Lowry và phương pháp tính toán dựa trên sự hút bám ở 280 nm [1,4 (OD 280) = Globulin miễn dịch 1 mg/ml].

(3) Các kháng thể khác

Kháng thể của sáng chế bao gồm không chỉ kháng thể đơn dòng chống lại Siglec-15 đã đề cập ở trên mà còn kháng thể tái tổ hợp thu được bằng sự cải biến được làm tương thích với người cho mục đích làm giảm tính kháng nguyên khác dòng đối với người như kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể người. Các kháng thể này có thể được sản xuất sử dụng phương pháp đã biết.

Kháng thể khảm là, kháng thể trong đó các vùng bảo toàn và vùng biến đổi của kháng thể thu được từ các loài khác nhau, ví dụ, kháng thể khảm trong đó vùng biến đổi kháng thể được thu từ chuột nhắt hoặc chuột được kếp hợp với vùng bảo toàn được thu từ người có thể là ví dụ (xem Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)). Một ví dụ về kháng thể khảm thu được từ kháng thể kháng chuột nhắt của chuột #32A1, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 41 trong phần danh mục trình tự và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 237 của SEQ ID NO: 43 trong phần danh mục trình tự có thể là ví dụ.

Kháng thể được làm tương thích với người là, kháng thể thu được bằng việc hòa nhập chỉ vùng quyết định tính bù (complementarity determining region - CDR) vào trong kháng thể thu được từ người (xem Nature (1986) 321, pp. 522-525), và kháng thể thu được bằng cách ghép một phần của các gốc axit

amin của khung đọc cũng như trình tự CDR với kháng thể người bằng phương pháp ghép CDR (WO 90/07861) có thể là ví dụ. Ví dụ về kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể của chuột #32A1 là, sự kết hợp độc quyền của chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 51 trong phần danh mục trình tự, các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 53, các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 55, các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 57, các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 59, các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 99, các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 101, hoặc các gốc axit amin 1 đến 121 của bất kỳ một trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOS: 72 đến 77 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 61, các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 63, các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 65, các gốc axit amin từ 21 đến 132 của SEQ ID NO: 67, các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 69, các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 71, các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 103, các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 105, hoặc các gốc axit amin từ 1 đến 113 của bất kỳ một trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NOS: 78 đến 96 có thể là ví dụ.

Sự kết hợp được ưu tiên là, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 51 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 61, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 53 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 63, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ

ID NO: 55 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 65, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 132 của SEQ ID NO: 67, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 57 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 69, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 59 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 71, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 99 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 69, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 101 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 69, kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 99 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 103, hoặc kháng thể chứa chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của SEQ ID NO: 99 và chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của SEQ ID NO: 105 có thể là ví dụ.

Sự kết hợp được ưu tiên hơn là, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit

amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 51 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 61, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 53 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 63, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 65, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 237 của SEQ ID NO: 67, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 57 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 69, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 470 của SEQ ID NO: 59 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 71, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của SEQ ID NO: 99 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 69, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của SEQ ID NO: 101 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 69, kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của SEQ ID NO: 99 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 103, hoặc kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 466 của SEQ ID NO: 99 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 238 của SEQ ID NO: 105 có thể là ví dụ.

Tuy nhiên, kháng thể được làm tương thích với người thu được từ kháng

thể #32A1 không bị giới hạn bởi các kháng thể được làm tương thích với người đã đề cập ở trên miễn là kháng thể được làm tương thích với người có 6 dạng trình tự CDR của #32A1 và có hoạt tính ức chế sự hình thành tế bào hủy xương. Ngẫu nhiên là, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể #32A1 có CDRH1 (DYFMN) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44, trình tư khác của CDRH2 (QIRNKIYTYATFYAESLEG) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45 và CDRH2 (QIRNKIYTYATFYA) nêu trong SEQ ID NO: 97, và CDRH3 (SLTGGDYFDY) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46. CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 45 phù hợp với định nghĩa Kabat (SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST VOL. I, FIFTH EDTION (1991)). CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 97 được tạo ra ngắn hơn 5 gốc ở đầu C so với định nghĩa Kabat. Trong chuỗi nặng chứa CDRH2 này, trình tự CDR thu được từ chuột được tạo ra ngắn hơn và nhiều hơn trình tự khung đọc của người được hợp nhất, và do đó, khi nó được cung cấp đến người, nó ít khả năng được nhận biết hơn nhiều là kháng nguyên khác dòng. Hơn nữa, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể #32A1 có CDRL1 (RASQSVTISGYSFIH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47, CDRL2 (RASNLAS) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48, và CDRL3 (QQSRKSPWT) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49.

Hơn nữa, kháng thể của sáng chế bao gồm kháng thể người. Kháng thể người kháng Siglec-15 đề cập đến kháng thể người chỉ có trình tự gen của kháng thể thu được từ nhiễm sắc thể người. Kháng thể người kháng Siglec-15 có thể thu được bằng phương pháp sử dụng chuột nhắt sản xuất kháng thể người có đoạng nhiễm sắc thể người chứa các gen chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể người (xem Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, pp. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, pp. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic và Applied Aspects vol. 10, pp. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. và Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, pp. 722-727, v.v.).

Chuột nhắt sản xuất kháng thể người này có thể được tạo ra đặc hiệu như sau. Động vật được cải biến di truyền trong đó locut gen chuỗi nặng và nhẹ globulin miễn dịch nội sinh được phá vỡ, và được thay thế, locut gen chuỗi nặng và nhẹ globulin miễn dịch của người được đưa vào qua vectơ nhiễm sắc thể nấm men (yeast artificial chromosome - YAC) hoặc tương tự được tạo ra bằng cách tạo ra động vật bất hoạt gen và động vật chuyển gen và cho giao phối các con vật này.

Hơn nữa, theo kỹ thuật gen, bằng cách sử dụng các cADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người, lần lượt, và ưu tiên là vectơ chứa các cADN, các tế bào nhân thật được biến đổi, và các thể biến đổi sản xuất kháng thể đơn dòng người tái tổ hợp được nuôi cấy, qua đó kháng thể có thể cũng được thu tự dịch nổi nuôi cấy.

Ở đây, ký chủ là, ví dụ, các tế bào nhân thật, ưu tiên là các tế bào động vật có vú như các tế bào CHO, các tế bào lympho hoặc các tế bào u tủy có thể được sử dụng.

Hơn nữa, phương pháp thu kháng thể người được thu từ sự biểu lộ thực khuẩn thể được sàng lọc từ thư viện kháng thể người (xem Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), pp. 2301-2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), pp. 189-203; Siriwardena, D. et al., Opthalmology (2002) 109 (3), pp. 427-431, v.v.) cũng đã biết.

Ví dụ, phương pháp biểu lộ thực khuẩn thể trong đó vùng biến đổi của kháng thể người được biểu hiện trên bề mặt của thực khuẩn thể là kháng thể chuỗi đơn (kháng thể chuỗi đơn (scFv)), và thực khuẩn thể liên kết với kháng nguyên được chọn lọc (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pp. 1105-1116) có thể được sử dụng.

Bằng sự phân tích gen của thực khuẩn thể được chọn lọc dựa trên sự liên kết với kháng nguyên, trình tự ADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể người liên kết với kháng nguyên có thể được xác định.

Nếu trình tự ADN của scFv liên kết với kháng nguyên được xác định, kháng thể người có thể thu được bằng cách tạo ra vectơ biểu hiện chứa trình tự này và đứa vectơ này vào trong ký chủ thích hợp để biểu hiện nó (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, pp. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pp. 1105-1116).

Các kháng thể thu được bằng phương pháp ở trên được đánh giá về tính chất của sự liên kết với kháng nguyên by phương pháp được mô tả trong Ví dụ 25 hoặc tương tự, và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn lọc. Một ví dụ về chỉ số khác khi các tính chất của các kháng thể được so sánh, tính ổn định của các kháng thể có thể là ví dụ. Phép đo lượng hiệt quét sự khác biệt (differential scanning calorimetry - DSC) được chỉ ra trong Ví dụ 33 là dụng cụ có khả năng xác định chính xác và nhanh chóng nhiệt độ trung điểm làm biến chất nhiệt (midpoint temperature (Tm)) là chỉ số thuận lợi của tính ổn định cấu trúc liên quan của các protein. Bằng cách xác định các giá trị Tm sử dụng DSC và so sánh các giá trị, sự khác biệt trong tính ổn định nhiệt có thể được so sánh. Đã biết là tính ổn định dự trự của các kháng thể thể hiện một số tương quan với tính ổn định nhiệt của các kháng thể (Lori Burton, et. al., Dược phẩm Development and Technology (2007) 12, pp. 265-273), và kháng thể được ưu tiên có thể được chọn lọc bằng cách sử dụng tính ổn định nhiệt làm chỉ số. Các ví dụ về các chỉ số khác đối với sự chọn lọc các kháng thể bao gồm như sau: hiệu suất trong tế bào ký chủ thích hợp cao và khả năng kết tụ trong dung dịch nước thấp. Ví dụ, kháng thể thể hiện hiệu suất cao nhất luôn không thể hiện tính ổn định nhiệt cao, và do đó, cần thiết để chọn lọc kháng thể thích hợp nhất để cung cấp đến người bằng cách tạo ra sự đánh giá toàn diện dựa trên các chỉ số đã được đề cập ở trên.

Hơn nữa, phương pháp trong đó các và trình tự chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ của kháng thể được ghép sử dụng các cầu nối thích hợp, qua đó globulin miễn dịch chuỗi đơn được thu cũng đã biết (Lee, H-S, et. al., Molecular Immunology (1999) 36, pp. 61-71; Shirrmann, T. et. al., mAbs (2010), 2, (1) pp. 1-4). Bằng cách nhị trùng hóa globulin miễn dịch chuỗi đơn này, đime thu được có thể có cấu trúc và hoạt tính tương tự như của kháng thể tự nó có cấu trúc bậc bốn. Hơn nữa, kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng đơn và không có trình tự chuỗi nhẹ. Kháng thể này được gọi là kháng thể vùng đơn (single domain antibody - sdAb) hoặc nanobody, và trong thực tế, nó được khảo sát trong lạc đà có bướu và lạc đà không bướu và đã được báo cáo có ái lực liên kết kháng nguyên (Muyldemans S. et. al., Protein Eng. (1994) 7(9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et. al., Nature (1993) 363 (6428) 446-8). Có thể được hiểu rằng các kháng thể được đề cập ở trên là các dạng của đoạn chức năng của kháng thể theo sáng chế.

Hơn nữa, bằng sự kiểm soát sự glycosyl hóa trong đó glycan được liên kết với kháng thể của sáng chế, có thể làm tăng cường hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Các kỹ thuật liên quan để kiểm soát sự glycosyl hóa của các kháng thể, WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, v.v. đã được biết. Tuy nhiên, các kỹ thuật này không bị giới hạn bởi chúng.

Trong các trường hợp khi kháng thể được tạo ra bởi đầu tiên là sự phân lập gen kháng thể và sau đó đưa gen này vào trong ký chủ thích, sự kết hợp của ký chủ thích hợp và vectơ biểu hiện thích hợp có thể được sử dụng. Các ví dụ cụ thể về gen kháng thể bao gồm sự kết hợp gen mã hóa chuỗi nặng của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và gen mã hóa trình tự chuỗi nhẹ của chúng. Khi tế bào ký chủ được biến đổi, có thể chèn gen chuỗi nặng và gen trình tự chuỗi nhẹ vào trong cùng vectơ biểu hện, và cũng vào trong các vectơ biểu hện khác riêng biệt. Trong các trường hợp khi các tế bào nhân thật được sử dụng là ký chủ, các tế bào động vật, các tế bào thực vật, và các vi sinh vật nhận thật có

thể được sử dụng. Các tế bào động vật là, (1) các tế bào động vật có vú, ví dụ, các chủng thiếu hụt dihydrofolat reductaza (Urlaub, G. và Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, pp. 4126-4220) của các tế bào COS của khỉ (Gluzman, Y., Cell, (1981) 23, pp. 175-182, ATCC CRL-1650), các nguyên bào sợi chuột NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), và các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO cells; ATCC: CCL-61); có thể là ví dụ. Hơn nữa, trong các trường hợp khi các tế bào tiền nhân được sử dụng, ví dụ, *E.coli* và Bacillus subtilis có thể là ví dụ. Bằng cách đưa gen kháng thể quan tâm vào trong các tế bào này qua sự biến đổi gen, và nuôi cấy các tế bào đã biến đổi đó *in vitro*, kháng thể có thể được thu. Trong phương pháp nuôi cấy đã đề cập ở trên, hiệu suất có thể đôi khi khác nhau thụ thuộc vào trình tự của kháng thể, và do đó, có thể chọn lọc loại được sản xuất dễ dàng là dược phẩm bằng cách sử dụng hiệu suất là chỉ số trong số các kháng thể có hoạt tính liên kết có thể so sánh được.

Không có sự giới hạn trong phân loại của kháng thể của sáng chế, và các ví dụ về chúng bao gồm IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (IgA1, IgA2), IgD, và IgE, và các ví dụ được ưu tiên về chúng về chúng bao gồm IgG và IgM, và hơn nữa, các ví dụ được ưu tiên hơn về chúng về chúng bao gồm IgG1 và IgG2.

Hơn nữa, kháng thể của sáng chế có thể là đoạn chức năng của kháng thể chứa vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc đoạn được cải biến của chúng. Đoạn của kháng thể có thể thu được bằng cách xử lý kháng thể bằng proteaza như papain hoặc pepsin, hoặc cải biến gen kháng thể theo kỹ thuật gen và biểu hiện gen được cải biến trong các tế bào được nuôi cấy tích hợp. Trong số các đoạn kháng thể này, đoạn có toàn bộ hoặc một phần các chức năng của phân tử có chiều dài đầy đủ của kháng thể có thể được gọi là đoạn chức năng của kháng thể. Các chức năng của kháng thể là, nói chung là hoạt tính liên kết kháng nguyên, hoạt tính làn trung hòa hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính làm tăng hoạt tính của kháng nguyên, hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, hoạt

tính gây độc tế bào phụ thuộc phần bù, và hoạt tính gây độc tế bào thuộc tế bào phụ thuộc phần bù có thể là ví dụ. Chức năng của đoạn chức năng của kháng thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết với Siglec-15, ưu tiên là hoạt tính ức chế sự hình thành các tế bào hủy xương, ưu tiên hơn là hoạt tính ức chế quá trình dung hợp tế bào của các tế bào hủy xương.

Các ví dụ về đoạn gen của kháng thể bao gồm Fab, F(ab')2, Fv, Fv chuỗi đơn (scFv) trong đó các phân tử Fv của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được ghép qua cầu nối thích hợp, diabody (các diabody), kháng thể tuyến tính, và kháng thể đa hiệu bao gồm đoạn kháng thể. Hơn nữa, Fab' là đoạn đơn trị trong vùng biến đổi của kháng thể thu được bằng cách xử lý F(ab')2 dưới các điều kiện khử cũng được quan tâm là đoạn gen của kháng thể.

Hơn nữa, kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể đa hiệu với sự đặc hiệu đối với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Nhìn chung, phân tử liên kết với hai kháng nguyên này (Nghĩa là, kháng thể hai loài), tuy nhiên, "kháng thể đa hiệu" theo sáng chế bao gồm kháng thể có tính đặc hiệu đối với hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, ba) kháng nguyên.

Kháng thể đa hiệu của sáng chế có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn gen của kháng thể này (ví dụ, kháng thể hai loài F(ab')2). Kháng thể hai loài có thể được tạo ra bằng cách ghép các chuỗi nặng và nhẹ (các cặp HL) của hai loại của các kháng thể, hoặc có thể cũng được tạo ra bằng cách dung hợp khối tế bào lai sản xuất các kháng thể đơn dòng khác nhau để tạo ra các tế bào sản xuất kháng thể hai loài được dung hợp (Millstein et al., Nature (1983) 305, pp. 537-539).

Kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể chuỗi đơn (cũng được đề cập đến là scFv). Kháng thể chuỗi đơn có thể thu được bằng cách ghép vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể qua cầu nối polypeptit (Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113 (được tái bản bởi Rosenburg và Moore, Springer Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Nature

Biotechnology (2005), 23, pp. 1126-1136). Hơn nữa, đoạn BiscFv được tạo ra bằng cách ghép hai phân tử scFv qua cầu nối polypeptit có thể cũng được sử dụng là kháng thể hai loài.

Phương pháp sản xuất kháng thể chuỗi đơn đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, US patent Nos. 4,946,778, 5,260,203, 5,091,513, 5,455,030, v.v.). Trong scFv này, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được ghép qua cầu nối không hình thành trục liên hợp, ưu tiên là qua cầu nối polypeptit (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, pp. 5879-5883). Trong scFv, vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể thu được từ cùng kháng thể hoặc các kháng thể khác nhau.

Cầu nối polypeptit được sử dụng để ghép các vùng biến đổi là, ví dụ, peptit chuỗi đơn được bao gồm 12 đến 19 gốc được sử dụng.

ADN mã hóa scFv có thể thu được bằng cách tiến hành sự khuếch đại sử dụng ADN mã hóa trình tự axit amin toàn bộ, hoặc trình tự axit amin một phần mong muốn, được chọn từ chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể đã được đề cập ở trên và chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chúng làm khuôn bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi xác định cả hai đầu của chúng, và tiến hành thêm sự khuếch đại bằng cách kết hợp ADN mã hóa phần cầu nối polypeptit và cặp mồi xác định cả hai đầu của chúng để ghép cả hai đầu tương ứng vào chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Hơn nữa, khi ADN mã hóa scFv được tạo ra, vectơ biểu hện chứa cùng như vậy và ký chủ được biến đổi bằng vectơ biểu hện có thể được thu theo các quy trình thông thường. Hơn nữa, bằng cách sử dụng ký chủ thu được, scFv có thể được thu theo các quy trình thông thường. Đoạn kháng thể của chúng có thể được tạo ra trong ký chủ bằng cách thu gen và biểu hiện gen theo cùng cách như được mô tả ở trên.

Kháng thể của sáng chế có thể được multimer hóa để tăng ái lực của nó đối

với kháng nguyên. Kháng thể được multimer hóa có thể là một dạng của kháng thể hoặc nhiều các kháng thể nhận biết nhiều nhân tố quyết định kháng nguyên của cùng kháng nguyên. Phương pháp multimer hóa của kháng thể là, sự liên kết của vùng IgG CH3 với hai phân tử scFv, liên kết với streptavidin, sự đưa vào mô hình xoắn ốc hướng xoắn ốc và tương tự có thể là ví dụ.

Kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể đa dòng là hỗn hợp của nhiều dạng các kháng thể kháng Siglec-15 có các trình tự axit amin khác nhau. Một ví dụ về kháng thể đa dòng là, hỗn hợp nhiều loại của các kháng thể có CDR khác nhau có thể là ví dụ. Kháng thể đa dòng này là, hỗn hợp các tế bào sản xuất các kháng thể khác nhau được nuôi cấy, và kháng thể được tinh sạch từ sự nuôi cấy thu được có thể được sử dụng (xem WO 2004/061104).

Kháng thể được cải biến là, kháng thể liên kết với bất kỳ các dạng khác nhau của các phân tử như polyetylen glycol (PEG) có thể cũng được sử dụng.

Hơn nữa, kháng thể của sáng chế có thể là ở dạng kết hợp được hình thành giữa bất kỳ các kháng thể này và các tác nhận dược lý khác (kết hợp miễn dịch). Các ví dụ về kháng thể này bao gồm chất trong đó kháng thể được kết hợp với chất phóng xạ hoặc hỗn hợp có tác động dược lý (Nature Biotechnology (2005) 23, pp. 1137-1146).

Kháng thể thu được có thể được tinh sạch để đồng nhất. Sự tách và tinh chế kháng thể có thể được tiến hành sử dụng phương pháp tách và tinh chế protein thông thường. Ví dụ, kháng thể có thể được tách và được tinh sạch bằng cách chọn lọc thích hợp và kết hợp phương pháp sắc ký cột, phương pháp lọc bằng thiết bị lọc, lọc bằng máy siêu lọc, sự kết tủa muối, sự thẩm tách, điện di gel polyacrylamit chuẩn bị trước , điện di trọng tâm đẳng điện, và tương tự (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow và David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), nhưng phương pháp không bợi giới hạn bởi

nó.

Các ví dụ về phương pháp sắc ký này bao gồm sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion, sắc ký kỵ nước, sắc ký lọc gel, sắc ký pha nghịch đảo, và sắc ký hút bám.

Phương pháp sắc ký này có thể được tiến hành sử dụng sắc ký lỏng như HPLC hoặc FPLC.

Cột được sử dụng trong sắc ký ái lực là, cột protein A và cột protein G có thể là ví dụ.

Ví dụ, là cột sử dụng cột protein A, Hyper D, POROS, Sepharose FF (Pharmacia) và tương tự có thể là ví dụ.

Hơn nữa, bằng cách sử dụng chất mang có kháng nguyên được cố định trên đó, kháng thể cũng có thể được tinh sạch sử dụng tính chất liên kết của kháng thể với kháng nguyên.

4. Dược phẩm chứa kháng thể kháng Siglec-15

Từ các kháng thể kháng Siglec-15 thu được bằng phương pháp được mô tả trong trong phần "3 ở trên. Sự sản xuất kháng thể kháng Siglec-15", kháng trung hòa hoạt tính sinh học của Siglec-15 có thể được thu. Kháng thể trung hòa hoạt tính sinh học của Siglec-15 ức chế hoạt tính sinh học của Siglec-15 *in vivo*, tức là, sự phân hóa và/hoặc sự trưởng thành của các tế bào hủy xương, và từ đó có thể được sử dụng là chất ngăn ngừa và/hoặc điều trị sự chuyển hóa xương bất thường gây ra bởi sự phân hóa và/hoặc sự trưởng thành bất thường của các tế bào hủy xương là dược phẩm. Sự chuyển hóa xương bất thường có thể là rối loạn bất kỳ khác biệt ở chỗ sự mất xương mạng lưới (bệnh thiếu xương hoặc bệnh hủy xương). Nhìn chung, sự điều trị và/hoặc sự ngăn ngừa bằng kháng thể kháng Siglec-15 được ứng dụng đối với trường hợp khi sự ức chế sự tái hấp thu xương được yêu cầu. Các ví dụ về sự chuyển hóa xương bất thường có thể được điều trị và/hoặc ngăn ngừa bằng kháng thể kháng Siglec-15 bao gồm bệnh loãng xương (bệnh loãng xương sau mãn kinh, bệnh loãng xương tuổi già, bệnh loãng

xương thứ cấp do việc sử dụng các thuốc điều trị như steroit hoặc sự suy giảm khả năng miễn dịch, hoặc bệnh loãng xương kèm theo viêm đa khớp), sự phân hủy xương kèm theo viêm đa khớp, sự tăng canxi huyết ác tính, sự phân hủy xương kèm theo bệnh u đa tủy hoặc sự di căn ung thư đến xương, khối u tế bào khổng lồ, bệnh thiếu xương, rụng răng do viêm nha chu, thoái hóa xương xung quanh vùng liên kết với răng giả, sự phân hủy xương trong bệnh viêm tủy xương mãn tính, Bệnh Paget của xương, bệnh loạn dưỡng xương thận, và bệnh xương thủy tinh, tuy nhiên, sự chuyển hóa xương bất thường không bợi giới hạn bởi nó miễn là là bệnh đi kèm bởi sự mất xương mạng lưới được gây ra bởi các tế bào hủy xương. Các ví dụ về kháng thể kháng Siglec-15 được sử dụng là dược phẩm đã được đề cập ở trên bao gồm kháng thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người được sản xuất từ kháng thể #32A1 bằng phương pháp được mô tả trong phần 3. "(3) Các kháng thể khác". Hơn nữa, kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người, và kháng thể người chia sẻ cùng nhân tố quyết định kháng nguyên là kháng thể #32A1 có thể cũng được sử dụng là dược phẩm. Có hay không kháng thể kháng Siglec-15 nào đó chia sẻ cùng nhân tố quyết định kháng nguyên là kháng thể #32A1 có thể được khẳng định bằng cách khảo sát có hay không các kháng thể này liên kết với cùng peptit một phần cụ thể của Siglec-15. Hơn nữa, cũng có thể được xác định nếu kháng thể kháng Siglec-15 cụ thể cạnh tranh với kháng thể #32A1 để liên kết với Siglec-15, các kháng thể này chia sẻ cùng nhân tố quyết định kháng nguyên.

Khả năng *in vitro* của kháng thể kháng Siglec-15 của sự trung hòa hoạt tính sinh học của Siglec-15 có thể được xác định bằng, ví dụ, hoạt tính ức chế sự phân hóa của các tế bào biểu hiện quá mức Siglec-15 thành các tế bào hủy xương. Ví dụ, kháng thể kháng Siglec-15 được bổ sung vào các tế bào RAW 264,7 hoặc các tế bào AW 264 là dòng tế bào thu được từ bạch cầu đơn nhân của chuột nhắt ở các nồng độ khác nhau, và hoạt tính ức chế sự phân hóa thành các tế bào hủy xương bằng sự kích thích bằng RANKL hoặc TNF-α có thể được xác

định. Hơn nữa, kháng thể kháng Siglec-15 được bổ sung vào các tế bào nuôi cấy sơ cấp thu được từ tủy xương ở các nồng độ khác nhau, và hoạt tính ức chế sự phân hóa thành các tế bào hủy xương by sự kích thích bằng RANKL, TNF-α, hoặc vitamin D3 hoạt tính có thể được xác định. Hơn nữa, kháng thể kháng Siglec-15 được bổ sung đến các tế bào tiền tế bào hủy xương bình thường của người (Các tế bào tiền tế bào hủy xương tự nhiên của người bình thường, có từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) ở các nồng độ khác nhau, và hoạt tính ức chế sự phân hóa thành các tế bào hủy xương bằng sự kích thích bằng RANKL hoặc M-CSF có thể được xác định. Hiệu quả ức chế sự phân hóa tế bào hủy xương này có thể được xác định bằng sử dụng sự ức chế hoạt tính axit phosphataza kháng tartrat (tartrate-resistant acid phosphatase - TRAP) của các tế bào hủy xương là chỉ số. Hơn nữa, hiệu quả ức chế trên sự phân hóa tế bào hủy xương cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng sự ức chế sự hình thành của các tế bào hủy xương đa nhân dương tính với TRAP, nghĩa là, sự ức chế sự dung hợp tế bào của các tế bào hủy xương là chỉ số. Hơn nữa, trong thí nghiệm sử dụng phép phân tích hố (pit assay) (Takada et al., Bone and Mineral, (1992) 17, 347-359) sử dụng các tế bào thu được từ xương đùi và/hoặc xương chày, hoạt tính *in vitro* của sự ức chế sự tái hấp thu xương bởi các tế bào hủy xương có thể được xác định bằng cách bổ sung kháng thể kháng Siglec-15 vào các tế bào thu được từ xương đùi hoặc xương chày ở các nồng độ khác nhau, và khảo sát sự hình thành hố trên lớp ngà răng. Là hệ thống để xác định hoạt tính *in vitro* của sự ức chế sự tái hấp thu xương bởi các tế bào hủy xương, cũng có thể được sử dụng đĩa cấy được phủ bằng collagen người được liên kết với ơ-rô-pi (Eu). Hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa *in vivo* của kháng thể kháng Siglec-15 trên sự chuyển hóa xương bất thường sử dụng dộng vật thí nghiệm có thể được khẳng định bằng cách cung cấp kháng thể kháng Siglec-15 đến mầu động vật có bệnh loãng xương hoặc động vật chuyển gen biểu hiện quá mức Siglec-15 và đo sự thay đổi bất kỳ trong các tế bào hủy xương.

Kháng thể thu được từ đó trung hòa hoạt tính sinh học của Siglec-15 hữu dụng là dược phẩm, cụ thể là dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường như bệnh loãng xương, sự phân hủy xương kèm theo viêm đa khớp, hoặc sự phân hủy xương kèm theo sự di căn ung thư đến xương, hoặc là kháng thể cho chuẩn đoán miễn dịch học của bệnh này.

Trong sự điều trị viêm đa khớp (RA), vấn đề chính là sự mất xương kèm theo sự xuất hiện của bệnh. Đã có báo cáo rằng trong sự mất xương kèm theo RA này, các tế bào hủy xương đóng vai trò tiền tố. Nhứng sự gây độc tế bào được coi là quan trọng nhất đối với sự cảm ứng tế bào hủy xương (sự phân hóa và sự trưởng thành) và sự hoạt hóa và là nguyên nhân của sự hủy xương trong RA là RANKL và TNF-α (Romas E. et al., Bone 30, pp. 340-346, 2002). OCIF/OPG là thụ thể bẫy đối với RANKL có thể ức chế sự hình thành tế bào hủy xương gây ra bởi RANKL nhưng không ức chế sự hình thành tế bào hủy xương gây ra bởi TNF-α. Mặt khác, kháng thể kháng Siglec-15 theo sáng chế ức chế hiệu quả sự hình thành tế bào hủy xương gây ra bởi cả RANKL và TNF-α. Do đó, được cho rằng kháng thể kháng Siglec-15 của sáng chế có thể ức chế sự mất xương và sự hủy xương gây ra bởi TNF-α trong RA hoặc tương tự mạnh hơn khóa RANKL (OCIF/OPG, kháng thể kháng RANKL, hoặc tương tự).

Là ví dụ, để sự điều trị hoặc sự ngăn ngừa của sự chuyển hóa xương bất thường, kháng thể kháng Siglec-15 có thể được cung cấp một mình hoặc trong sự kết hợp với ít nhất một chất trị liệu khác cho bênh liên quan tới xương. Là ví dụ khác, kháng thể kháng Siglec-15 có thể được cung cấp trong sự kết hợp với lượng hữu hiệu trong điều trị chất trị liệu đối với sự chuyển hóa xương bất thường. Các ví dụ về chất trị liệu có thể được cung cấp trong sự kết hợp với kháng thể kháng Siglec-15 bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi: các bisphosphonat (ví dụ, alendronat, etidronat, ibandronat, incadronat, pamidronat, risedronat, và zoledronat), vitamin D3 hoạt tính, canxitonin và các dẫn xuất của chúng, các hormon như estradiol, SERMs (selective estrogen receptor

modulators - các bộ điều biến thụ thể estrogen chọn lọc), ipriflavon, vitamin K_2 (menatetrenon), các chế phẩm canxi, PTH (hormon tuyến cận giáp), các chất kháng viêm không steroit (ví dụ, celecoxib và rofecoxib), các thụ thể TNF hòa tan (ví dụ, etanercept), các kháng thể kháng TNF-α hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này (ví dụ, infliximab), các kháng thể kháng PTHrP (protein liên quan đến hormon tuyến cận giáp) hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các chất đối kháng thụ thể IL-1 (ví dụ, anakinra), các kháng thể kháng thụ thể IL-6 hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này (ví dụ, tocilizumab), các kháng thể kháng RANKL hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này (ví dụ, denosumab), và OCIF (nhân tố ức chế sự sản sinh tế bào hủy xương). Phụ thuộc vào tình trạng sự chuyển hóa xương bất thường hoặc độ mông muốn của sự điều trị và/hoặc sự ngăn ngừa, hai hoặc ba, hoặc nhiều hơn các dạng chất dược có thể được cung cấp, và các chất dược lý này có thể được cung cấp tất cả cùng nhau bằng cách chứa đựng chúng trong cùng chế phẩm. Các chất dược lý này và kháng thể kháng Siglec-15 có thể được cung cấp tất cả cùng nhau bằng cách chứa đựng chúng trong cùng chế phẩm. Hơn nữa, các chất dược lý này có thể được cung cấp tất cả cùng nhau bằng cách chứa đựng chúng kaf kit được sử dụng để điều trị và/hoặc sự ngăn ngừa. Hơn nữa, các chất dược lý này và kháng thể kháng Siglec-15 có thể được cung cấp riêng rẽ. Trong trường hợp của sự cung cấp trong trị liệu gen, gen of chất trị liệu protein đối với bệnh về xương và gen của kháng thể kháng Siglec-15 có thể được tăng tỉ lệ thuận với cùng vùng khởi động (promoter) hoặc các vùng khởi động khác nhau, và có thể được đưa vào trong cùng vectơ hoặc các vectơ khác nhau.

Bằng cách kết hợp chất trị liệu đối với bệnh về xương với kháng thể kháng Siglec-15 hoặc đoạn của chúng, sự kết hợp thuốc mục tiêu như được mô tả trong M. C. Garnet "Targeted drug sự kết hợps: principles and progress", Advanced Drug Delivery Reviews, (2001) 53, 171-216 có thể được tạo ra. Để đạt được mục đích này, cái khác phân tử kháng thể, đoạn kháng thể bất kỳ có thể được áp

dụng miễn là nó không bị mất hoàn toàn khả năng nhận biết các tế bào hủy xương, và các ví dụ về chúng bao gồm các đoạn gen như Fab, F(ab')2, và Fv. Trong sáng chế, kháng thể và đoạn kháng thể có thể được sử dụng theo cùng cách. Sự kết hợp được hình thành bởi kháng thể kháng Siglec-15 hoặc đoạn kháng thể của chúng và chất trị liệu đối với các bệnh về xương có thể là bất kỳ các dạng khác nhau được mô tả trong M. C. Garnet "Targeted drug conjugates: principles and progress", Advanced Drug Delivery Reviews, (2001) 53, 171-216, G. T. Hermanson "Bioconjugate Techniques" Academic Press, California (1996), Putnam and J. Kopecek "Polyme conjugates with Anticancer Activity" Advances in Polyme Science (1995) 122, 55-123 và tương tự. Nghĩa là, sự kết hợp trong đó kháng thể kháng Siglec-15 và chất trị liệu đối với các bệnh về xương được kết hợp với nhau về mặt hóa học và trực tiếp hoặc qua đệm như oligopeptit và sự kết hợp được hình thành qua chất mang thuốc thích hợp có thể là ví dụ. Các ví dụ về chất mang thuốc bao gồm liposom và polymer tan trong nước. Các ví dụ cụ thể thêm về sự kết hợp được hình thành qua chất mang thuốc này bao gồm sự kết hợp trong đó kháng thể và chất trị liệu đối với các bệnh về xương được hợp nhất trong liposom và liposom và kháng thể được sự kết hợp với nhau, và sự kết hợp trong đó chất trị liệu đối với các bệnh về xương được kết hợp với polyme tan trong nước (hợp chất có trọng lượng phân tử từ khoảng 1000 đến 100000) về mặt hóa học và trực tiếp hoặc qua dệm như oligopeptit và kháng thể được kết hợp với polyme tan trong nước. Sự kết hợp của kháng thể (hoặc đoạn của chúng) với chất trị liệu đối với các bệnh về xương hoặc chất mang thuốc như liposom hoặc polyme tan trong nước có thể được tạo hiệu quả bằng phương pháp đã biết bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp được mô tả trong G. T. Hermanson "Bioconjugate Techniques" Academic Press, California (1996), Putnam and J. Kopecek "Polyme conjugates with Anticancer Activity" Advances in Polyme Science (1995) 122, 55-123. Sự hợp nhất của chất trị liệu đối với các bệnh về xương trong liposom có thể được làm hiệu quả bằng phương pháp đã biết bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này như

phương pháp được mô tả trong D. D. Lasic "liposoms: From Physics to Applications" Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1993) hoặc tương tự. Sự kết hợp của chất trị liệu đối với các bệnh về xương với polyme tan trong nước có thể được tạo hiệu quả bằng phương pháp đã biết bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp được mô tả trong D. Putnam và J. Kopecek "Polyme conjugates with Anticancer Activity" Advances in Polyme Science (1995) 122, 55-123. Sự kết hợp của kháng thể (hoặc đoạn của chúng) và chất trị liệu đối protein với các bệnh về xương (hoặc đoạn của chúng) có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết rõ bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này qua kỹ thuật di truyền khác phương pháp đã đề cập ở trên.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa lượng hữu hiệu trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa kháng thể kháng Siglec-15 và chất pha loãng, chất mang, chất hòa tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và/hoặc tá dược chấp nhận được về mặt dược lý.

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa lượng hữu hiệu trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa kháng thể kháng Siglec-15, lượng hữu hiệu trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa của ít nhất một chất trị liệu đối với các bệnh về xương, và chất pha loãng, chất mang, chất hòa tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và/hoặc tá dược chấp nhận được về mặt dược lý. Các ví dụ về chất trị liệu đối với các bệnh về xương bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, các bisphosphonat (ví dụ, alendronat, etidronat, ibandronat, incadronat, pamidronat, risedronat, và zoledronat), vitamin D3 hoạt tính, canxitonin và các dẫn xuất của chúng, các hormon như estradiol, SERMs (selective estrogen receptor modulators - các bộ điều biến thụ thể estrogen chọn lọc), ipriflavon, vitamin K_2 (menatetrenon), các chế phẩm canxi, PTH (hormon tuyến cận giáp), các chất kháng viêm không steroit (ví dụ, celecoxib và rofecoxib), các thụ thể TNF hòa tan (ví dụ, etanercept), các kháng thể kháng TNF-α hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này (ví dụ, infliximab), các kháng thể kháng PTHrP (protein liên quan

đến hormon tuyến cận giáp) hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các chất đối kháng thụ thể IL-1 (ví dụ, anakinra), các kháng thể kháng thụ thể IL-6 hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này (ví dụ, tocilizumab), các kháng thể kháng RANKL hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này (ví dụ, denosumab) và OCIF (nhân tố ức chế sự sản sinh tế bào hủy xương).

Chất được sử dụng trong điều chế được chấp nhận về dược phẩm theo sáng chế ưu tiên là không độc với người mà dược phẩm được cung cấp trong các khoản liều dùng và nồng độ.

Dược phẩm của sáng chế có thể chứa chất cho dược phẩm sử dụng có khả năng thay đổi hoặc duy trì pH, áp suất thẩm thấu, tính sệt, độ trong, màu sắc, tính đẳng trương, trạng thái vô trùng, độ ổn định, tính tan, tỉ lệ giải phóng, tỉ lệ hút bám, và độ thấm của chúng. Các ví dụ về chất này đối để dược phẩm sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, các axit amin như glyxin, alanin, glutamin, asparagin, arginin, và lyzin; các chất khử trùng; các chất chống oxy hóa như axit ascorbic, natri sulfat , và natri hydro sulfit; các đệm như phosphat, xitrat, các đệm borat, natri hydro carbonat, và các dung dịch Tris-HCl; các chất làm đầy như mannitol và glyxin; chất càng hóa như etylendiamin tetraaxetat (EDTA); các chất tạo phức như caffein, polyvinylpyrolidin, β-xyclodextrin, và hydroxypropyl-β-xyclodextrin; các chất giãn nở như glucoza, mannoza, và dextrin; các carbohydrat khác như các monosaccarit và disaccarit; các chất tạo màu; các chất tạo mùi; các chất pha loãng; các chất nhũ hóa; các polymer hút nước như polyvinylpyrolidin; các chất bảo quản như các polypeptit trọng lượng phân tử thấp, các ion đối hình thành muối, benzalkonium clorit, axit benzoic, axit salicylic, thimerosal, phenetyl alcohol, metylparaben, propylparaben, clorhexidin, axit sorbic, và hydro peroxit; các dung môi như glyxerin, propylen glycol, và polyetylen glycol; các cồn đường như mannitol và sorbitol; các chất tạo huyền phù; các chất hoạt động bề mặt như sorbitan este, các polysorbat bao gồm polysorbat 20 và polysorbat 80, Triton, trometamin, lexitin, và cholesteol;

các chất tăng cường độ ổn định như sucroza và sorbitol; các chất tăng cường độ dẻo như natri clorit, kali clorit, và mannitol và sorbitol; các chất vận chuyển; các tá dược; và/hoặc các tá dược dược phẩm. Lượng các chất này được bổ sung vào dược phẩm sử dụng ưu tiên từ 0,01 đến 100 lần, cụ thể ưu tiên từ 0,1 đến 10 lần trọng lượng của kháng thể kháng Siglec-15. Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định tích hợp công thức ưu tiên của dược phẩm trong chế phẩm phụ thuộc vào bệnh mà chế phẩm được áp dụng, đường cung cấp được áp dụng, hoặc tương tự.

Tá dược hoặc chất mang trong dược phẩm có thể ở dạng lỏng hoặc rắn. Tá dược hoặc chất mang thích hợp có thể là nước để tiêm, muối sinh lý, dịch não tủy được làm tương thích với người, hoặc các chất khác được sử dụng thông thường cho sự cung cấp đến bệnh nhân. Hơn nữa, muối sinh lý trung hòa chứa albumin huyết thanh có thể cũng được sử dụng là chất mang. Dược phẩm có thể chứa đệm Tris pH 7,0 đến 8,5, đệm axetat pH 4,0 đến 5,5, hoặc đệm xitrat pH 3,0 đến 6,2. Hơn nữa, đệm này có thể được bổ sung bằng sorbitol hoặc hợp chất khác. Các ví dụ về dược phẩm của sáng chế bao gồm dược phẩm chứa kháng thể kháng Siglec-15 và dược phẩm chứa kháng thể kháng Siglec-15 và ít nhất một chất trị liệu đối với các bệnh về xương. Dược phẩm của sáng chế được điều chế trong dạng sản phẩm được đông khô hoặc chất lỏng là chất dược lý có hợp chất được lựa chọn và độ tinh sạch yêu cầu. Dược phẩm chứa kháng thể kháng Siglec-15 và dược phẩm chứa kháng thể kháng Siglec-15 và ít nhất một chất trị liệu đối với sự chuyển hóa xương bất thường cũng có thể được hình thành sản phẩm được đông khô sử dụng tá dược thích hợp như sucroza.

Dược phẩm của sáng chế có thể được điều chế để cung cấp đến bệnh nhân hoặc để hút bám trong dạ dày qua đường miệng. Thành phần và nồng độ của của chế phẩm có thể được xác định phụ thuộc vào phương pháp cung cấp. Ái lực của kháng thể kháng Siglec-15 được chứa trong dược phẩm của sáng chế đối với Siglec-15 cang cao, nghĩa là, hằng số phân ly (giá trị Kd) của chúng đối với

Siglec-15 càng thấp, kháng thể kháng Siglec-15 có thể ức chế càng nhiều hiệu quả thuốc của nó thậm chí khi giảm liều dùng cho người. Do đó, liều dược phẩm của sáng chế cho người cũng có thể được xác định dựa trên sự xem xét này. Đối với liều dùng, trong trường hợp khi kháng thể người kháng Siglec-15 được cung cấp cho người, kháng thể có thể được cung cấp ở liều từ khoảng 0,1 đến 100 mg/kg một lần một ngày đến 180 ngày.

Các ví dụ về dạng liều dùng của dược phẩm của sáng chế bao gồm các thuốc tiêm bao gồm các thuốc truyền, các thuốc đạn, các chất truyền qua mũi, các chất đặt dưới lưỡi và các chất hút bám qua da.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn bằng cách tham khảo các ví dụ, tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn bởi nó. Chú ý rằng các hoạt động tương ứng đối với sự thao tác gen trong các ví dụ sau được tiến hành theo các phương pháp được mô tả trong "Molecular Cloning" (được viết bởi Sambrook, J., Fritsch, E. F. và Maniatis, T., được xuất bản bởi Cold Spring Harbor Laboratory Press năm 1989), hoặc trong trường hợp của sử dụng các chất phản ứng hoặc các kit đã được thương mại hóa, chúng được sử dụng theo các quy trình được kèm theo chúng trừ khi được quy định khác.

Ví dụ 1

Sản xuất cấu trúc biểu hiện protein hòa tan Siglec-15 của chuột nhắt

Trình tự nucleotit một phần mã hóa vùng ngoại bào của protein Siglec-15 của chuột nhắt nêu trong SEQ ID NO: 5 trong phần danh mục trình tự và trình tự axit amin của chúng nêu trong SEQ ID NO: 6 trong phần danh mục trình tự. Bằng cách sử dụng trình tự một phần này, protein hòa tan Siglec-15 của chuột nhắt có thể được tạo ra trong dịch nổi nuôi cấy của tế bào động vật hoặc tương tự.

a) Khuếch đại của gen Siglec-15 chuột nhắt hòa tan bằng PCR

Là các mồi để khuếch đại cADN vùng ngoại bào Siglec-15 chuột nhắt bằng PCR, oligonucleotit có trình tự 5'-ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccATGGAG GGGTCCCTCC AACTC-3' (mSiglec-15-ECD-F: SEQ ID NO: 7 trong phần danh mục trình tự); và oligonucleotit có trình tự 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc TCCGGGGGCG CCGTGGAAGC GGAAC-3' (mSiglec-15-ECD-R: SEQ ID NO: 8 trong phần danh mục trình tự) được tổng hợp theo quy trình thông thường. Ngẫu nhiên là, các mồi này được thiết kế là mồi khuếch đại để tạo ra dòng đơn lối vào Gateway, để trình tự attB1 được bổ sung vào mSiglec-15-ECD-F và trình tự attB2 được bổ sung vào mSiglec-15-ECD-R. PCR được tiến hành sử dụng sự kết hợp của các mồi này và polynucleotit chứa trình tự khung đọc mở của Siglec-15 chuột nhắt là khuôn theo quy trình thông thường. Các điều kiện cho chu kỳ nhiệt được đặt như sau: sau khi làm nóng ở 94°C trong 5 phút, chu kỳ nhiệt độ của "94°C trong 0,5 phút, 55°C trong 0,5 phút, và 68°C trong 1,5 phút" được lập lại 15 lần, tiếp theo làm nóng ở 68°C trong 5 phút và ủ ở 4°C.

b) Sản xuất dòng đơn lối vào bằng phản ứng BP Gateway

Dòng đơn lối vào bên trong đó cADN vùng ngoại bào Siglec-15 chuột nhắt được nhập vào bằng công nghệ Gateway (Invitrogen, Inc.) sử dụng hệ thống tái tổ hợp vị trí đặc hiệu thực khuẩn thể lam-đa được tạo ra bởi phương pháp sau. Đầu tiên, phản ứng BP sử dụng BP Clonaza được tiến hành giữa sản phẩm PCR có trình tự attB ở cả hai đầu được tạo ra trong a) và pDNOR221 (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) là vectơ cho có trình tự attP. Bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng này, *E.coli* DH10B được biến đổi, PCR khuẩn lạc được tiến hành cho các dòng kháng thuốc, và kích thước các đoạn chèn được khẳng định. Tiếp theo, đối với dòng được khẳng định có đoạn chèn kích thước đúng, sự phân tích trình tự của trình tự ADN tổng số của đoạn chèn được tiến hành. Kết quả là, dòng đơn lối vào nhận biết đầy đủ trình tự nucleotit mục tiêu (SEQ ID NO: 5 trong phần danh mục trình tự) mã hóa vùng ngoại bào của protein Siglec-15 của chuột nhắt

được thu.

c) Sự sản xuất dòng biểu hiện bằng phản ứng LR Gateway

Dòng biểu hiện bên trong đó cADN vùng ngoại bào Siglec-15 chuột nhắt được nhập vào bằng công nghệ Gateway (Invitrogen, Inc.) sử dụng hệ thống tái tổ hợp vị trí đặc hiệu thực khuẩn thể lam-đa được tạo ra bởi phương pháp sau. Dòng lối vào được sản xuất trong b) chứa đoạn chèn có trình tự attL ở cả hai đầu tận cùng. Phản ứng LR sử dụng LR Clonaza được tiến hành giữa dòng lối vào này và hai loại vectơ mục tiêu có trình tự attR. Ngẫu nhiên là, là các vectơ mục tiêu, hai loại vectơ mục tiêu: pDONM được thiết kế để mảng nhân tố quyết định kháng nguyên V5 và mảng 6 x His được bổ dung vào đầu C của đoạn chèn; và phIgFc được thiết kế để mảng Fc người được bổ sung vào đầu C của đoạn chèn được sử dụng. Bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng thu được bằng phản ứng LR, *E.coli* DH10B được biến đổi, và PCR khuẩn lạc được tiến hành đối với các dòng kháng thuốc được thu, và kích thước các đoạn chèn được khẳng định. Tiếp theo, đối với dòng được khẳng định có đoạn chèn kích thước đúng, phân tích trình tự của cả hai đầu tận cùng từ mặt đoạn chèn đến mắt vectơ được tiến hành.

Các trình tự mồi để phân tích trình tự:

5'-tgcgtgaagg tgcagggcag-3' (mSiglec-15-ECD-seq-upstm: SEQ ID NO: 9 trong phần danh mục trình tự)

và

5'-cctcgcctgg tcgggtc-3' (mSiglec-15-ECD-seq-dnstm: SEQ ID NO: 10 trong phần danh mục trình tự)

Là kết quả của sự phân tích trình tự, dòng biểu hiện (Siglec-15/pDONM chuột nhắt hòa tan và Siglec-15/phIgFc chuột nhắt hòa tan) trong đó sự tái tổ hợp đúng xảy ra đối với cả pDONM và phIgFc, lần lượt, được thu. Bằng cách truyền nhiễm Siglec-15/pDONM chuột nhắt hòa tan vào trong tế bào động vật hoặc tương tự, mARN có trình tự cơ bản nêu trong SEQ ID NO: 11 trong phần

danh mục trình tự được phiên mã và được dịch mã thành protein (Siglec-15-His của chuột nhắt) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 trong phần danh mục trình tự. Hơn nữa, bằng cách truyền nhiễm Siglec-15/phIgFc chuột nhắt hòa tan vào trong tế bào động vật hoặc tương tự, mARN có trình tự cơ bản nêu trong SEQ ID NO: 13 trong phần danh mục trình tự được phiên mã và được dịch mã thành protein (Siglec-15-Fc của chuột nhắt) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14 trong phần danh mục trình tự.

Ví dụ 2

Sản xuất quy mô lớn dung dịch nuôi cấy chứa protein hòa tan Siglec-15 của chuột nhắt sử dụng các tế bào 293-F

Hai loại vectơ biểu hện (Siglec-15/pDONM chuột nhắt hòa tan và Siglec-15/phIgFc chuột nhắt hòa tan) được thu trong Ví dụ 1 được tạo ra trong lượng khoảng 5 mg, lần lượt. Ngẫu nhiên là, trong sự tinh sạch các plasmit từ *E.coli* được nuôi cấy trên quy mô lớn, Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được sử dụng. Plasmit được tạo ra từ đó được trộn với Opti-MEM (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.), hỗn hợp tạo thành được khử trùng bằng phương pháp lọc, 10 ml chất truyền nhiễm 293fectin (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp tạo thành được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Hỗn hợp này được bổ sung vào các tế bào FreeStyle 293-F (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được nuôi cấy trong các bình Erlenmeyer để mật độ tế bào đạt 1,1 x 10^6 tế bào/ml x 5 L (1 L/bình x 5 bình) trong Môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.). Sau khi các tế bào được cho nuôi cấy với sự lắc (125 vòng/phút) ở nồng độ CO_2 8,0% trong 96 giờ (4 ngày) ở 37°C, dung dịch nuôi cấy được thu và được ly tâm để tạo dịch nổi nuôi cấy. Được coi là trong dịch nổi nuôi cấy được tạo ra từ đó, protein trong đó mảng nhân tố quyết định kháng nguyên V5 và mảng 6 x His được bổ sung vào mặt đuôi C của vùng ngoại bào Siglec-15 chuột nhắt (Siglec-15-His của chuột nhắt) và protein trong đó mảng

Fc người được bổ sung vào mặt đuôi C của vùng ngoại bào Siglec-15 chuột nhắt (Siglec-15-Fc của chuột nhắt) lần lượt được biểu hiện.

Ví dụ 3

Tinh sạch Siglec-15-His của chuột nhắt

a) Phép sắc ký cột cao áp HisTrap

2 L dung dịch nuôi cấy các tế bào 293F biểu hiện Siglec-15-His của chuột nhắt được tạo ra trong Ví dụ 2, 225 mL của 10 x đệm (500 mM Tris, 1,5 M NaCl, 200 mM imidazol, pH 8,0) được bổ sung, và hỗn hợp tạo thành được lắc đều và được lọc qua thiết bị lọc Sterivex-GV (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.). Dung dịch nuôi cấy này được cho qua ở tốc độ chảy 2 ml/phút đến cột bao gồm ba cột HisTrap HP 5 ml (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) được nối thành chuỗi và được xử lý trước bằng chất loại trừ sự tỏa nhiệt PyroCLEAN (được sản xuất bởi ALerCHEK, Inc.) và được rửa bằng nước cất để tiêm. Sau khi cột này được rửa bằng 60 ml đệm Tris-HCl 50mM (pH 8,0) chứa NaCl 300 mM ở tốc độ chảy 1 ml/phút, protein được hút bám vào cột được tách rửa bằng 50 ml đệm Tris-HCl 50mM (pH 8,0) chứa NaCl 300 mM và imidazol 500 mM ở tốc độ chảy 1 ml/phút. Sự tách rửa được phân cỡ ở 1 ml mỗi phần thành các ống mini-sorp (được sản xuất bởi Nunc, Inc.) mà 10 µl Tween 20 10% đã được bổ sung trước đó. Sau đó khoảng 20 ml dung dịch thu được bằng sự kết hợp các phần (các phần từ 14 đến 20) và chứa protein được tách rửa được cô đặc đến 2,5 ml bằng thiết bị cô đặc màng li tâm Amicon Ultra-15 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), chất cô đặc được cho qua cho cột khử muối PD-10 (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng muối đệm phosphat chứa Tween 20 0,01% (T-PBS), sau đó được tách rửa bằng T-PBS, qua đó 3,5 ml mẫu mà dung môi của nó được thay thế bằng T-PBS được thu.

b) Phép sắc ký cột nguồn Q

3,5 ml mẫu đã được tinh sạch bằng phép sắc ký cột cao áp HisTrap và dung môi của nó được thay thế bằng T-PBS, 22,5 ml đệm Tris-HCl 50mM (pH 7,5) chứa CHAPS 0,1% được bổ sung và hỗn hợp tạo thành được lắc. Tiếp theo, hỗn hợp này được ly tâm ở 4°C trong 30 phút ở 3,000 vòng/phút và kết tủa được loại. Sau đó nổi tạo thành được lọc qua thiết bị lọc Millex-GV (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), phần lọc được cho qua ở tốc độ chảy 1 ml/phút đến cột Nguồn Q 6 ml (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng đệm Tris-HCl 50mM (pH 7,5) chứa CHAPS 0,1%. Sau đó, cột được rửa bằng đệm này ở tốc độ chảy 1 ml/phút và phần protein không được hút bám vào cột được thu. Protein được hút bám vào cột được tách rửa bằng đệm Tris-HCl 50mM (pH 7,5) chứa CHAPS 0,1% và 1 M NaCl ở tốc độ chảy 1 ml/phút. Sau đó 26,5 ml phần không được hút bám vào cột được cô đặc đến 2,0 ml bằng thiết bị cô đặc màng li tâm Amicon Ultra-15 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), phần cô đặc được ly tâm ở 4°C trong 10 phút ở 3,000 vòng/phút và kết tủa được loại. Nổi sau khi li tâm được bảo quản cryo ở -80°C tới khi sử dụng. Quy trình tinh sạch đã được đề cập ở trên (Phương pháp sắc ký cột cao áp HisTrap và Phép sắc ký cột nguồn Q) được tiến hành bằng cách lập lại nó hai lần.

c) Sự dò và phân tích độ sạch của Siglec-15-His của chuột nhắt được tinh sạch

Bằng cách sử dụng mẫu được tạo ra bằng quy trình tinh sạch đã được đề cập ở trên (Phương pháp sắc ký cột cao áp HisTrap và Phép sắc ký cột nguồn Q), phương pháp điện di SDS-polyacrylamit dưới các điều kiện khử và sự nhuộm bạc được tiến hành. Nghĩa là, 5 µl mỗi mẫu của các mẫu được tinh sạch bằng các bước tinh sạch tương ứng, lượng đương lượng của dung dịch xử lý SDS được bổ sung, và hỗn hợp tạo thành được xử lý nhiệt ở 95°C trong 10 phút. 0,3 µl mỗi mẫu của các mẫu được xử lý nhiệt được sử dụng cho phương pháp điện di SDS-polyacrylamit. Là gel để điện di, gel gradient polyacrylamit 8-25% (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) được sử dụng, và sự điện di

được tiến hành sử dụng PhastSystem (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.). Hơn nữa, các chỉ trị trọng lượng phân tử, Các chỉ thị trọng lượng phân tử cầu vồng (Rainbow Molecular Weight Markers) (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) được sử dụng. Sau khi hoàn thành sự điện di, sự nhuộm bạc được tiến hành sử dụng PhastGel Silver Kit (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) và PhastSystem. Các kết quả được thể hiện trong Fig.1. Đã thể hiện rằng protein có trọng lượng phân tử khoảng 35 kDa (Siglec-15-His của chuột nhắt) được tinh sạch và được cô đặc hiệu quả trong phần protein không hút bám lên cột Nguồn Q.

Sự điện di được tiến hành dưới cùng điều kiện ngoại trừ các chỉ thị lai (Westen blotting) Westen ECL DualVue (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) được sử dụng là các chỉ thị trọng lượng phân tử, và protein trong gel được chuyển (được lai) tới màng PVDF (Hybond-P, được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) sử dụng Kit chuyển bán khô PhastTransfer (PhastTransfer Semi-dry Transfer Kit) (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) và PhastSystem. Màng PVDF này được lắc nhẹ trong 10 ml chất khóa (BlockAce, được sản xuất bởi Snow Brand Milk Products, Co., Ltd.) chứa Tween 20 0,1% ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Đối với dung dịch khóa, 10 µl S-protein HRP (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) và 10 µl của kháng thể kháng V5-HRP (Kháng thể đơn dòng đối với Pk-TAG-HRP, được sản xuất bởi Acris Antibodies) được bổ sung và màng trong dung dịch được lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng trong thêm 1 giờ. Màng PVDF được rửa 4 lần bằng cách lắc nhẹ nó trong 50 ml muối đệm phosphat (PBS) chứa Tween 20 0,01% trong 5 phút. Sau khi rửa, màng PVDF được xử lý theo quy trình kèm theo kit dò ECL (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) để tạo màu của vạch protein, và màu được tạo ra được dò sử dụng Máy quay nhỏ ECL (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) và Polaroid film (Polapan 3200B, được sản xuất bởi Polaroid, Inc.). Các kết quả được thể hiện trong Fig.2. Cũng từ các kết quả

này, có thể khẳng định rằng protein có trọng lượng phân tử khoảng 35 kDa (Siglec-15-His của chuột nhắt) và phản ứng với kháng thể kháng V5-HRP được tinh sạch và được cô đặc hiệu quả trong phần protein không hút bám lên cột Nguồn Q.

d) Xác định nồng độ protein của Siglec-15-His của chuột nhắt được tinh sạch

Đối với Siglec-15-His của chuột nhắt được tinh sạch (phần protein không hút bám lên cột Nguồn Q), nồng độ protein được đo bằng kit phân tích protein DC(được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) sử dụng abumin huyết thanh bò là mẫu chuẩn. Như được thể hiện trong Bảng 1, tổng số 1,66 mg Siglec-15-His của chuột nhắt được tinh sạch protein được thu bằng cách tiến hành quy trình tinh sạch hai lần.

Bảng 1

	Nồng độ Protein (mg/ml)	Thể tích mẫu (ml)	Protein tổng số (mg)
Lần 1	0,475	2,0	0,95
Lần 2	0,354	2,0	0,71
Tổng			1,66

Ví dụ 4

Sự tinh sạch Siglec-15-Fc của chuột nhắt

a) Phép sắc ký cột Protein A HiTrap

1,8 L dung dịch nuôi cấy của các tế bào 293 biểu hiện Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tạo ra trong Ví dụ 2 được lọc qua thiết bị lọc Sterivex-GV (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), và then phần lọc được cho qua cột Protein A HiTrap 5ml (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng Dulbecco's PBS (D-PBS, được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) ở tốc độ chảy 5 ml/phút. Sau khi cột được rửa bằng D-PBS ở tốc độ chảy 5

ml/phút, protein được hút bám vào cột được tách rửa bằng 50 ml đệm natri xitrat 0,1 M (pH 3,0) ở tốc độ chảy 5 ml/phút. Sự tách rửa được phân cỡ ở các ống mỗi phần thành mini-sorp 5 ml (được sản xuất bởi Nunc, Inc.), và ngay sau đó, 1,3 ml Tris 1 M được bổ sung vào đó để trung hòa sự tách rửa. Sau khi dung dịch thu được bằng sự kết hợp các phần (các phần 1 và 2) trong đó protein được tách rửa được dò được cô đặc đến 2,5 ml bằng thiết bị cô đặc màng li tâm Amicon Ultra-15 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), chất cô đặc được cho qua cho cột khử muối PD-10 (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng Nước muối sinh lý Otsuka (Otsuka Physiological Saline) để tiêm (TO-SS, được sản xuất bởi Otsuka Dược phẩm Co., Ltd.) chứa Tween 20 0,01%, sau đó được tách rửa bằng TO-SS, qua đó 3,5 ml mẫu mà dung môi của nó được thay thế bằng TO-SS được thu. Mẫu này được bảo quản cryo ở -80°C tới khi sử dụng. Bằng cách sử dụng 2,9 L dung dịch nuôi cấy của các tế bào 293F, cùng quy trình tinh sạch được tiến hành bằng cách lập lại nó thêm một lần nữa.

b) Sự dò và phân tích độ sạch của Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tinh sạch

Bằng cách sử dụng mẫu được tạo ra bằng quy trình tinh sạch đã được đề cập ở trên, phương pháp điện di SDS-polyacrylamit dưới các điều kiện khử và sự nhuộm bạc được tiến hành. Nghĩa là, 5 µl mỗi mẫu của các mẫu được tinh sạch bằng các bước tinh sạch tương ứng, lượng đương lượng của dung dịch xử lý SDS được bổ sung, và hỗn hợp tạo thành được làm nóng ở 95°C trong 10 phút. 0,3 µl mẫu thu được bằng cách pha loãng mỗi mẫu của các mẫu được xử lý nhiệt đối với 1/300 hoặc 1/900 với nửa nồng độ dung dịch xử lý SDS được sử dụng cho phương pháp điện di SDS-polyacrylamit. Sự điện di và sự nhuộm bạc được tiến hành theo cùng cách như phân tích độ tinh sạch của Siglec-15-His của chuột nhắt được mô tả trong c) của Ví dụ 3. Các kết quả được thể hiện trong Fig.3 cùng với các kết quả kiểm tra các điều kiện tinh sạch trước đó trên quy mô nhỏ (pH của dung dịch nuôi cấy được sử dụng là 8,9 hoặc 7,0). Đã thể hiện rằng

protein có trọng lượng phân tử khoảng 55 kDa (Siglec-15-Fc của chuột nhắt) được tinh sạch và được cô đặc hiệu quả trong phần protein được tách rửa từ Cột protein A HiTrap.

c) Sự xác định nồng độ protein của Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tinh sạch

Đối với Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tinh sạch (phần protein được tách rửa từ cột khử muối PD-10), nồng độ protein được đo bằng kit phân tích protein DC(được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) sử dụng abumin huyết thanh bò là mẫu chuẩn. Như được thể hiện trong Bảng 2, tổng số 92 mg của protein Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tinh sạch được thu bằng cách tiến hành quy trình tinh sạch hai lần.

Bảng 2

	Nồng độ Protein (mg/ml)	Thể tích mẫu (ml)	Protein tổng số (mg)
Lần 1	8,0	3,5	28
Lần 2	18,5	3,5	64
Tổng			92

Ví dụ 5

Tạo ra khối tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

a) Điều chế kháng nguyên

Protein Siglec-15-His của chuột nhắt được tạo ra trong Ví dụ 3 được điều chế ở 100 μg/0,5 ml, và lượng đương lượng của tá dược được bổ sung vào đó và sự nhũ hóa được tạo ra để sử dụng ống tiêm thủy tinh. Là tá dược, tá dược hoàn chỉnh của Freund (Freund's complete adjuvant) (FCA, Được sản xuất bởi Difco Laboratories, Inc.) được sử dụng chỉ để cho sự gây miễn dịch lần đầu, và tá dược không hoàn chỉnh của Freund (FICA, Được sản xuất bởi Difco

Laboratories, Inc.) được sử dụng cho sự gây miễn dịch lần thứ hai và sau đó.

b) Sự gây miễn dịch của chuột

Bốn con chuột (Wistar, cái, 6 tuần tuổi, được đặt mau từ CLEA Japan, Inc.) được sử dụng là các động vật gây miễn dịch. Nhũ tương được thu trong a) được tiêm dưới da và trong da sử dụng kim tiêm 27 G để lượng kháng nguyên là 50 μg mỗi con chuột. Sự gây miễn dịch được tiến hành tổng số 4 lần mỗi 7 ngày sau sự gây miễn dịch lần đầu. Lượng nhỏ (200 μl) máu được thu từ tĩnh mạch đuôi sau 7 ngày từ ngày gây miễn dịch lần thứ tư, và kháng huyết thanh được tạo ra. Để khẳng định hàm lượng kháng thể kháng huyết thanh, ELISA sử dụng protein Siglec-15-His của chuột nhắt that được sử dụng là kháng nguyên, protein Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tạo ra trong Ví dụ 4, hoặc abumin huyết thanh bò (BSA), mỗi chất của chúng được cố định, được tiến hành. Kết quả là, Sự phản ứng với protein Siglec-15-His của chuột nhắt và Siglec-15-Fc của chuột nhắt được quan sát thấy trong cả bốn con chuột (chuột các số từ 1 đến 4). Mặt khác, sự phản ứng với BSA không quan sát thấy. Từ các kết quả này, dã khẳng định rằng hàm lượng kháng thể trong huyết thanh của mỗi con của các con chuột được gây miến dịch được tăng lên, và do đó, con chuột số 2 chỉ ra chuẩn độ kháng thể cao nhất được cho tiến hành quy trình dung hợp tế bào.

c) Sự dung hợp tế bào

Sự dung hợp tế bào được tiến hành theo phương pháp thông thường sự dung hợp các tế bào lá lách chuột nhắt (chuột) với các tế bào u tủy. Toàn bộ máu được thu từ tim chuột dưới điều kiện hoặc gây mê và chuột được cho chết nhẹ nhàng, và lá lách được cắt. Các tế bào lá lách và các tế bào P3X63Ag8,653 được thu (ATCC CRL 1580) là các tế bào u tủy chuột nhắt được cho dung hợp tế bào sử dụng polyetylen glycol (PEG). Các tế bào tạo thành được nhân lên trong đĩa 96 giếng, và môi trường chứa hypoxanthin (H), aminopterin (A) và tymidin (T) (môi trường chọn lọc HAT) được bổ sung vào đó, và tiếp theo, các tế bào được nuôi cấy trong 7 đến 10 ngày. Dịch nổi nuôi cấy được thu từ 61 giếng trong đó

sự sống của khối tế bào lai thu được bằng sự dung hợp tế bào được xác định. Tiếp theo, hàm lượng kháng thể được đánh giá bằng ELISA sử dụng protein Siglec-15-His của chuột nhắt đã được sử dụng là kháng nguyên, protein Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tạo ra trong Ví dụ 4, hoặc BSA, mỗi protein của chúng được cố định, và khối tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt được sàng lọc. Từ kết quả sàng lọc, 12 giếng thể hiện chuẩn độ kháng thể cao được lựa chọn và các khối tế bào lai được chứa trong các giếng này được cho tiến hành tách dòng.

d) Tách dòng khối tế bào lai

Đối với khối tế bào lai được chọn, bước tách dòng đầu tiên được tiến hành bằng phương pháp pha loãng giới hạn. sau sự pha loãng giới hạn, các khối tế bào lai được nuôi cấy trong 2 tuần, và hàm lượng kháng thể trong dịch nổi nuôi cấy được xác định bằng ELISA sử dụng protein Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tạo ra trong Ví dụ 4 hoặc BSA, mỗi protein của chúng được bất động. Đối với 11 dòng được khẳng định là các dòng dương tính, bước tách dòng thứ hai được tiến hành (theo cùng cách như bước tách dòng đầu tiên), qua đó 10 dòng của khối tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt (#1A1, #3A1, #8A1, #24A1, #32A1, #34A1, #39A1, #40A1, #41B1, #61A1) được tạo ra cuối cùng. Ngẫu nhiên là, tế bào lai #32A1 được lưu giữ tại International Patent Organism Depositary of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (được đặt tại Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan) vào ngày 28/8/ 2008, và được đặt số đăng ký FERM BP-10999 dưới tên của Khối tế bào lai #32A1 kháng Siglec-15.

Ví dụ 6

Sự điều chế kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

a) Sự điều chế các cổ trướng của chuột nhắt chụi lông

Các khối tế bào lai được tạo ra trong Ví dụ 5 được nuôi cấy sử dụng môi

trường TIL Media I (được sản xuất bởi Immuno-biological Laboratories Co., Ltd.) chứa FCS 10%. Nuôi cấy phụ của các tế bào được tiến hành bằng cách tiến hành quy trình trong đó dung dịch nuôi cấy được pha loãng đến khoảng môt phần tư môi hai đến ba ngày bằng cách sử dụng điểm thời gian khi các tế bào được sinh trưởng đến khoảng 5 x 10^5 tế bào/ml là chỉ số. Mỗi của khối tế bào lai được nuôi cấy được cấy chuyển vào trong màng bụng trong chuột nhắt chụi lông mà pristan được cung cấp trong màng bụng (0,2 ml/chuột nhắt) trước đó ở 1 x 10^7 tế bào mỗi chuột nhắt. Trong sự cấy chuyển, ba con chuột nhắt chụi lông được sử dụng cho mỗi dòng của 10 dòng của khối tế bào lai. Sau khi cấy chuyển, các cổ trướng được thu khi sự tích lũy đủ các cổ trướng được quan sát thấy, được kết hợp với các cái được thu thập từ hai con chuột nhắt khác được cấy chuyển cùng khối tế bào lai, lượng cổ trướng được kết hợp được tính, và các cổ trướng được bảo quản cryo tới khi tinh sạch kháng thể. Các lượng cổ trướng được thu đối với khối tế bào lai tương ứng được tính tổng trong Bảng 3.

Bảng 3

Khối tế bào lai	Lượng cổ trướng được thu (ml)	Khối tế bào lai	Lượng cổ trướng được thu (ml)
#1A1	12,5	#34A1	8,2
#3A1	8,0	#39A1	14,5
#8A1	6,0	#40A1	20,3
#24A1	7,8	#41B1	10,5
#32A1	5,5	#61A1	12,3

b) Sự tinh sạch kháng thể

Lượng tổng số các cổ trướng được thu được cho tiến hành sự tinh sạch IgG sử dụng 20 ml cột Protein G (được sản xuất bởi GE Healthcare, Co., Ltd.). IgG được tinh sạch được phân tích độ tinh sạch bằng phân tích lọc gel (phương pháp sắc ký cột Superdex 200), và một số của các kháng thể được cho cô đặc màng li

tâm. Nghĩa là, trong số các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt được tinh sạch, 9 loại kháng thể trừ kháng thể #24A1 được cô đặc đến khoảng một phần sáu đến một phần tám thể tích gốc bằng cách ly tâm các kháng thể ở 3,000 vòng/phút trong từ 30 đến 60 phút ở 4°C sử dụng máy cô đặc màng li tâm Amicon Ultra-15 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.). Tiếp theo, đối với kháng thể #24A1 và chín loại được cô đặc khác của các kháng thể, nồng độ protein được đo bằng kit phân tích protein DC(được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) sử dụng abumin huyết thanh bò (BSA) là mẫu chuẩn. Bằng quy trình đã đề cập ở trên, kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt được tạo ra.

Ví dụ 7

Đánh giá tính chất của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột liên kết với protein Siglec-15 của chuột nhắt

Tính chất của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột liên kết với protein Siglec-15 của chuột nhắt được đánh giá bằng phương pháp ELISA. Protein Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tạo ra trong Ví dụ 4 được pha loãng đến 5 μg/ml bằng đệm natri carbonat 0,1M (pH 9,5), và dung dịch tạo thành được bổ sung vào đĩa 96 giếng (được sản xuất bởi Nalge Nunc International, Inc., Cat. No. 430341) ở 100 μl/giếng. Sau khi đĩa cấy được đặt ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, dung dịch được loại và đệm rửa (muối đệm phosphat chứa Tween 20 0,05%) được bổ sung ở 300 μl/giếng và sau đó được loại. Sau quy trình rửa này được tiến hành thêm một lần nữa, muối đệm phosphat chứa BlockAce 25% (được sản xuất bởi Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) được bổ sung ở 200 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, qua đó sự khóa được tiến hành. Chất lỏng được loại, và đĩa cấy được rửa hai lần bằng 300 μl/giếng của đệm rửa. Tiếp theo, mỗi của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 hoặc đối chứng IgG của chuột (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được pha loãng đến nồng

độ cuối từ 1,28 đến 20,000 ng/ml (các loạt pha loãng 5 lần) bằng đệm ELISA (muối đệm phosphat chứa BlockAce 12,5% và Tween 20 0,05%), và dung dịch kháng thể được pha loãng tạo thành được bổ sung vào đĩa cấy ở 100 µl/giếng. Sau khi đĩa cấy được đặt ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, chất lỏng được loại, và đĩa cấy được rửa 3 lần bằng 300 µl/giếng của đệm rửa. Tiếp theo, kháng thể IgG kháng chuột của dê được đánh dấu HRP (horseradish peroxidaza) (được sản xuất bởi Beckman Coulter, Inc.) được pha loãng đến 1,000 lần bằng đệm ELISA được bổ sung ở 100 µl/giếng, và đĩa cấy được đặt ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Chất lỏng được loại và đĩa cấy được rửa 3 lần bằng 300 µl/giếng của đệm rửa, và Tiếp theo, bằng cách sử dụng kit tạo màu đối với peroxidaza (được sản xuất bởi Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), màu được tạo ra theo quy trình kèm theo kit này. Sau khi hình thành màu, sự hấp thu ở 492 nm được đo sử dụng đầu đọc vi đĩa (được sản xuất bởi Nihon Molecular Devices Corporation). Kết quả là, được xác định tất cả 10 mẫu kiểm tra của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột liên kết với protein Siglec-15 của chuột nhắt trong cách thức phụ thuộc nồng độ kháng thể (Fig.4). Mặt khác, trong trường hợp của đối chứng IgG của chuột, liên kết với protein Siglec-15 của chuột nhắt không được quan sát thấy.

Ví dụ 8

Điều chế các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt

Xương đùi và xương chày được cắt từ chuột nhắt ddY cái ở độ tuổi từ 5 đến 8 tuần và các mô mền được loại. cả hai đầu của xương đùi và xương chày được cắt bỏ, và D-PBS được tiêm sử dụng ống tiêm với mũi tiêm cỡ 25 đâm qua các tế bào tủy xương, được thu trong ống li tâm. Sự li tâm được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 5 phút ở 100 g, và dịch nổi được loại. Đối với cục tế bào thu được, 1 ml đệm hemolytic (Đệm dung giải tế bào máu đỏ (Red Blood Cell Lysing Buffer), được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.) được bổ sung để làm huyền phù nó, và nổi tạo thành được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. 20 ml D-PBS được bổ

sung vào đó, và dịch nổi được ly tâm ở nhiệt độ phòng trong 5 phút ở 100 g, và nổi được loại. Đối với cục tế bào thu được, 10 ml môi trường MEM-α (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) chứa 5 ng/ml M-CSF (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) và huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS) được bổ sung để làm huyền phù nó. Tiếp theo, nổi tạo thành được cho qua dụng cụ lọc tế bào (40 μm Nylon, được sản xuất bởi BD Falcon) để loại các kết tụ. Các tế bào thu được này được chuyển đến bình T 75 cm^2 (đối với sự gắn của các tế bào bám chặt) và được nuôi cấy qua đêm trong buồng ủ CO_2. Sau khi nuôi cấy qua đêm, các tế bào không bám vào bình T được thu lại và được sử dụng là các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt.

Ví dụ 9

Đánh giá hoạt tính sinh học của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột dựa trên sự kiểm tra đối với sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt

Bằng cách sử dụng cả 10 mẫu kiểm tra các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6, hiệu quả trên sự phân hóa tế bào hủy xương của các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt được kiểm tra. Các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt được tạo ra bằng phương pháp Ví dụ 8 được điều chế ở 1,5 x 10^5 tế bào/ml trong môi trường α-MEM chứa FBS 10% và 10 ng/ml M-CSF (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.), và chế phẩm tế bào tạo thành được nhân lên trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng trong lượng 200 μl và các tế bào được nuôi cấy trong 2 ngày trong buồng ủ CO_2. Dung dịch nuôi cấy cũ trong đĩa 96 giếng được loại, và 100 μl môi trường MEM-α được bổ sung vào mỗi giếng, 100 μl môi trường MEM-α chứa FBS 10% mà RANKL (RANKL, được sản xuất bởi Peprotech, Inc.) và M-CSF của người được bổ sung lần lượt để thu nồng độ cuối 20 ng/ml và 10 ng/ml. Đối với dung dịch nuôi cấy tế bào, mỗi của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6, mẫu thu được bằng cách loại

natri azit đối chứng IgG của chuột được thương mại hóa(IgG chuột được tinh sạch, được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.), hoặc kháng thể đa dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của thỏ được tạo ra riêng rẽ (Số 3) được bổ sung ở nồng độ từ 32 đến 1,000 ng/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong thêm 3 ngày trong buồng ủ CO_2. Ngẫu nhiên là, kháng thể đa dòng (Số 3) là kháng thể đã được khẳng định chắc chắn ức chế sự hình thành tế bào hủy xương trong hệ thống thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ này. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, hoạt tính của phosphataza axit kháng tartrat (tartrate-resistant acid phosphatase) (TRAP) của các tế bào hủy xương được hình thành được đo bằng quy trình được mô tả bên dưới. Dung dịch nuôi cấy trong mỗi giếng của đĩa cấy 96 giếng được loại bằng sự hút bám, và 50 µl của đệm natri xitrat 50 mM (pH 6,1) chứa Triton 1% X-100 được bổ sung vào mỗi giếng. Tiếp theo, đĩa cấy được lắc trong 5 phút trên máy lắc đĩa để dung giải các tế bào. Đối với mỗi giếng, 50 µl dung dịch chất nền (đệm natri xitrat 50 mM (pH 6,1) chứa 5 mg/ml p-nitrophenyl phosphat và natri tartrat 0,46%) được bổ sung, và đĩa cấy được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau sự ủ, 50 µl của dung dịch natri hydroxit 1 N được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng để ngừng phản ứng enzym. Sau khi ngừng phản ứng enzym, sự hút bám của mỗi giếng ở 405 nm được xác định, và sự xác định thu được này được sử dụng là chỉ số của hoạt tính TRAP. Các kết quả được thể hiện trong các Fig.5 và 6. Sự ức chế đáng kể của hoạt tính TRAP không được quan sát thấy trong trường hợp của đối chứng IgG của chuột được thương mại hóa. Mặt khác, sự ức chế đáng kể của hoạt tính TRAP được quan sát thấy trong các trường hợp của kháng thể #32A1 được bổ sung ở ngưỡng từ 32 ng/ml đến 1000 ng/ml, và kháng thể #8A1 và kháng thể số 3 đa dòng của thỏ được tinh sạch ái lực được bổ sung ở ngưỡng từ 63 ng/ml đến 1000 ng/ml. Cũng trong trường hợp của kháng thể #3A1, kháng thể #34A1, và kháng thể #39A1, sự ức chế phụ thuộc liều của hoạt tính TRAP được quan sát ở nồng độ cao tương đối của 500 ng/ml hoặc cao hơn. Sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt bằng các kháng thể khác không được quan sát thấy. Từ kết quả trên, các kháng thể ức chế mạnh

sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt (sự phân hóa và sự trưởng thành tế bào hủy xương) được phát hiện trong các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt của chuột đã được tạo ra. Hơn nữa, là đặc tính thông thường đối với kháng thể #3A1, kháng thể #8A1, kháng thể #32A1, kháng thể #34A1, và kháng thể #39A1, hoạt tính ức chế sự hình thành tế bào hủy xương ở nồng độ 1000 ng/ml, nghĩa là, 1 μg/ml hoặc thấp hơn có thể là ví dụ.

Ví dụ 10

Sản xuất cấu trúc biểu hiện protein Siglec-15 của người hòa tan

Trình tự nucleotit một phần mã hóa vùng ngoại bào của Protein Siglec-15 của người nêu trong SEQ ID NO: 15 trong phần danh mục trình tự và trình tự axit amin của nó nêu trong SEQ ID NO: 16 trong phần danh mục trình tự. Bằng cách sử dụng trình tự một phần này, protein Siglec-15 hòa tan của người có thể được tạo ra trong nổi nuôi cấy của tế bào động vật hoặc tương tự.

a) Khuếch đại của gen Siglec-15 hòa tan của người bằng PCR

Là các mồi để khuếch đại cADN vùng ngoại bào Siglec-15 của người bằng PCR, oligonucleotit có trình tự 5'-ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccATGGAA AAGTCCATCT GGCTGC-3' (hSiglec-15-ECD-F: SEQ ID NO: 17 trong phần danh mục trình tự); và oligonucleotit có trình tự 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc CCCGCTGGCG CCATGGAAGC GG-3' (hSiglec-15-ECD-R: SEQ ID NO: 18 trong phần danh mục trình tự) được tổng hợp theo quy trình thông thường. Ngẫu nhiên là, các mồi này được thiết kế, là mồi khuếch đại để tạo ra dòng đơn lối vào Gateway, để tình tự attB1 được bổ sung vào hSiglec-15-ECD-F và trình tự attB2 được bổ sung vào hSiglec-15-ECD-R. PCR được tiến hành sử dụng sự kết hợp của các mồi này và polynucleotit chứa trình tự đọc mở của Siglec-15 của người là khuôn theo quy trình thông thường. Dung dịch phản ứng PCR được tinh sạch sử dụng Kit tinh sạch PCR PureLink (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.).

b) Sản xuất dòng đơn lối vào bằng phản ứng BP Gateway

Dòng đơn lối vào bên trong đó cADN vùng ngoại bào Siglec-15 của người được nhập vào bằng công nghệ Gateway (Invitrogen, Inc.) sử dụng hệ thống tái tổ hợp vị trí đặc hiệu thực khuẩn thể lam-đa được tạo ra bởi phương pháp sau. Đầu tiên, phản ứng BP sử dụng BP Clonaza được tiến hành giữa sản phẩm PCR có trình tự attB ở cả hai đầu được tạo ra trong a) và pDNOR221 (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) là vectơ cho có trình tự attP. Bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng này, *E.coli* TOP10 được biến đổi, PCR khuẩn lạc được tiến hành cho các dòng kháng thuốc, và kích thước các đoạn chèn được khẳng định. Tiếp theo, đối với dòng được khẳng định có đoạn chèn kích thước đúng, sự phân tích trình tự của trình tự ADN tổng số của đoạn chèn được tiến hành. Kết quả là, dòng đơn lối vào nhận biết đầy đủ trình tự nucleotit mục tiêu (SEQ ID NO: 15 trong phần danh mục trình tự) mã hóa vùng ngoại bào của protein Siglec-15 của người được thu.

c) Sản xuất dòng biểu hiện bằng phản ứng LR Gateway

Dòng biểu hiện bên trong đó cADN vùng ngoại bào Siglec-15 của người được nhập vào bằng công nghệ Gateway (Invitrogen, Inc.) sử dụng hệ thống tái tổ hợp vị trí đặc hiệu thực khuẩn thể lam-đa được tạo ra bởi phương pháp sau. Dòng lối vào được sản xuất trong b) chứa đoạn chèn có trình tự attL ở cả hai đầu tận cùng. Phản ứng LR sử dụng LR Clonaza được tiến hành giữa dòng lối vào này và hai loại vectơ mục tiêu có trình tự attR. Ngẫu nhiên là, là các vectơ mục tiêu, hai loại vectơ mục tiêu: pDONM được thiết kế để mảng nhân tố quyết định kháng nguyên V5 và mảng 6 x His được bổ dung vào đầu C của đoạn chèn; và phIgFc được thiết kế để mảng Fc người được bổ sung vào đầu C của đoạn chèn, được sử dụng. Bằng cách sử dụng dung dịch phản ứng thu được bằng phản ứng LR, *E.coli* TOP10 được biến đổi, và phân tích trình tự được tiến hành đối với các dòng kháng thuốc thu được để khẳng định có hay không sự tái tổ hợp đúng xảy ra.

Là kết quả của sự phân tích trình tự, dòng biểu hiện (Siglec-15/pDONM của người hòa tan và Siglec-15/phIgFc của người hòa tan) trong đó sự tái tổ hợp đúng xảy ra lần lượt đối với cả pDONM và phIgFc được thu. Bằng cách truyền nhiễm Siglec-15/pDONM của người hòa tan vào trong tế bào động vật hoặc tương tự, mARN có trình tự cơ bản nêu trong SEQ ID NO: 19 trong phần danh mục trình tự được phiên mã và được dịch mã thành protein (Siglec-15-His của người) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20 trong phần danh mục trình tự. Hơn nữa, bằng cách truyền nhiễm Siglec-15/phIgFc của người hòa tan vào trong tế bào động vật hoặc tương tự, mARN có trình tự cơ bản nêu trong SEQ ID NO: 21 trong phần danh mục trình tự được phiên mã và được dịch mã thành protein (Siglec-15-Fc của người) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22 trong phần danh mục trình tự.

Ví dụ 11

Sản xuất quy mô lớn dung dịch nuôi cấy chứa protein Siglec-15 hòa tan của người sử dụng các tế bào 293-F

a) Điều chế dung dịch nuôi cấy chứa Siglec-15-His của người

Siglec-15/pDONM của người hòa tan được thu trong Ví dụ 10 được tạo ra trong lượng khoảng 25 mg. Ngẫu nhiên là, trong sự tinh sạch các plasmit từ *E.coli* được nuôi cấy trên quy mô lớn, Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được sử dụng. Plasmit được tạo ra từ đó được trộn với Opti-MEM (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.), 50 ml chất truyền nhiễm 293fectin (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp tạo thành được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Hỗn hợp này được bổ sung vào FreeStyle các tế bào 293-F (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được nuôi cấy trong môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) chứa penicillin-streptomyxin 1% để mật độ tế bào đạt từ 1,0 đến 3,4 x 10^6 tế bào/ml sử dụng thiết bị nuôi cấy quy trình sinh học 25 L (WAVE Bioreactor). Sau khi các tế bào được cho nuôi cấy với sự lắc(30 vòng/phút) ở

nồng độ CO_2 từ 6 đến 12% trong 96 giờ (4 ngày) ở 37°C, dung dịch nuôi cấy được thu và được ly tâm để tạo dịch nổi nuôi cấy. Được quan sát thấy trong dịch nổi nuôi cấy được tạo ra từ đó, protein trong đó mảng nhân tố quyết định kháng nguyên V5 và mảng 6 x His được bổ sung vào mặt đuôi C của vùng ngoại bào Siglec-15 của người (Siglec-15-His của người) được biểu hiện.

b) Sự điều chế dung dịch nuôi cấy chứa Siglec-15-Fc của người

Siglec-15/phIgFc của người hòa tan được thu trong Ví dụ 10 được tạo ra trong lượng khoảng 5 mg. Ngẫu nhiên là, trong sự tinh sạch các plasmit từ *E.coli* được nuôi cấy trên quy mô lớn, Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Gigaprep Kit (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được sử dụng. Plasmit được tạo ra từ đó được trộn với Opti-MEM (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.), sau đó được lọc tiệt trùng. Tiếp theo, 10 ml chất truyền nhiễm 293fectin (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được bổ sung vào đó, và hỗn hợp tạo thành được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Hỗn hợp này được bổ sung vào các tế bào 293-F FreeStyle (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) được nuôi cấy trong các bình Erlenmeyer để mật độ tế bào đạt từ 1,0 đến 3,0 x 10^6 tế bào/ml x 5 L (1 L/bình x 5 bình) trong môi trường biểu hiện FreeStyle 293 (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.). Sau khi các tế bào được cho nuôi cấy với sự lắc(125 vòng/phút) ở nồng độ CO_2 8,0% trong 96 giờ (4 ngày) ở 37°C, dung dịch nuôi cấy được thu và được ly tâm để tạo dịch nổi nuôi cấy. Được quan sát thấy trong dịch nổi nuôi cấy được tạo ra từ đó, protein trong đó mảng Fc người được bổ sung vào mặt đuôi C của vùng ngoại bào Siglec-15 của người (Siglec-15-Fc của người) được biểu hiện.

Ví dụ 12

Sự tinh sạch protein Siglec-15 của người hòa tan

a) Sự tinh sạch Siglec-15-His của người hòa tan

a-i) Phép sắc ký cột cao áp HisTrap

2 L dung dịch nuôi cấy của các tế bào 293F biểu hiện Siglec-15-His của

người được tạo ra trong a) của Ví dụ 11, 1350 ml 10 x đệm (500 mM Tris, 1,5 M NaCl, 200 mM imidazol, pH 8,0) được bổ sung, và hỗn hợp tạo thành được lắc đều và được lọc qua thiết bị lọc MilliPak-60 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.). Dung dịch nuôi cấy này được cho qua ở tốc độ chảy 10 ml/phút qua cột cao áp Ni-Sepharoza (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) 100 ml đã được rửa trước bằng nước tinh khiết (nước Milli-Q). Sau khi cột này được rửa bằng 400 ml đệm Tris-HCl 50mM (pH 8,0) chứa NaCl 300 mM ở tốc độ chảy 8 ml/phút, protein được hút bám vào cột được tách rửa bằng 200 ml đệm Tris-HCl 50mM (pH 8,0) chứa NaCl 300 mM và imidazol 500 mM ở tốc độ chảy 2,5 ml/phút, và sự tách rửa được phân cỡ thành các ống mini-sorp (được sản xuất bởi Nunc, Inc.). Để ngăn sự kết tủa của protein, 8 ml dung dịch NaCl 5 M được bổ sung vào khoảng 40 ml đoạn gen chứa protein được tách rửa, tiếp theo được khuấy, và sau đó hỗn hợp tạo thành được cô đặc đến khoảng 20 ml bằng thiết bị cô đặc màng li tâm Amicon Ultra-15 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.). Phần không hòa tan được tạo ra trong quá trình cô đặc được loại bằng sự li tâm ở 3000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, và 2,5 ml dịch nổi tạo thành được cho qua cột khử muối PD-10 (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng muối đệm phosphat chứa 1 M NaCl (N-PBS), sau đó được tách rửa bằng N-PBS, qua đó 3,5 ml mẫu mà dung môi của nó được thay thế bằng N-PBS được thu. Quy trình này được tiến hành bằng cách lặp lại nó thêm 7 lần, và khoảng 28 ml dung dịch Siglec-15-His của người được tinh sạch một phần được thu.

a-ii) Phép sắc ký cột nguồn Q

12 ml mẫu đã được tinh sạch bằng sắc ký cột cao áp Ni-Sepharoza và dung môi của nó được thay thế bằng N-PBS được thẩm tách qua đêm ở 4°C chống lại đệm Tris-HCl 50mM (pH 7,5) chứa CHAPS 0,1% (1 L, 3 lần) và chất thẩm tách tạo thành được ly tâm ở 3,000 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C, và kết tủa được loại. Sau đó nổi tạo thành được lọc qua thiết bị lọc Millex-GV (được sản xuất

bởi Millipore Co., Ltd.), phần lọc được cho qua ở tốc độ chảy 1 ml/phút đến cột Nguồn Q 6 ml (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng đệm Tris-HCl 50mM (pH 7,5) chứa CHAPS 0,1%. Sau đó, cột được rửa bằng đệm này ở tốc độ chảy 1 ml/phút và phần protein không được hút bám vào cột được thu. Protein được hút bám vào cột được tách rửa bằng đệm Tris-HCl 50mM (pH 7,5) chứa CHAPS 0,1% và NaCl 1 M ở tốc độ chảy 1 ml/phút. Sau đó 26,5 ml phần không được hút bám vào cột được cô đặc đến 3,0 ml bằng thiết bị cô đặc màng li tâm Amicon Ultra-15 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), phần cô đặc được ly tâm ở 3,000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và kết tủa được loại. 2,5 ml dịch nổi tạo thành được cho qua cột khử muối PD-10 (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng muối đệm phosphat chứa 50 mM arginin hydroclorit (pH 7,0, A-PBS), sau đó được tách rửa bằng A-PBS, qua đó 3,5 ml mẫu mà dung môi của nó được thay thế bằng A-PBS được thu. Arginin hydroclorit trong dung môi của mẫu được điều chế được bổ sung để ngăn Siglec-15-His của người hòa tan khỏi kết tủa. Nổi sau khi li tâm được bảo quản cryo ở -80°C tới khi sử dụng. Quy trình tinh sạch đã được đề cập ở trên (Phép sắc ký cột nguồn Q) được tiến hành bằng cách lập lại nó hai lần.

a-iii) Sự dò và phân tích độ sạch của Siglec-15-His của người được tinh sạch

Bằng cách sử dụng mẫu được tạo ra bằng quy trình tinh sạch đã được đề cập ở trên (Phép sắc ký cột cao áp Ni-Sepharoza và Phép sắc ký cột nguồn Q), phương pháp điện di SDS-polyacrylamit dưới các điều kiện khử và sự nhuộm bạc được tiến hành. Nghĩa là, 5 µl của mỗi mẫu của các mẫu được tinh sạch bằng các bước tinh sạch tương ứng, lượng đương lượng của dung dịch xử lý SDS được bổ sung, và hỗn hợp tạo thành được xử lý nhiệt ở 95°C trong 10 phút. 0,3 µl mỗi mẫu của các mẫu được xử lý nhiệt được sử dụng cho phương pháp điện di SDS-polyacrylamit. Quy trình điện di được tiến hành theo cùng cách như trong Ví dụ 3 ngoại trừ các chỉ thị trọng lượng phân tử cầu vồng (Rainbow

Molecular Weight Markers) (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) được sử dụng là các chỉ thị trọng lượng phân tử. Sau khi hoàn thành sự điện di, sự nhuộm bạc được tiến hành sử dụng PhastGel Silver Kit (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) và PhastSystem. Các kết quả được thể hiện trong Fig.7. Đã thể hiện rằng protein có trọng lượng phân tử khoảng 35 kDa (Siglec-15-His của người) được tinh sạch và được cô đặc hiệu quả trong phần protein không hút bám lên cột Nguồn Q.

a-iv) Sự xác định nồng độ protein của Siglec-15-His của người được tinh sạch

Đối với Siglec-15-His của người được tinh sạch (phần protein không hút bám lên cột Nguồn Q), nồng độ protein được đo bằng kit phân tích protein DC(được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) sử dụng abumin huyết thanh bò là mẫu chuẩn. Bằng cách tiến hành quy trình tinh sạch hai lần, tổng số 1,66 mg Siglec-15-His của người được tinh sạch được thu.

b) Sự tinh sạch Siglec-15-Fc của người hòa tan

b-i) Phép sắc ký cột Protein A HiTrap

1,5 L dung dịch nuôi cấy của các tế bào 293F biểu hiện Siglec-15-Fc của người được tạo ra trong b) của Ví dụ 11 được lọc qua thiết bị lọc Sterivex-GV (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd.), và sau đó phần lọc được cho qua ở tốc độ chảy 5 ml/phút đến cột Protein A HiTrap 5ml (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng Dulbecco's PBS (D-PBS, được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.). Sau khi cột lọc được rửa bằng 70 ml D-PBS ở tốc độ chảy 5 ml/phút, protein được hút bám vào cột được tách rửa bằng 24 ml đệm natri xitrat 0,1 M (pH 3,0) ở tốc độ chảy 1,2 ml/phút. Sự tách rửa được phân cỡ ở 1,2 ml mỗi phần thành các ống mini-sorp (được sản xuất bởi Nunc, Inc.), và ngay sau đó, 0,31 ml Tris 1 M được bổ sung vào đó để trung hòa sự tách rửa. 2,5 ml phần chia của dung dịch (khoảng 7,5 ml) thu được bằng sự kết hợp các phần protein được tách rửa (các phần từ 5 đến 9) được cho qua cột khử

muối PD-10 (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng muối đệm phosphat chứa 50 mM arginin hydroclorit (pH 7,0, A-PBS), sau đó được tách rửa bằng A-PBS, qua đó 3,5 ml mẫu mà dung môi của nó được thay thế bằng A-PBS được thu. Quy trình này được tiến hành bằng cách lập lại nó hai lần. Arginin hydroclorit trong dung môi được bổ sung để ngăn Siglec-15-Fc của người hòa tan khỏi sự kết tủa. 2,5 ml dung dịch duy trì của các phần protein được tách rửa (các phần từ 5 đến 9) được cho qua cột khử muối PD-10 (được sản xuất bởi Amersham Biosciences, Inc.) đã được làm cân bằng trước bằng muối đệm phosphat chứa NaCl 1 M (pH 6,7, N-PBS), sau đó được tách rửa bằng N-PBS, qua đó 3,5 ml mẫu mà dung môi của nó được thay thế bằng N-PBS được thu. NaCl trong dung môi trong mẫu được tạo ra được bổ sung để ngăn Siglec-15-Fc của người hòa tan khỏi sự kết tủa mà không cần bổ sung hợp chất chứa nhóm amin như arginin. Các mẫu được tạo ra bằng quy trình đã đề cập ở trên được bảo quản cryo ở -80°C tới khi sử dụng.

b-ii) Sự dò và phân tích độ sạch của Siglec-15-Fc của người được tinh sạch

Bằng cách sử dụng các mẫu được tạo ra bằng quy trình tinh sạch đã được đề cập ở trên, phương pháp điện di SDS-polyacrylamit dưới các điều kiện khử và sự nhuộm bạc được tiến hành. Nghĩa là, 5 µl của mỗi mẫu của các mẫu được tinh sạch bằng các bước tinh sạch tương ứng, lượng đương lượng của dung dịch xử lý SDS được bổ sung, và hỗn hợp tạo thành được làm nóng ở 95°C trong 10 phút. 0,3 µl mẫu thu được bằng cách pha loãng mỗi mẫu của các mẫu được xử lý nhiệt to 1/100 hoặc 1/300 với nửa nồng độ dung dịch xử lý SDS được sử dụng cho phương pháp điện di SDS-polyacrylamit. Sự điện di và sự nhuộm bạc được tiến hành theo cùng cách như phân tích độ tinh sạch của Siglec-15-His của người được mô tả trong a-iii). Các kết quả được thể hiện trong Fig.8. Đã thể hiện rằng protein có trọng lượng phân tử khoảng 55 kDa (Siglec-15-Fc của người) được tinh sạch và được cô đặc hiệu quả trong phần protein được tách rửa từ Cột protein A HiTrap.

b-iii) Sự xác định nồng độ protein của Siglec-15-Fc của người được tinh sạch

Đối với Siglec-15-Fc của người được tinh sạch (phần protein được tách rửa từ cột khử muối PD-10), nồng độ protein được đo bằng kit phân tích protein DC (được sản xuất bởi Bio-Rad Laboratories, Inc.) dùng abumin huyết thanh bò là mẫu chuẩn. Như được thể hiện trong Bảng 4, tổng số 25,2 mg Siglec-15-Fc của người được tinh sạch được thu bằng cách tiến hành quy trình tinh sạch hai lần.

Bảng 4

	Nồng độ Protein (mg/ml)	Thể tích mẫu (ml)	Protein tổng số (mg)
Dung môi chứa Arg	2,3	7,0	16,1
Dung môi chứa NaCl	2,6	3,5	9,1
Tổng			25,2

Ví dụ 13

Đánh giá tính chất của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột liên kết với Protein Siglec-15 của người

Tính chất của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột liên kết với Protein Siglec-15 của người được đánh giá bằng phương pháp ELISA. Protein Siglec-15-Fc của người (được cho thay thế bằng A-PBS) được tạo ra trong b) của Ví dụ 12 được pha loãng đến 5 μg/ml bằng đệm natri carbonat 0,1M (pH 9,5), và dung dịch tạo thành được bổ sung vào đĩa 96 giếng (được sản xuất bởi Nalge Nunc International, Inc., Cat. No. 430341)ở 100 μl/giếng. Sau khi đĩa cấy được đặt ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, dung dịch được loại và đệm rửa (muối đệm phosphat chứa Tween 20 0,05%) được bổ sung ở 300 μl/giếng và sau đó được loại. Sau quy trình rửa này được tiến hành thêm một lần nữa, muối đệm phosphat chứa BlockAce 25% (được sản xuất bởi Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) được bổ sung ở 200 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt

ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, qua đó sự khóa được tiến hành. Chất lỏng được loại, và đĩa cấy được rửa hai lần bằng 300 µl/giếng của đệm rửa. Tiếp theo, mỗi của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 hoặc đối chứng IgG của chuột (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được pha loãng đến nồng độ cuối từ 1,28 đến 20,000 ng/ml (các loạt pha loãng 5 lần) bằng đệm ELISA (muối đệm phosphat chứa BlockAce 12,5% và Tween 20 0,05%), và dung dịch kháng thể được pha loãng tạo thành được bổ sung vào đĩa cấy ở 100 µl/giếng. Sau khi đĩa cấy được đặt ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ, chất lỏng được loại, và đĩa cấy được rửa 3 lần bằng 300 µl/giếng của đệm rửa. Tiếp theo, kháng thể IgG kháng chuột của dê được đánh dấu HRP (horseradish peroxidaza) (được sản xuất bởi Beckman Coulter, Inc.) được pha loãng đến 1,000-lần bằng đệm ELISA được bổ sung ở 100 µl/giếng, và đĩa cấy được đặt ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Chất lỏng được loại và đĩa cấy được rửa 3 lần bằng 300 µl/giếng của đệm rửa, và tiếp theo, bằng cách sử dụng kit tạo màu đối với peroxidaza (được sản xuất bởi Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), màu được tạo ra theo quy trình kèm theo kit này. Sau khi hình thành màu, sự hấp thu ở 492 nm được đo sử dụng đầu đọc vi đĩa (được sản xuất bởi Nihon Molecular Devices Corporation). Kết quả là, đã xác định tất cả 10 mẫu được kiểm tra của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột liên kết với protein Siglec-15 của người trong cách thức phụ thuộc nồng độ kháng thể (Fig.9). Cụ thể là, hoạt tính liên kết của 5 mẫu kiểm tra, tên là #1A1, #3A1, #24A1, #32A1, và #61A1, cao, và hoạt tính liên kết của 3 mẫu kiểm tra, tên là #8A1, #34A1, và #39A1, tương đối thấp. Mặt khác, trong trường hợp của đối chứng IgG của chuột, liên kết với protein Siglec-15 của người không được quan sát thấy. Từ các kết quả trên, đã thể hiện rằng các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 liên kết không chỉ với Siglec-15 chuột nhắt, mà còn liên kết với Siglec-15 của người, và hơn nữa, đã phát hiện rằng một số kháng thể liên kết mạnh với Siglec-15 của người.

Ví dụ 14

Hiệu quả của sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột trên sự dung hợp tế bào và hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (sự đánh giá *in vitro* hoạt tính sinh học)

Từ chỗ xác định các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột còn liên kết với Siglec-15 của người trong Ví dụ 13, các hậu quả của các kháng thể này trên sự hình thành tế bào hủy xương và hoạt tính tái hấp thu xương của người được kiểm tra.

a) Hiệu quả của sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột trên sự dung hợp tế bào của các tế bào hủy xương từ các tế bào tiền tế bào hủy xương bình thường của người (sự nhuộm màu TRAP)

Các tế bào tiền tế bào hủy xương của người bình thường (Các tế bào tiền tế bào hủy xương tự nhiên của người bình thường, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) được nhân lên trong đĩa 96 giếng ở 1 x 10^4 tế bào/giếng theo quy trình kèm theo các tế bào. Là môi trường, môi trường cốt yếu tối thiểu cho các tế bào tiền tế bào hủy xương (OPBM, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) được bổ sung bằng bộ bổ sung OPGM (được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) chứa huyết thanh nhau thai bò (nồng độ cuối: 10%), RANKL của người(nồng độ cuối: 66 ng/ml), M-CSF của người(nồng độ cuối: 33 ng/ml), và tương tự được sử dụng. Đối với nổi nuôi cấy tạo thành, mỗi nổi của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 hoặc đối chứng IgG của chuột (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) được bổ sung vào để thu nồng độ cuối 30 μg/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong 4 ngày trong buồng ủ CO_2. Sau khi cấy, dịch nổi được loại, và phormon trung tính 10% được bổ sung để cố định các tế bào. Sau khi cố định các tế bào, các tế bào được rửa hai lần bằng nước cất, dung dịch nhuộm màu TRAP (0,27 mM naphthol AS-MX phosphat (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.), 1,6 mM muối tím đỏ nhanh (được sản xuất

bởi Sigma Co., Ltd.), dimetylformamit 1%, natri tartrat 50 mM, đệm natri axetat 0,1 M (pH 5,0)) được bổ sung ở 100 µl/giếng, và phản ứng được cho tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau phản ứng, các tế bào được rửa hai lần bằng nước cất, và sau đó được quan sát bằng kính hiển vi (Fig.10). Kết quả là, sự hình thành của các tế bào hủy xương khổng lồ kết quả từ mức độ cao của sự dung hợp tế bào đã được ức chế gần như hoàn toàn bằng sự bổ sung kháng thể #32A1. Hơn nữa, trong trường hợp của kháng thể #41B1, sự hình thành của các tế bào hủy xương khổng lồ kết quả từ mức độ cao của sự dung hợp tế bào cũng được ức chế đáng kể. Mặt khác, trong trường hợp của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột khác (kháng thể #1A1 và các kháng thể khác) và đối chứng IgG của chuột, sự ức chế đáng kể sự dung hợp tế bào tế bào hủy xương không được quan sát thấy. Trong các này, đã hé lộ rằng sự đa nhân và sự dung hợp tế bào của các tế bào hủy xương dương tính TRAP từ các tế bào tiền tế bào hủy xương bình thường của người được ức chế bằng các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với protein Siglec-15.

b) Hiệu quả của sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (#32A1) trên sự dung hợp tế bào của các tế bào hủy xương từ các tế bào tiền tế bào hủy xương bình thường của người (TRAP Staining)

Các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (Các tế bào tiền tế bào hủy xương tự nhiên của người bình thường, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) được nhân lên trong đĩa 96 giếng ở 1 x 10^4 tế bào/giếng theo quy trình kèm theo các tế bào. Là môi trường, môi trường thiết yếu tối thiểu đối với các tế bào tiền tế bào hủy xương (OPBM, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) được bổ sung bằng thiết bị bổ sung OPGM (được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) chứa huyết thanh nhau thai bò (nồng độ cuối: 10%), RANKL của người (nồng độ cuối: 68,4 ng/ml), M-CSF của người (nồng độ cuối: 33 ng/ml), và tương tự được sử dụng. Đối với nổi nuôi cấy tạo thành, kháng thể đơn dòng kháng

Siglec-15 chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) được tạo ra trong Ví dụ 6 được bổ sung để thu nồng độ cuối 0,1, 0,3, 1, hoặc 3 μg/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong 3 ngày trong buồng ủ CO_2. Sau khi cấy, dịch nổi được loại, và phormon trung tính 10% được bổ sung để cố định các tế bào. Sau khi cố định các tế bào, các tế bào được rửa hai lần bằng nước cất, và dung dịch nhuộm màu TRAP (0,27 mM naphthol AS-MX phosphat (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.), 1,6 mM muối tím đỏ nhanh (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.), dimetylformamit 1%, natri tartrat 50 mM, đệm natri axetat 0,1 M (pH 5,0)) được bổ sung ở 100 μl/giếng, và phản ứng được cho tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau phản ứng, các tế bào được rửa hai lần bằng nước cất, và tiếp theo, được quan sát bằng kính hiển vi (Fig.11). Kết quả là, sự hình thành của các tế bào hủy xương đa nhân dương tính với TRAP bị ức chế trong cách thức phụ thuộc nồng độ kháng thể #32A1 trong ngưỡng từ 0,3 μg/ml đến 3 μg/ml.

c) Hiệu quả của sự bổ sung kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (#32A1) trên hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (Sự đánh giá sử dụng đĩa phủ collagen)

Đã biết rằng các tế bào hủy xương giải phóng proteaza như catepsin K và làm biến chất collagen dạng I là thành phần cấu tạo của mô xương. Kit phân tích OsteoLyse (OsteoLyse Assay Kit) (được sản xuất bởi Lonza, Inc., Cat. No. PA-1500) cung cấp đĩa 96 giếng được phủ collagen người được kết hợp ơ-rô-pi (Eu)(đĩa nuôi cất tế bào OsteoLyse 96 giếng), và có khả năng đánh giá hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào hủy xương *in vitro* bằng cách đo lượng các mảnh collagen huỳnh quang được giải phóng trong dịch nổi khi các tế bào hủy xương được nuôi cấy trên đĩa cấy. Các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (Các tế bào tiền tế bào hủy xương tự nhiên của người bình thường, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) được nhân lên trong đĩa nuôi cất tế bào OsteoLyse 96 giếng ở 1 x 10^4 tế bào/giếng theo quy trình kèm theo các tế bào. Là môi trường, môi trường thiết yếu tối thiểu đối với các tế bào

tiền tế bào hủy xương (OPBM, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) được bổ sung bằng thiết bị bổ sung OPGM (được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) chứa huyết thanh nhau thai bò (nồng độ cuối: 10%), RANKL của người (nồng độ cuối: 68,4 ng/ml), M-CSF của người (nồng độ cuối: 33 ng/ml), và tương tự được sử dụng. Đối với nổi nuôi cấy tạo thành, kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) được tạo ra trong Ví dụ 6 được bổ sung để thu nồng độ cuối 0,1, 0,3, 1, hoặc 3 μg/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong 3 ngày trong buồng ủ CO_2 . 10 μl phần chiết của dịch nổi nuôi cấy được thu, và 200 μl chất giải phóng Fluorophore (Fluorophore Releasing Reagent) được bao gồm trong Kit phân tích OsteoLyse (OsteoLyse Assay Kit) được bổ sung vào đó, và cường độ huỳnh quang được đo (Mức thấp nhất: 340 nm, Mức cao nhất: 615 nm) sử dụng đầu đọc đĩa huỳnh quang (ARVO MX, được sản xuất bởi Perkin Elmer Inc.), qua đó lượng các đoạn collagen huỳnh quang tự do được giải phóng trong dịch nổi nuôi cấy được xác định (Fig.12). Kết quả là, lượng các đoạn collagen huỳnh quang được tăng bằng sự bổ sung RANKL được giảm bằng kháng thể #32A1 theo cách phụ thuộc nồng độ trong ngưỡng từ 0,3 μg/ml đến 3 μg/ml. Từ kết quả này, đã bộc lộ rằng hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào hủy xương của người bị ức chế bởi kháng thể đơn dòng được nghiên cứu liên kết đặc hiệu với protein Siglec-15.

Ví dụ 15

Sự đánh giá hoạt tính sinh học của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột sử dụng các con chuột bị cắt bỏ buồng trứng

a) Quy trình thử nghiệm động vật

Các buồng trứng ở cả hai phía được cắt khỏi các con chuột cái F344 (được thu từ Charles River Laboratories Japan, Inc.) ở độ tuổi 12 tuần, và các con chuột này được chia thành 3 nhóm: nhóm cung cấp tá dược; nhóm cung cấp kháng thể đơn dòng #8A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột; và nhóm cung

cấp kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột. Hơn nữa, một nhóm được tạo ra là nhóm hoạt động giả. Trong các nhóm cung cấp kháng thể, kháng thể đơn dòng #8A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột hoặc kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 được cung cấp trong màng bụng ở liều 1 mg/kg ba lần một tuần lặp lại trong 4 tuần từ sau ngày hoạt động. Trong nhóm cung cấp tá dược và nhóm hoạt động giả, PBS chứa Tween 20 0,01% được cung cấp trong màng bụng là tá dược.Ở 4 tuần sau sự ức chế sự cung cấp, nước tiểu được thu trong 24 giờ dưới các điều kiện tuyệt thực, và các mẫu nước tiểu được bảo quản ở -80°C tới khi được đo. Sau khi hoàn thành việc thu thấp nước tiểu, các con chuột được cho chết nhẹ nhàng, và xương sống thắt lung được cắt khỏi mỗi con chuột.

b) Sự xác định mật độ khoáng xương sống thắt lưng

Các mô mềm của xương sống thắt lưng được cắt bỏ, và các đốt sống lưng thứ 4 đến thứ 6 được chiết. Đốt sống lưng được chiết được khử mỡ và khử nước bằng cách được lắc trong etanol và sau đó được làm khô bằng không khí, và mật độ khoáng xương được đo sử dụng máy đo quang học xương (DCS-600EX, được sản xuất bởi Aloka Co., Ltd.). Các kết quả được thể hiện trong Fig.13(A). Sự giảm đáng kể trong mật độ xương sống thắt lưng được quan sát trong nhóm bị cắt buồng trứng khi so sánh với nhóm hoạt động giả, tuy nhiên, trong nhóm cung cấp kháng thể #32A1 và #8A1, sự giảm mật độ khoáng xương do cắt buồng trứng bị ức chế đáng kể.

c) Sự xác định sự bài tiết deoxypyridinolin nước tiểu

Sự đa dạng của collagen dạng I được liên kết chéo những sự chuyển hóa phản ánh rõ nét sự quay vòng sự chuyển hóa xương, cụ thể là sự tái hấp thu xương. Tất cả ở trên là, deoxypyridinolin được nằm chủ yếu trong collagen xương, và do đó, được coi là chỉ số tin cậy cao của sự tái hấp thu xương.

Mẫu nước tiểu được bảo quản cryo được làm tan, và chất không tan được

làm lắng bằng quá trình ly tâm, qua đó nổi được thu. Lượng deoxypyridinolin chứa trong nổi này được đo sử dụng Osteolinks "DPD" (được sản xuất bởi DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Hơn nữa, bằng cách sử dụng Creatinine Test Wako (được sản xuất bởi Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), hàm lượng creatinin trong dịch nổi cũng được đo, và lượng deoxypyridinolin chính xác cho creatinin được tính. Các kết quả được thể hiện trong Fig.13(B). Sự bài tiết deoxypyridinolin nước tiểu được tăng lên đáng kể trong nhóm bị cắt buồng trứng khi so sánh với nhóm giả, và do đó, đã chỉ ra rằng trong các con chuột bị cắt bỏ buồng trứng, sự tái hấp thu xương tế bào hủy xương được tăng lên. Mặt khác, trong các nhóm kháng thể #8A1 và #32A1, sự tăng bài tiết deoxypyridinolin do buồng trứng bị cắt đã được ức chế để mức bài tiết deoxypyridinolin có thể so sánh với của nhóm hoạt động giả. Từ kết quả này, cũng đã khẳng định trong các mẫu động vật các kháng thể đơn dòng được nghiên cứu liên kết đặc hiệu với Siglec-15 ức chế sự tái hấp thu xương tế bào hủy xương, và đã đề cập đến một cách mạnh mẽ rằng do hiệu quả ức chế trên sự tái hấp thu xương, sự giảm mật độ khoáng xương xương sống thắt lưng trong các con chuột bị cắt bỏ buồng trứng đã bị ức chế.

Ví dụ 16

Sự xác định vị trí liên kết (epitop) của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

a) Sự biểu hiện và sự tinh sạch vùng chữ V Siglec-15 của người

ADN mã hóa protein trong đó mảng His và trình tự nhận biết trombin được gắn vào phía đầu N của vùng chữ V Siglec-15 của người (polypeptit chứa từ 39 đến 165 gốc axit amin của trình tự axit amin trong cơ sở dữ liệu NCBI Protein với số đăng ký NP_998767 hoặc trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trong phần danh mục trình tự) được tích hợp trong vectơ pDEST14 (Invitrogen, Inc., Cat. No. 11801-016). Bằng cách sử dụng plasmit này, *E.coli* Rosetta-gamiB (DE3) (Novagen, Inc., Cat. No. 71136-4) được biến đổi, và được nuôi cấy trong

môi trường TB (Invitrogen, Inc., Cat. No. 22711-022). Sau khi nuôi cấy, các tế bào vi khuẩn được làm đồng nhất bằng siêu âm, chất đồng nhất thu được này được ly tâm, và dịch nổi được tinh sạch bằng cột cao áp HisTrap (GE Healthcare, Co., Ltd., Cat. No. 17-5247-01). Sau đó, mảng His này được tách bằng trombin, và sau đó vùng chữ V Siglec-15 của người được tinh sạch sử dụng cột Mono S5/50 GL (GE Healthcare, Co., Ltd., Cat. No. 17-5168-01) và cột Superdex 75 10/300 (GE Healthcare, Co., Ltd., Cat. No. 17-5174-01) tới khi mạch đơn với trọng lượng phân tử 14 kDa được thu bằng điện di.

b) Sự tinh sạch Siglec-15-Fc của người hòa tan

Siglec-15-Fc của người hòa tan được tinh sạch bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 12.

c) ELISA cạnh tranh của vùng chữ V của người và kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

Trong đĩa maxi-sorp 96 giếng (được sản xuất bởi Nunc, Inc., số mẫu: 442404), 100 µl kháng thể kháng Fc người của dê (Jackson ImmunoResearch, Inc., số mẫu: 109-005-098) (1,25 µg/ml) được bổ sung vào mỗi giếng và được cố định qua đêm ở 4°C. Sau khi đĩa maxi-sorp 96 giếng được rửa hai lần bằng PBS, 100 µl Siglec-15-Fc của người hòa tan (1 µg/ml) được bổ sung vào mỗi giếng và được cố định ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, 300 µl dung dịch sữa không kem 5% /PBS được bổ sung vào mỗi giếng, và sự khóa các giếng được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Trong thời gian này, 2 µg/ml kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được trộn với lượng đương lượng của 0, 0,032, 0,16, 0,8, 4, hoặc 20 µg/ml vùng chữ V Siglec-15 của người, và phản ứng được cho tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1,5 giờ. Sau khi đĩa maxi-sorp 96 giếng được rửa hai lần bằng PBS, 100 µl dung dịch hỗ hợp của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột và vùng chữ V Siglec-15 của người được bổ sung vào đó, và phản ứng được cho tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi đĩa maxi-sorp 96 giếng được rửa 5 lần bằng

dung dịch Tween 20 0,05% (Bio-Rad Laboratories, Inc., Cat. No. 170-6531)/PBS (sau đây được đề cập đến là "dung dịch PBST"), 100 µl kháng thể kháng IgG chuột của dê được dán nhãn HRP (Beckman Coulter, Inc., Cat. No. 732664, được pha loãng đến 2000-lần) được bổ sung vào đó, và phản ứng được cho tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi đĩa cấy này được rửa 5 lần bằng dung dịch PBST, 100 µl chất lỏng tạo màu của Kit ABTS chất nền ELISA POD (ELISA POD Substrate ABTS Kit) (Nacalai Tesque Co., Ltd., Cat. No. 14351-80) được bổ sung vào đó, và phản ứng được cho tiến hành trong 30 phút. Tiếp theo, 100 µl dung dịch ngừng phản ứng được bổ sung vào đó, và sự hấp thu ở 405 nm được đo. Các kết quả của ELISA cạnh tranh chỉ ra sự liên kết của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột với Siglec-15 của người được cố định đã bị ức chế theo cách thức phụ thuộc nồng độ vùng chữ V của người. Vì vậy, đã thể hiện rằng nhân tố quyết định kháng nguyên đối với kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột là vùng chữ V Siglec-15 của người (vùng chứa từ 39 đến 165 gốc axit amin của trình tự axit amin trong bộ dữ liệu NCBI Protein với số đăng ký NP_998767 hoặc trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 trong phần danh mục trình tự) (Fig.14).

Ví dụ 17

Sự khuếch đại của cADN mã hóa vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột và sự phân tích trình tự bazơ của chúng

a) Sự điều chế mRNA

Tế bào lai #32A1 được nuôi cấy theo a) của Ví dụ 6. Từ 4 x 10^7 tế bào của khối tế bào lai #32A1, khoảng 65 µg mARN được tạo ra sử dụng kit tinh sạch mARN QuickPrep (QuickPrep mRNA purification kit) (GE Healthcare, Co., Ltd.).

b) Tổng hợp cADN (5'-RACE-Ready cADN)

Sự tổng hợp cADN (5'-RACE-Ready cADN) được tiến hành sử dụng 0,3 μg mARN được tạo ra trong a) với enzyme phiên mã ngược PrimeScript (PrimeScript Reverse Transcriptase) (TaKaRa Bio, Inc.) và Kit khuếch đại cADN SMART RACE (SMART RACE cDNA Amplification Kit) (Clontech Co., Ltd.).

c) Sự khuếch đại của cADN của vùng biến đổi chuỗi nặng gen #32A1 bằng 5'-RACE PCR

Là các mồi để khuếch đại cADN của vùng biến đổi chuỗi nặng gen #32A1 bằng PCR, UPM (Universal Primer A Mix, được gắn cùng Kit Khuếch đại cADN SMART RACE (SMART RACE cDNA Amplification Kit)) và oligonucleotit có trình tự 5'-GGCCGGGTGGGCTACGTTGCAGGTGACGGTCTG-3' (RG2AR2: SEQ ID NO: 23 trong phần danh mục trình tự) được sử dụng. Là UPM, được gắn với Kit khuếch đại cADN SMART RACE (SMART RACE cDNA Amplification Kit) (Clontech Co., Ltd.) được sử dụng, và RG2AR2 được thiết kế từ trình tự của vùng bảo toàn chuỗi nặng (IgG2a) của chuột trong bộ dữ liệu và được tổng hợp theo quy trình thông thường.

cADN của vùng biến đổi chuỗi nặng gen #32A1 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR sử dụng sự kết hợp của các mồi này và cADN được tổng hợp trong b) (5'-RACE-Ready cDNA) là khuôn. PCR được tiến hành sử dụng Kit PCR ưu thế 2 (Advantage 2 PCR Kit) (Clontech Co., Ltd.), và các điều kiện cho chu kỳ nhiệt được đặt như sau: sau khi làm nóng ở 94°C trong 1 phút, chu kỳ nhiệt độ của "94°C trong 0,5 phút và 72°C trong 3 phút" được lập lại 5 lần, Tiếp theo, chu kỳ nhiệt độ "94°C trong 0,5 phút, 70°C trong 0,5 phút, và 72°C trong 3 phút" được lập lại 5 lần, và hơn nữa, chu kỳ nhiệt độ "94°C trong 0,5 phút, 68°C trong 0,5 phút, và 72°C trong 3 phút" được lập lại 20 lần, tiếp theo được ủ ở 4°C.

d) Sự khuếch đại của cADN của vùng biến đổi gen chuỗi nhẹ #32A1 bằng

5'-RACE PCR

Là các mồi để khuếch đại cADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ gen #32A1 bằng PCR, UPM (Universal Primer A Mix, được gắn với Kit khuếch đại cADN SMART RACE (SMART RACE cDNA Amplification Kit) và oligonucleotit có trình tự 5'-CATGCTGTACGTGCTGTCTTTGCTGTCCTGATCAG-3'(RKR2: SEQ ID NO: 24 trong phần danh mục trình tự) được sử dụng. Là UPM,được gắn với Kit khuếch đại cADN SMART RACE (SMART RACE cDNA Amplification Kit) (Clontech Co., Ltd.) được sử dụng, và RKR2 được thiết kế từ trình tự của vùng bảo toàn chuỗi nhẹ (chuỗi κ) của chuột trong cơ sở dữ liệu và được tổng hợp theo quy trình thông thường.

cADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ gen #32A1 được khuếch đại bằng 5'-RACE PCR sử dụng sự kết hợp của các mồi này và cADN được tổng hợp trong b) (5'-RACE-Ready cDNA) là khuôn. PCR được tiến hành sử dụng Kit PCR ưu thế 2 (Advantage 2 PCR Kit) (Clontech Co., Ltd.), và các điều kiện cho chu kỳ nhiệt được đặt như sau: sau khi làm nóng ở 94°C trong 1 phút, chu kỳ nhiệt độ "94°C trong 0,5 phút và 72°C trong 3 phút" được lập lại 5 lần, Tiếp theo, chu kỳ nhiệt độ "94°C trong 0,5 phút, 70°C trong 0,5 phút, và 72°C trong 3 phút" được lập lại 5 lần, và hơn nữa, chu kỳ nhiệt độ "94°C trong 0,5 phút, 68°C trong 0,5 phút, và 72°C trong 3 phút" được lập lại 20 lần, tiếp theo được ủ ở 4°C.

e) Sự xác định các trình tự bazơ của các cADN của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ

cADN của vùng biến đổi chuỗi nặng được khuếch đại trong c) được tinh sạch sử dụng Kit tinh sạch PCR MinElute (MinElute PCR Purification Kit) (QIAGEN Inc.), và sau đó sự phân tích trình tự của trình tự ADN được tiến hành. Là mồi lập trình tự, ologinucleotit có trình tự 5'-CTCCAGAGTTCCAGGTCACGGTGACTGGC-3' (RG2AR3: SEQ ID NO: 25 trong phần danh mục trình tự) được thiết kế từ trình tự của vùng bảo toàn

chuỗi nặng (IgG2a) của chuột trong cơ sở dữ liệu và được tổng hợp theo quy trình thông thường.

cADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được khuếch đại trong d) được tinh sạch sử dụng Kit tinh sạch PCR MinElute (MinElute PCR Purification Kit) (QIAGEN Inc.), và sau đó sự phân tích trình tự của trình tự ADN được tiến hành. Là mồi lập trình tự, oligonucleotit có trình tự 5'-TCCAGTTGCTAACTGTTCCG-3' (sqRK: SEQ ID NO: 26 trong phần danh mục trình tự) được thiết kế từ trình tự của vùng bảo toàn chuỗi nhẹ (chuỗi κ) của chuột trong cơ sở dữ liệu và được tổng hợp theo quy trình thông thường.

cADN chứa vùng biến đổi chuỗi nặng thu được bằng sự phân tích trình tự có trình tự cơ bản nêu trong SEQ ID NO: 27 trong phần danh mục trình tự và mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự. Trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 1 đến 19 của SEQ ID NO: 28 tương ứng với tín hiệu kích thích bài tiết, trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 20 đến 140 của chúng tương ứng với vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 141 đến 167 của chúng tương ứng với vùng bảo toàn chuỗi nặng (một phần). Vùng biến đổi chuỗi nặng đã đề cập ở trên chứa CDRH1 (DYFMN) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44, CDRH2 (QIRNKIYTYATFYAESLEG) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45, và CDRH3 (SLTGGDYFDY) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46. Hơn nữa, cADN chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự cơ bản nêu trong SEQ ID NO: 29 trong phần danh mục trình tự và mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự. Trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 1 đến 20 của SEQ ID NO: 30 tương ứng với tín hiệu kích thích bài tiết, trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 21 đến 132 của chúng tương ứng với vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 133 đến 139 của chúng tương ứng với vùng bảo toàn chuỗi nhẹ (một phần).

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ đã đề cập ở trên chứa CDRL1 (RASQSVTISGYSFIH) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47, CDRL2 (RASNLAS) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48, và CDRL3 (QQSRKSPWT) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49.

Ví dụ 18

Sản xuất cấu trúc biểu hiệngen của kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

a) Sản xuất các vectơ biểu hện liên hợp pEF1/FCCU-1 và pEF6KCL

a)-i) Sự xây dựng vectơ biểu hện chuỗi nhẹ của người pEF6KCL

Bằng cách tiến hành PCR sử dụng plasmit pEF6/V5-HisB (Invitrogen) là khuôn và cũng sử dụng các mồi sau, đoạn ADN từ sự xuôi dòng tức thì của BGHpA (2174) đến SmaI (2958) (đoạn ADN chứa gốc f1 của sự lặp lại và gốc và chất hoạt hóa SV40, sau đây được đề cập đến là "đoạn gen A") được thu.

5'-CCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC-3' (mồi EFF1: SEQ ID NO: 31 trong phần danh mục trình tự)

5'-AAACCCGGGAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGG-3' (mồi EFsmaR: SEQ ID NO: 32)

Đoạn gen A thu được và đoạn ADN (SEQ ID NO: 33, sau đây được đề cập đến là "đoạn gen B") chứa trình tự ADN mã hóa tín hiệu kích thích bài tiết chuỗi κ của người, vùng bảo toàn chuỗi κ của người, và tín hiệu bổ sung poly-A của người được gắn bằng cách chập chồng PCR. Đoạn ADN thu được từ đó trong đó đoạn gen A và đoạn gen B được gắn (sau đây được đề cập đến là "đoạn A+B") được tiêu hủy bằng các enzym cắt hạn chế KpnI và SmaI, được gắn vào plasmit pEF6/V5-HisB (Invitrogen) được tiêu hủy bằng các enzym cắt hạn chế KpnI và SmaI, qua đó vectơ biểu hện chuỗi nhẹ của người pEF6KCL có trình tự tín hiệu, vị trí tách dòng, vùng bảo toàn chuỗi κ của người, và xuôi dòng trình tự tín hiệu bổ sung poly A của người của promoter EF1 được tạo nên.

a)-ii) Sự xây dựng pEF1/KCL

Đoạn ADN thu được bằng tách pEF6KCL thu được bằng phương pháp đã đề cập ở trên bằng các enzym cắt hạn chế KpnI và SmaI được gắn vào pEF1/myc-HisB (Invitrogen, Inc.) được phân hủy bằng KpnI và SmaI, qua đó plasmit pEF1/KCL được tạo nên.

a)-iii) Thiết kế vectơ biểu hiện chuỗi nặng của người pEF1/FCCU-1

Đoạn ADN (SEQ ID NO: 34 trong phần danh mục trình tự) chứa trình tự ADN mã hóa trình tự tín hiệu IgG1 của người và trình tự axit amin vùng bảo toàn được tiêu hủy bằng các enzym cắt hạn chế NheI và PmeI và được gắn vào plasmit pEF1/KCL được tiêu hủy bằng NheI và PmeI, qua đó vectơ biểu hện chuỗi nặng của người pEF1/FCCU-1 có trình tự tín hiệu, vị trí tách dòng, vùng bảo toàn chuỗi nặng của người, và xuôi dòng trình tự tín hiệu bổ sung poly-A của người của promoter EF1 được tạo ra.

b) Sự sản xuất cấu trúc biểu hiện chuỗi nặng kháng thể khảm #32A1 của người

Là các mồi để khuếch đại cADN của vùng biến đổi chuỗi nặng #32A1 bằng PCR, oligonucleotit có trình tự 5'-aaagctgagcGAGGTGCAAATTTTGGAGACTGGAGGAGGC-3' (32A1HF: SEQ ID NO: 35 trong phần danh mục trình tự) và oligonucleotit có trình tự 5'-aaagctgagctGACTGTGACCATGACTCCTTGGCCCCAG-3' (32A1HR: SEQ ID NO: 36 trong phần danh mục trình tự) được tổng hợp theo quy trình thông thường.

Ngẫu nhiên là, để hợp nhất sản phẩm PCR vào trong pEF1/FCCU-1, các mồi này được thiết kế để trình tự nhận biết cho enzym cắt hạn chế BlpI được bổ sung. PCR được tiến hành theo quy trình thông thường sử dụng sự kết hợp của các mồi này và cADN của vùng biến đổi chuỗi nặng được tinh sạch trong e) của Ví dụ 17 là khuôn. Sản phẩm PCR tạo thành được tinh sạch sử dụng Kit tinh sạch PCR MinElute (MinElute PCR Purification Kit) (QIAGEN, Inc.), và sau

đó đoạn ADN thu được bằng cách phân hủy sản phẩm PCR bằng enzym cắt hạn chế BlpI (NEW ENGLAND BIOLABS, Inc.) được chèn vào trong pEF1/FCCU-1 ở vị trí được tách bằng enzym cắt hạn chế BlpI, qua đó cấu trúc biểu hiện chuỗi nặng kháng thể khảm #32A1 của người được tạo ra. Trình tự của đoạn chèn được xác định bằng phân tích trình tự. Là mồi cho việc lập trình tự, oligonucleotit có trình tự 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (F11: SEQ ID NO: 37 trong phần danh mục trình tự) được tổng hợp theo quy trình thông thường. Vectơ biểu hện trong đó đoạn chèn có thể được chèn đúng được đặt tên là "32A1H/pEF1/FCCU".

c) Sản xuất cấu trúc biểu hiện chuỗi nặng kháng thể #32A1 khảm của người

Là các mồi để khuếch đại cADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ #32A1 bằng PCR, oligonucleotit có trình tự 5'-aaacatatggcGACATTGTCTTGACCCAGTCTCCTGCTTTGG-3' (32A1LF: SEQ ID NO: 38 trong phần danh mục trình tự) và oligonucleotit có trình tự 5'-aaacgtacgTCTCAATTCCAGCTTGGTGCCTCCAGCG-3' (32A1LR SEQ ID NO: 39 trong phần danh mục trình tự) được tổng hợp theo quy trình thông thường.

Ngẫu nhiên là, để tích hợp sản phẩm PCR vào trong pEF6KCL, các mồi này được thiết kế để trình tự nhận biết cho enzym cắt hạn chế NdeI được bổ sung vào 32A1LF, và trình tự nhận biết cho enzym cắt hạn chế BsiWI được bổ sung vào 32A1LR. PCR được tiến hành theo quy trình thông thường sử dụng sự kết hợp của các mồi này và cADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được tinh sạch trong e) của Ví dụ 17 là khuôn. Sản phẩm PCR tạo thành được tinh sạch sử dụng Kit tinh sạch PCR MinElute (MinElute PCR Purification Kit) (QIAGEN, Inc.), và tiếp theo, đoạn ADN thu được bằng cách phân hủy sản phẩm PCR bằng các enzym cắt hạn chế NdeI (TaKaRa Bio, Inc.) và BsiWI (NEW ENGLAND BIOLABS, Inc.) được chèn vào trong pEF6KCL ở vị trí được tách bằng các enzym cắt hạn chế NdeI (TaKaRa Bio, Inc.) và BsiWI (NEW ENGLAND

BIOLABS, Inc.), qua đó cấu trúc biểu hiện chuỗi nhẹ kháng thể #32A1 khảm của người được tạo ra. Trình tự của đoạn chèn được xác định bằng phân tích trình tự. Là mồi cho lập trình tự, mồi F11 nêu trong SEQ ID NO: 37 trong phần danh mục trình tự được sử dụng. Vectơ biểu hện trong đó đoạn chèn có thể được chèn đúng được đặt tên là "32A1L/pEF6KCL".

Gen chuỗi nặng kháng thể #32A1 khảm của người được tạo ra trong b) có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 40 trong phần danh mục trình tự và mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 trong phần danh mục trình tự. Trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 1 đến 19 của SEQ ID NO: 41 tương ứng với tín hiệu kích thích bài tiết, trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 20 đến 140 của chúng tương ứng với vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 141 đến 470 của chúng tương ứng với vùng bảo toàn chuỗi nặng. Hơn nữa, gen chuỗi nhẹ kháng thể #32A1 khảm của người được tạo ra trong c) có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 42 trong phần danh mục trình tự và mã hóa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43 trong phần danh mục trình tự. Trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 1 đến 20 của SEQ ID NO: 43 tương ứng với tín hiệu kích thích bài tiết, trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 21 đến 132 của chúng tương ứng với vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự axit amin được thể hiện bằng axit amin các số từ 133 đến 237 của chúng tương ứng với vùng bảo toàn chuỗi nhẹ.

Ví dụ 19

Sự điều chế kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

a) Sự sản xuất kháng thể khảm của người

3×10^7 tế bào của các tế bào 293 FreeStyle trong pha tăng trưởng logarit được nhân lên trong 30 ml môi trường biểu hiện FreeStyle 293 sạch (Invitrogen,

Inc.) (bốn lô được tạo ra, trong đó 30-ml nuôi cấy được giữ trong mỗi lô) và tiến hành sự nuôi cấy lắc (125 vòng/phút) ở 37°C trong buồng ủ CO_2 8%. 300 µg polyetylenimin (được sản xuất bởi Polyscience, Inc. #24765) được hòa tan trong 1 ml môi trường Opti-Pro SFM (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.), và dung dịch tạo thành được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Vectơ biểu hện chuỗi nặng kháng thể #32A1 khảm của người 32A1H/pEF1/FCCU và vectơ biểu hện chuỗi nhẹ kháng thể #32A1 khảm của người 32A1L/pEF6KCL được tạo ra trong Ví dụ 18 được điều chế sử dụng Kit plasmit PureLink HiPure (PureLink HiPure Plasmid Kit) (Invitrogen, Inc.). 32A1H/pEF1/FCCU (15 µg) và 32A1L/pEF6KCL (45 µg) được tạo huyền phù trong 1 ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen, Inc.), và nổi tạo thành được bổ sung vào 1 ml chất lỏng hỗn hợp của polyetylenimin/Opti-Pro SFM được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, và hỗn hợp tạo thành được đặt ở nhiệt độ phòng trong thêm 5 phút. Tiếp theo, 2 ml chất lỏng hỗn hợp của polyetylenimin/các vectơ biểu hện/Opti-Pro SFM được bổ sung vào mỗi lô của nổi tế bào 293 FreeStyle, và sự nuôi cấy lắc được tiếp tục. Sau khi các tế bào được nuôi cấy trong 7 ngày ở 37°C ở CO_2 8%, dịch nổi nuôi cấy được thu từ mỗi lô.

b) Sự tinh chế kháng thể khảm của người

90 ml dịch nổi nuôi cấy (đối với ba lô) thu được ở trên được lọc qua màng lọc (được sản xuất bởi NALGENE, Inc., #295-4545), và 0,5 ml MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-science Co., Ltd., #17-5438-01) được làm cân bằng bằng PBS được bổ sung vào phần lọc, và hỗn hợp tạo thành được lắc qua đêm ở 80 vòng/phút và 10°C. Vào ngày tiếp theo, chất mang được thu và được rửa bằng PBS, và sau đó, kháng thể được tách rửa bằng dung dịch arginin 1 M (pH 4,0). Sự tách rửa được cho qua cột PD-10 (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-science Co., Ltd., #17-0851-01) để thay thế chất lỏng bằng PBS, và sau đó được cô đặc bằng Amicon Ultra-4 (được sản xuất bởi Millipore Co., Ltd., #UFC805008), qua đó 1,2 ml của kháng thể khảm của người (0,98 mg/ml)

được thu. Nồng độ của kháng thể được tính từ phép đo ở 280 nm thu được sử dụng Hitachi Diode Array BioPhotometer U-0080D.

Ví dụ 20

Sự đánh giá tính chất của kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột liên kết với protein Siglec-15 của chuột nhắt

Sự ức chế cạnh tranh của kháng thể #32A1 của chuột chống lại kháng thể khảm của người được tinh sạch được tạo ra trong Ví dụ 19 được xác định bằng phương pháp sau. Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tinh sạch trong Ví dụ 4 được pha loãng đến 1 μg/ml bằng PBS, dung dịch được pha loãng được cung cấp ở 100 μl/giếng bên trên đĩa miễn dịch (được sản xuất bởi Nunc, Inc., #437111), và đĩa cấy được đặt qua đêm ở 4°C, qua đó protein được hút bám trên đĩa. Vào ngày tiếp theo, mỗi giếng được rửa hai lần bằng dung dịch PBS-T (PBS, Tween 200, 05% (v/v)), dung dịch thu được bằng cách pha loãng sữa không kem (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) đến 5% bằng PBS được cung cấp ở 350 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt để lắng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Chất lỏng trong mỗi giếng được loại, và mỗi giếng được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Sau đó, dung dịch hỗn hợp (dung dịch PBS chứa sữa không kem ở nồng độ cuối 0,5%) chứa kháng thể khảm của người ở 0,25 μg/ml và kháng thể #32A1 hoặc kháng thể đối chứng IgG của chuột (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc., #6-001-A) ở nồng độ khác nhau (0 μg/ml, 0,016 μg/ml, 0,05 μg/ml, 0,16 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1,66 μg/ml, hoặc 5 μg/ml) được cung cấp ở 100 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt để lắng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau khi mỗi giếng được rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T, IgG kháng người của dê AffiniPure được kết hợp với alkalin phosphataza (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch, Inc., #109-055-097) được pha loãng đến 2500-lần bằng dung dịch TBS-T (TBS, Tween 200, 05% (v/v)) được bổ sung ở 100 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt để lắng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Chất lỏng trong mỗi giếng

được loại, và mỗi giếng được rửa 5 lần bằng dung dịch TBS-T. Sau đó, dung dịch chất nền huỳnh quang (được sản xuất bởi Roche Co., Ltd., #11681982001) được bổ sung ở 100 µl/giếng, và phản ứng huỳnh quang được cho tiến hành. Ở 10 phút sau sự bổ sung dung dịch chất nền huỳnh quang, mật độ huỳnh quang được đo sử dụng đầu đọc đĩa. Kết quả là, đã thể hiện rằng kháng thể #32A1 ức chế sự liên kết của kháng thể khảm của người với Siglec-15-Fc của chuột nhắt theo cách phụ thuộc nồng độ. Hơn nữa, khi kháng thể #32A1 và kháng thể khảm của người được chọn ở cùng nồng độ (1:1), khoảng 40% sự ức chế cạnh tranh được thể hiện. Do đó, được coi là kháng thể #32A1 và kháng thể khảm của người về cơ bản có cùng ái lực đối với Siglec-15-Fc của chuột nhắt. Mặt khác, đối chứng IgG của chuột không thể hiện sự ức chế cạnh tranh (Fig.15).

Ví dụ 21

Sự đánh giá hoạt tính sinh học của kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột dựa trên sự kiểm tra đối với sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt và sự kiểm tra đối với sự hình thành tế bào hủy xương của người

a) Sự kiểm tra đối với sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt

Bằng cách sử dụng kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 19, hiểu quả đến sự phân hóa tế bào hủy xương của các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt được kiểm tra. Các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt được tạo ra bằng phương pháp Ví dụ 8 được điều chế ở 1,5 x 10^5 tế bào/ml trong môi trường α-MEM chứa FBS 10% và M-CSF 10 ng/ml (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.), chế phẩm tế bào tạo thành được nhân lên trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng trong lượng 200 µl và các tế bào được nuôi cấy trong 2 ngày trong buồng ủ CO_2 . Dung dịch nuôi cấy cũ trong đĩa 96 giếng được loại, và 100 µl môi trường MEM-α được bổ sung vào mỗi giếng, 100 µl môi trường MEM-α chứa FBS 10% mà RANKL (RANKL, được sản xuất bởi Peprotech, Inc.) và

M-CSF của người được bổ sung vào để thu nồng độ cuối lần lượt là 20 ng/ml và 10 ng/ml. Đối với dung dịch nuôi cấy tế bào, kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 hoặc kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 19 được bổ sung ở nồng độ từ 3 đến 100 ng/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong thêm 3 ngày trong buồng ủ CO_2 . Sau khi hoàn thành nuôi cấy, hoạt tính của phosphataza axit kháng tartrat (tartrate-resistant acid phosphatase) (TRAP) của các tế bào hủy xương được hình thành được đo bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 9. Sau khi ngừng phản ứng enzym, sự hút bám của mỗi giếng ở 405 nm được xác định, và sự xác định thu được này được sử dụng là chỉ số của hoạt tính TRAP. Các kết quả được thể hiện trong Fig.16. Sự ức chế phụ thuộc liều dùng của hoạt tính TRAP được quan sát ở nồng độ 50 ng/ml hoặc cao hơn trong trường hợp của kháng thể #32A1 và kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột. Từ kết quả này, đã thể hiện rằng kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột có hoạt tính ức chế sự hình thành tế bào hủy xương (sự phân hóa và sự trưởng thành tế bào hủy xương) về cơ bản có thể so sánh với của kháng thể #32A1 của chuột.

b) Đánh giá sử dụng các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (sự nhuộm màu TRAP)

Các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (Các tế bào tiền tế bào hủy xương tự nhiên của người bình thường, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) được nhân lên trong đĩa 96 giếng ở 1 x 10^4 tế bào/giếng theo quy trình đi kèm với các tế bào. Là môi trường, môi trường thiết yếu tối thiểu đối với các tế bào tiền tế bào hủy xương (OPBM, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) được bổ sung bằng thiết bị bổ sung OPGM (được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) chứa huyết thanh nhau thai bò (nồng độ cuối: 10%), RANKL của người (nồng độ

cuối: 66 ng/ml), M-CSF của người (nồng độ cuối: 33 ng/ml), và tương tự được sử dụng. Đối với nổi nuôi cấy tạo thành, kháng thể khảm của người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 19 được bổ sung ở nồng độ cuối 0,3, 1, 3, hoặc 10 μg/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong 3 ngày trong buồng ủ CO_2 . Sau khi cấy, dịch nổi được loại, và phormon trung tính 10% được bổ sung để cố định các tế bào. Sau khi cố định các tế bào, các tế bào được rửa hai lần bằng nước cất, dung dịch nhuộm màu TRAP (0,27 mM naphthol AS-MX phosphat (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.), muối tím đỏ nhanh 1,6 mM (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.), dimetylformamit 1%, natri tartrat 50 mM, đệm natri axetat 0,1 M (pH 5,0)) được bổ sung ở 100 μl/giếng, và phản ứng được cho tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau phản ứng, các tế bào được rửa hai lần bằng nước cất, và sau đó được quan sát bằng kính hiển vi (Fig.17). Kết quả là, sự hình thành của các tế bào hủy xương đa nhân dương tính với TRAP được ức chế bằng sự bổ sung kháng thể khảm của người của #32A1 trong ngưỡng từ 0,3 μg/ml đến 10 μg/ml.

Ví dụ 22

Sự thiết kế kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (1)

a) Thiết kế phiên bản được làm tương thích với người của #32A1

a)-i) Lập mô hình phân tử của vùng biến đổi của #32A1

Lập mô hình phân tử của vùng biến đổi của #32A1 được tiến hành bằng phương pháp nói chung đã biết là lập mô hình tương đồng (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Các trình tự sơ cấp (các cấu trúc không gian ba chiều thu được từ các cấu trúc tinh thể tia X đã có) của các vùng biến đổi của globulin miễn dịch của người được đăng ký trong Ngân hàng dữ liệu Protein (Protein Data Bank)(Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)) được so sánh với vùng biến đổi của #32A1 được xác định ở trên. Kết quả là, 1LK3 được

lựa chọn có mức độ tương đồng trình tự cao nhất với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của #32A1 trong số các kháng thể có loại bỏ tương tự trong khung. Hơn nữa, 1AD0 được lựa chọn có mức độ tương đồng trình tự cao nhất với vùng biến đổi của chuỗi nặng của #32A1. Cấu trúc không gian ba chiều của vùng khung được sinh ra bằng các thu "mẫu khung" bằng sự kết hợp những sự phối hợp của 1LK3 và 1AD0 tương ứng với các chuỗi nhẹ và nặng của #32A1. Các CDR của #32A1 được phân loại theo sự phân loại của Thornton et al. (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)) như sau: CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, và CDRH2 được chỉ định cho các cụm lần lượt là 15A, 7A, 9A, 10A, và 12B. CDRH3 được phân loại thành k(8)C theo các luật H3 (FEBS letter 399, 1-8 (1996)). Tiếp theo, các cấu hình tiêu bểu của các CDR tương ứng được tích hợp vào trong mẫu khung.

Cuối cùng, để thu được mẫu phân tử chức chắn của vùng biến đổi của #32A1 trong các điều khoản của năng lượng, sự tính toán năng lượng được tiến hành để ngăn sự tiếp xúc nội nguyên tử bất lợi. Quy trình trên được tiến hành sử dụng mồi chương trình đoán biết cấu trúc protein không gian 3 chiều đã được thương mại hóa và chương trình nghiên cứu kết hợp MacroModel (Schrodinger, LLC).

a)-ii) Thiết kế trình tự axit amin của #32A1 được làm tương thích với người

Kháng thể #32A1 được làm tương thích với người được tạo ra theo phương pháp chung đã biết là ghép CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Kháng thể phần tử nhận được lựa chọn trong hai cách dựa trên mức độ tương đồng axit amin bên trong vùng khung làm việc. Trình tự của vùng khung làm việc của #32A1 được so sánh với các trình tự của tất cả các khung làm việc của người trong cơ sở dữ liệu Kabat (Kabat Database) (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) liên quan đến các trình tự axit amin kháng thể. Kết quả là, kháng thể M37GO37'CL được lựa chọn là phần tử nhận dựa trên mức độ tương đồng trình tự 73% trong vùng khung làm việc. Các gốc axit amin trong vùng khung của M37GO37'CL được sắp xếp bằng các gốc axit amin của #32A1, và các vị trí khi các axit amin khác được sử dụng được xác định. Các vị trí của các

gốc này được phân tích sử dụng mô hình không gian ba chiều của #32A1 đã được cấu trúc ở trên. Tiếp theo, các gốc cho được ghép vào trên phần tử nhận được lựa chọn theo tiêu chuẩn được đề xuất bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

Trình tự của vùng khung của #32A1 được so sánh với các trình tự của tất cả các khung của người trong IgBLAST (Nuc. Acid Res,36, D25-D30 (2007)). Kết quả là, Đối với chuỗi L, AAB34430 được lựa chọn là phần tử nhận dựa trên mức độ tương đồng trình tự 79% trong vùng khung. Đối với chuỗi H, CAF31288 được lựa chọn là phần tử nhận dựa trên mức độ tương đồng trình tự 78% trong vùng khung. Đối với chuỗi L, các gốc axit amin trong vùng khung của AAB34430, và đối với chuỗi H, các gốc axit amin trong vùng khung của CAF31288, được sắp sếp với các gốc axit amin của #32A1, và các vị trí khi các axit amin khác được sử dụng được xác định. Các vị trí của các gốc này được phân tích sử dụng mô hình không gian ba chiều của #32A1 đã được cấu trúc ở trên. Tiếp theo, các gốc cho được ghép trên nhân tố nhận được lựa chọn theo tiêu chuẩn được đề xuất bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Trong các phương pháp này, bằng cách chuyển một số các gốc cho đã được lựa chọn đến kháng thể tiếp nhận, các trình tự #32A1 được lựa chọn được cấu trúc là được mô tả trong Các ví dụ sau.

b) Sự được làm tương thích với người chuỗi nặng #32A1

b)-i) Chuỗi nặng typ h#32A1-T1H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 61 (axit glutamic), 89 (valin), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 105 (xerin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, glyxin, phenylalanin, asparagin,

alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, asparagin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T1H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T1H nêu trong SEQ ID NO: 51 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 141 đến 470 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 nêu trong SEQ ID NO: 50 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 50, trình tự bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 421 đến 1410 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 50 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 cũng được thể hiện trong Fig.27.

b)-ii) Chuỗi nặng typ h#32A1-T2H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T2H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T2H nêu trong SEQ ID NO: 53 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 141 đến

470 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 nêu trong SEQ ID NO: 52 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 52, trình tự bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 421 đến 1410 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 52 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 cũng được thể hiện trong Fig.28.

b)-iii) Chuỗi nặng typ h#32A1-T3H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 104 (valin), 114 (isoleuxin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng valin, xerin, glutamin, methionin, valin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T3H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T3H nêu trong SEQ ID NO: 55 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 141 đến 470 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 nêu trong SEQ ID NO: 54 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 54, trình tự bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 421 đến 1410 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 54 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 cũng

được thể hiện trong Fig.29.

b)-iv) Chuỗi nặng typ h#32A1-T5H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 61 (axit glutamic), 89 (valin), 95 (axit aspartic), 97 (axit glutamic), 99 (xerin), 104 (valin), 105 (xerin), 114 (isoleuxin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng valin, valin, xerin, glutamin, glyxin, phenylalanin, asparagin, lyzin, threonin, methionin, asparagin, valin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T5H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T5H nêu trong SEQ ID NO: 57 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 141 đến 470 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 nêu trong SEQ ID NO: 56 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 56, trình tự bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 421 đến 1410 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 56 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 cũng được thể hiện trong Fig.30.

b)-v) Chuỗi nặng typ h#32A1-T6H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 95 (axit aspartic), 97 (axit glutamic), 99 (xerin), 104 (valin), 114

(isoleuxin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng valin, valin, xerin, glutamin, asparagin, lyzin, threonin, methionin, valin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T6H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T6H nêu trong SEQ ID NO: 59 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 141 đến 470 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 nêu trong SEQ ID NO: 58 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 58, trình tự bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 421 đến 1410 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 58 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 cũng được thể hiện trong Fig.31.

b)-vi) Chuỗi nặng typ h#32A1-T7H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 89 (valin), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 105 (xerin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, phenylalanin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, asparagin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T7H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T7H nêu trong SEQ ID NO:

72 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 121 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 72 và trình tự bao gồm các gốc axit amin 122 đến 451 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 72 cũng được thể hiện trong Fig.38.

b)-vii) Chuỗi nặng typ h#32A1-T8H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 61 (axit glutamic), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 105 (xerin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, glyxin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, asparagin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T8H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T8H nêu trong SEQ ID NO: 73 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 121 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 73 và trình tự bao gồm các gốc axit amin 122 đến 451 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 73 cũng được thể hiện trong Fig.38.

b-viii) Chuỗi nặng typ h#32A1-T9H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 61 (axit glutamic), 89 (valin), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1

nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, glyxin, phenylalanin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T9H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T9H nêu trong SEQ ID NO: 74 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 121 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 74 và trình tự bao gồm các gốc axit amin 122 đến 451 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 74 cũng được thể hiện trong Fig.38.

b)-ix) Chuỗi nặng typ h#32A1-T10H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 105 (xerin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, asparagin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T10H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T10H nêu trong SEQ ID NO: 75 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 121 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75 và trình tự bao gồm các gốc axit amin 122 đến 451 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75 cũng được thể hiện trong Fig.39.

b)-x) Chuỗi nặng typ h#32A1-T11H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 89 (valin), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, phenylalanin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T11H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T11H nêu trong SEQ ID NO: 76 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 121 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76 và trình tự bao gồm các gốc axit amin 122 đến 451 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76 cũng được thể hiện trong Fig.39.

b)-xi) Chuỗi nặng typ h#32A1-T12H:

Chuỗi nặng #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế các gốc axit amin 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 61 (axit glutamic), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của chuỗi nặng #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, glyxin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-T12H".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-T12H nêu trong SEQ ID NO: 77 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 121 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77 và trình tự bao gồm các gốc

axit amin 122 đến 451 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 77 cũng được thể hiện trong Fig.39.

c) Sự được làm tương thích với người chuỗi nhẹ #32A1

c)-i) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T1L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, tyrosine, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T1L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T1L nêu trong SEQ ID NO: 61 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 của chúng tương ứng với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ, lần lượt. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61 nêu trong SEQ ID NO: 60 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 60, trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 của chúng mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ, lần lượt. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 60 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 61 cũng được thể hiện trong Fig.32.

c)-ii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T2L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T2L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T2L nêu trong SEQ ID NO: 63 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63 nêu trong SEQ ID NO: 62 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 62, trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 62 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 63 cũng được thể hiện trong Fig.33.

c)-iii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T3L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và

132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit aspartic, xerin, axit glutamic, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T3L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T3L nêu trong SEQ ID NO: 65 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65 nêu trong SEQ ID NO: 64 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 64, trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 64 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 65 cũng được thể hiện trong Fig.34.

c)-iv) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T4L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 36 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit glutamic, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T4L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T4L nêu trong SEQ ID NO: 67 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 132 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin 133 đến

237 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67 nêu trong SEQ ID NO: 66 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 66, trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 396 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 397 đến 711 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 66 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 67 cũng được thể hiện trong Fig.35.

c)-v) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T5L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 123 (glyxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, lyzin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, tyrosine, glyxin, glutamin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T5L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T5L nêu trong SEQ ID NO: 69 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 69, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 69 nêu trong SEQ ID NO: 68 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 68,

trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 68 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 69 cũng được thể hiện trong Fig.36.

c)-vi) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T6L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T6L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T6L nêu trong SEQ ID NO: 71 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71 nêu trong SEQ ID NO: 70 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 70, trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 70 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71 cũng được thể hiện trong Fig.37.

c)-vii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T7L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, tyrosine, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T7L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T7L nêu trong SEQ ID NO: 78 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78 cũng được thể hiện trong Fig.40.

c)-viii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T8L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, tyrosine, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T8L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T8L nêu trong SEQ ID NO:

79 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 79 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 79 cũng được thể hiện trong Fig.40.

c)-ix) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T9L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T9L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T9L nêu trong SEQ ID NO: 80 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 80 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 80 cũng được thể hiện trong Fig.40.

c)-x) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T10L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit

aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, tyrosine, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T10L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T10L nêu trong SEQ ID NO: 81 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 81 cũng được thể hiện trong Fig.40.

c)-xi) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T11L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, tyrosine, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T11L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T11L nêu trong SEQ ID NO: 82 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 82 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 82 cũng được

thể hiện trong Fig.40.

c)-xii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T12L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T12L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T12L nêu trong SEQ ID NO: 83 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 83 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 83 cũng được thể hiện trong Fig.41.

c)-xiii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T13L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin,

tyrosine, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T13L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T13L nêu trong SEQ ID NO: 84 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 84 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 84 cũng được thể hiện trong Fig.41.

c)-xiv) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T14L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T14L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T14L nêu trong SEQ ID NO: 85 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 85 cũng được thể hiện trong Fig.41.

c)-xv) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T15L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách

thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, tyrosine, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T15L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T15L nêu trong SEQ ID NO: 86 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 86 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 86 cũng được thể hiện trong Fig.41.

c)-xvi) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T16L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T16L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T16L nêu trong SEQ ID NO: 87 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113

của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 87 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 87 cũng được thể hiện trong Fig.41.

c)-xvii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T17L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 122 (alanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, glyxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T17L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T17L nêu trong SEQ ID NO: 88 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 88 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 88 cũng được thể hiện trong Fig.42.

c)-xviii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T18L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục

trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, tyrosine, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T18L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T18L nêu trong SEQ ID NO: 89 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 89 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 89 cũng được thể hiện trong Fig.42.

c)-xix) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T19L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 66 (glutamin), 68 (arginin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, prolin, lyzin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T19L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T19L nêu trong SEQ ID NO: 90 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 90 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 90 cũng được thể hiện trong Fig.42.

c)-xx) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T20L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách

thay thế axit amin các số 24 (leuxin), 29 (alanin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 36 (glutamin), 41 (xerin), 66 (glutamin), 81 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, axit aspartic, xerin, axit glutamic, asparagin, prolin, valin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, valin, valin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T20L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T20L nêu trong SEQ ID NO: 91 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 91 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 91 cũng được thể hiện trong Fig.42.

c)-xxi) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T21L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 21 (axit aspartic), 24 (leuxin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 31 (alanin), 32 (valin), 34 (leuxin), 36 (glutamin), 40 (isoleuxin), 66 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 102 (glutamin), 103 (alanin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 123 (glyxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit glutamic, methionin, threonin, xerin, leuxin, prolin, axit glutamic, leuxin, alanin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, prolin, axit glutamic, phenylalanin, leuxin, tyrosine, glyxin, glutamin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T21L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T21L nêu trong SEQ ID NO:

92 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 92 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 92 cũng được thể hiện trong Fig.42.

c)-xxii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T22L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 21 (axit aspartic), 24 (leuxin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 31 (alanin), 32 (valin), 34 (leuxin), 36 (glutamin), 40 (isoleuxin), 66 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 102 (glutamin), 103 (alanin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 123 (glyxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit glutamic, methionin, threonin, xerin, leuxin, prolin, axit glutamic, leuxin, alanin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, prolin, axit glutamic, phenylalanin, leuxin, glutamin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T22L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T22L nêu trong SEQ ID NO: 93 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 93 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 93 cũng được thể hiện trong Fig.43.

c)-xxiii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T23L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 24 (leuxin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 31 (alanin), 32 (valin), 34 (leuxin), 36 (glutamin), 40

(isoleuxin), 66 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 102 (glutamin), 103 (alanin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng methionin, threonin, xerin, leuxin, prolin, axit glutamic, leuxin, alanin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, prolin, axit glutamic, phenylalanin, leuxin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T23L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T23L nêu trong SEQ ID NO: 94 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 94 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 94 cũng được thể hiện trong Fig.43.

c)-xxiv) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T24L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 21 (axit aspartic), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 31 (alanin), 32 (valin), 34 (leuxin), 36 (glutamin), 40 (isoleuxin), 66 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 102 (glutamin), 103 (alanin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 123 (glyxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit glutamic, threonin, xerin, leuxin, prolin, axit glutamic, leuxin, alanin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, prolin, axit glutamic, phenylalanin, leuxin, tyrosine, glyxin, glutamin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T24L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T24L nêu trong SEQ ID NO: 95 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 95 và trình tự bao gồm các gốc axit

amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 95 cũng được thể hiện trong Fig.43.

c)-xxv) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-T25L:

Chuỗi nhẹ #32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 31 (alanin), 32 (valin), 34 (leuxin), 36 (glutamin), 40 (isoleuxin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 102 (glutamin), 103 (alanin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 110 (phenylalanin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của chuỗi nhẹ #32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng threonin, xerin, leuxin, prolin, axit glutamic, leuxin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, prolin, axit glutamic, phenylalanin, tyrosine, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-T25L".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-T25L nêu trong SEQ ID NO: 96 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 113 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 96 và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 114 đến 218 của chúng tương ứng lần lượt với vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự axit amin của SEQ ID NO: 96 cũng được thể hiện trong Fig.43.

Ví dụ 23

Sản xuất gen của kháng thể làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

a) Sự xây dựng h#32A1-T1L, h#32A1-T2L, h#32A1-T3L, h#32A1-T4L, h#32A1-T5L, và các vectơ biểu hện chuỗi nhẹ typ h#32A1-T6L

Các ADN mỗi chúng chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ typ h#32A1-T1L, h#32A1-T2L, h#32A1-T3L, h#32A1-T4L, h#32A1-T5L, hoặc

h#32A1-T6L được dung hợp với tín hiệu kích thích bài tiết được thể hiện bằng: axit amin các số từ 1 đến 133 của SEQ ID NO: 61 trong phần danh mục trình tự; axit amin các số từ 1 đến 133 của SEQ ID NO: 63; axit amin các số từ 1 đến 133 của SEQ ID NO: 65; axit amin các số từ 1 đến 132 của SEQ ID NO: 67; axit amin các số từ 1 đến 133 của SEQ ID NO: 69; hoặc axit amin các số từ 1 đến 133 của SEQ ID NO: 71 được tổng hợp (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Artificial gene Synthesis Service). Tiếp theo, mỗi đoạn của các đoạn ADN thu được bằng các tách các ADN được tổng hợp bằng các enzym cắt hạn chế NheI và BsiWI được chèn vào trong vectơ biểu hện chuỗi nhẹ kháng thể làm tương thích với người liên hợp (pEF6KCL) ở vị trí được tách bằng các enzym cắt hạn chế NheI và BsiWI, qua đó các vectơ biểu hện chuỗi nhẹ typ h#32A1-T1L, h#32A1-T2L, h#32A1-T3L, h#32A1-T4L, h#32A1-T5L, và h#32A1-T6L được cấu trúc. Các vectơ biểu hện thu được từ đó được đặt tên lần lượt là "pEF6KCL/h#32A1-T1L", "pEF6KCL/h#32A1-T2L", "pEF6KCL/h#32A1-T3L", "pEF6KCL/h#32A1-T4L", "pEF6KCL/h#32A1-T5L", và "pEF6KCL/h#32A1-T6L".

b) Sự xây dựng các vectơ biểu hện chuỗi nặng h#32A1-T1H, h#32A1-T2H, h#32A1-T3H, h#32A1-T5H, và h#32A1-T6H

Các ADN mỗi chúng chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng typ h#32A1-T1H, h#32A1-T2H, h#32A1-T3H, h#32A1-T5H, hoặc h#32A1-T6H được dung hợp với tín hiệu kích thích bài tiết được thể hiện bằng axit amin các số từ 1 đến 140 của SEQ ID NO: 51, 53, 55, 57, hoặc 59 trong phần danh mục trình tự được tổng hợp (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Artificial gene Synthesis Service). Tiếp theo, mỗi đoạn của các đoạn ADN thu được bằng cách tách các ADN được tổng hợp bằng enzym cắt hạn chế BlpI được chèn vào trong vectơ biểu hện chuỗi nặng kháng thể làm tương thích với người liên hợp (pEF1/FCCU-1) ở vị trí được tách bằng enzym cắt hạn chế BlpI, qua đó h#32A1-T1H, h#32A1-T2H, h#32A1-T3H, h#32A1-T5H, và các vectơ biểu hện

chuỗi nặng h#32A1-T6H được cấu trúc. Các vectơ biểu hện thu được từ đó được đặt tên lần lượt là "pEF1/FCCU/h#32A1-T1H", "pEF1/FCCU/h#32A1-T2H", "pEF1/FCCU/h#32A1-T3H", "pEF1/FCCU/h#32A1-T5H", và "pEF1/FCCU/h#32A1-T6H".

Ví dụ 24

Điều chế kháng thể làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

a) Sự sản xuất kháng thể được làm tương thích với người

1,5 x 10^8 tế bào của các tế bào 293 FreeStyle trong pha sinh trưởng logarit được nhân lên trong 100 ml môi trường biểu hiện FreeStyle 293 sạch (Invitrogen, Inc.) và được cho nuôi cấy lắc (125 vòng/phút) ở 37°C trong buồng ủ CO_2 8%. 1 mg polyetylenimin (được sản xuất bởi Polyscience, Inc. #24765) được hòa tan trong 4 ml môi trường Opti-Pro SFM (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.), và dung dịch tạo thành được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Plasmit biểu hiện chuỗi nặng (0,05 mg) và plasmit biểu hiện chuỗi nhẹ (0,15 mg) được tạo ra sử dụng Kit plasmit PureLink HiPure (PureLink HiPure Plasmid Kit) (Invitrogen, Inc.) được tạo huyền phù trong 4 ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen, Inc.). Tiếp theo, 4 ml chat lỏng hỗn hợp các plasmit biểu hiện/Opti-Pro SFM thu được bổ sung vào 4 ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, và hỗn hợp tạo thành được đặt ở nhiệt độ phòng trong thêm 5 phút. Tiếp theo, 8 ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/các plasmit biểu hiện/Opti-Pro SFM được bổ sung vào dịch nổi tế bào 293 FreeStyle, và sự nuôi cấy lắc được tiếp tục. Sau khi các tế bào được nuôi cấy trong 7 ngày ở 37°C trong CO_2 8%, dịch nổi nuôi cấy được thu.

b) Sự tinh chế kháng thể được làm tương thích với người

Dịch nổi nuôi cấy được thu trong phần a) ở trên được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Protein A. 100 ml dịch nổi nuôi cấy được đặt trong bình ngưng 500-ml, và

1 ml dịch nổi (50% chất sệt) của MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bio-science Co., Ltd.) được làm cân bằng bằng PBS được bổ sung vào đó. Hỗn hợp tạo thành được lắc qua đêm ở 100 vòng/phút trong buồng ủ ở 10°C. Tiếp theo, nổi nuôi cấy 293F/thể vẩn MabSelect SuRe được cho qua Cột Zeba Spin (Zeba Spin Column) rỗng 5 mL (PIERCE, Inc.). Sau khi toàn bộ chất được làm tương thích với người được rót qua cột, cột được rửa bằng 10 ml 1 M NaCl. Tiếp theo, 1 ml dung dịch arginin 1 M (pH 4,0) được cho qua cột, và đoạn gen chứa kháng thể được thu. Đoạn gen được bổ sung vào thiết bị lọc li tâm (Amicon Ultra-4, trọng lượng phân tử từng phần: 50 K, Millipore Co., Ltd.), và sự thay thế chất lỏng bằng đệm xitrat và sự hóa đặc được tiến hành. Thể tích cuối cùng được tạo ra không quá 200 µl, được sử dụng là mẫu được tinh sạch.

Kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T1L và pEF1/FCCU/h#32A1-T1H được đặt tên là "h#32A1-T1"; kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T2L và pEF1/FCCU/h#32A1-T2H được đặt tên là "h#32A1-T2"; kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T3L và pEF1/FCCU/h#32A1-T3H được đặt tên là "h#32A1-T3"; kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T4L và pEF1/FCCU/h#32A1-T3H được đặt tên là "h#32A1-T4"; kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T5L và pEF1/FCCU/h#32A1-T5H được đặt tên là "h#32A1-T5"; và kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T6L và pEF1/FCCU/h#32A1-T6H được đặt tên là "h#32A1-T6".

Ví dụ 25

Sự đánh giá đặc tính liên kết của kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột với protein

Siglec-15 của chuột nhắt

Đặc tính liên kết của các kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột từ T1 đến T6 với Siglec-15-Fc của chuột nhắt và Siglec-15-Fc của người được đánh giá bằng phương pháp sau. Siglec-15-Fc của chuột nhắt được tinh sạch trong Ví dụ 4 hoặc Siglec-15-Fc của người được tinh sạch trong Ví dụ 12 được pha loãng đến 1 μg/ml bằng PBS, và dung dịch được pha loãng được cung cấp ở 100 μl/giếng bên trên đĩa miễn dịch (được sản xuất bởi Nunc, Inc., #437111), và đĩa cấy được đặt qua đêm ở 4°C, qua đó mỗi protein được hút bám trên đĩa. Vào ngày tiếp theo, mỗi giếng được rửa 5 lần bằng dung dịch PBS-T (PBS, Tween 200, 05% (v/v)), và dung dịch thu được bằng cách pha loãng sữa không kem (được sản xuất bởi Morinaga Milk Industry Co., Ltd.) đến 5% bằng PBS được cung cấp ở 350 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt yên ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Chất lỏng trong mỗi giếng được loại, và mỗi giếng được rửa 5 lần bằng dung dịch PBS-T. Sau đó, mỗi kháng thể của các kháng thể được làm tương thích với người được tinh sạch của #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột từ T1 đến T6 được tạo ra trong Ví dụ 24 hoặc kháng thể khảm của người được tạo ra trong Ví dụ 19 được pha loãng đến nồng độ cuối từ 1 đến 0,004 μg/ml (các loạt pha loãng 4 lần) bằng dung dịch PBS chứa sữa không kem 0,5%, dung dịch được pha loãng được cung cấp ở 100 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt để lắng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Tại thời điểm này, nồng độ của mỗi kháng thể được xác định bằng các tiến hành đo ở 280 nm sử dụng máy đo ảnh phổ DU-7400 (được sản xuất bởi Beckman Coulter, Inc.) và tiến hành các phép tính dựa trên hệ số triệt tiêu phân tử lượng của mỗi kháng thể. Sau khi mỗi giếng được rửa 5 lần bằng dung dịch PBS-T, IgG kháng người của dê AffiniPure được kết hợp với alkalin phosphataza (được sản xuất bởi Jackson ImmunoResearch, Inc., #109-055-097) được pha loãng đến 2500 lần bằng dung dịch TBS-T (TBS, Tween 20 0,05% (v/v)) được bổ sung ở 100 μl/giếng, và đĩa cấy được đặt để lắng ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Chất lỏng

trong mỗi giếng được loại, và mỗi giếng được rửa 5 lần bằng dung dịch TBS-T. Sau đó, dung dịch chất nền huỳnh quang (được sản xuất bởi Roche Co., Ltd., #11681982001) được bổ sung ở 100 µl/giếng, và phản ứng huỳnh quang được cho tiến hành. Sau 10 phút từ khi bổ sung dung dịch chất nền huỳnh quang trong trường hợp của đĩa có Siglec-15-Fc của chuột nhắt được hút bám lên đó, và sau 15 phút trong trường hợp của đĩa có Siglec-15-Fc của người được hút bám lên đó, cường độ huỳnh quang được đo sử dụng Spectra Max M5 (được sản xuất bởi Molecular Devices, Inc.). Kết quả là, đã xác định tất cả sáu kháng thể được làm tương thích với người được kiểm tra của Siglec-15 kháng chuột nhắt của chuột liên kết với protein Siglec-15 của chuột nhắt (Fig.18) và protein Siglec-15 của người (Fig.19) trong cách thức phụ thuộc nồng độ kháng thể.

Ví dụ 26

Hiệu quả của sự bổ sung kháng thể khảm của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột đến sự phân hóa tế bào hủy xương của các tế bào không bám dính tủy xương chuột nhắt (sự kích thích bằng TNFα)

Bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 và kháng thể khảm của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 19, sự ảnh hưởng đến sự phân hóa tế bào hủy xương của các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt bằng sự kích thích bằng TNFα được kiểm tra. Các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt được tạo ra bằng phương pháp Ví dụ 8 được điều chế ở 1,5 x 10^5 tế bào/ml trong môi trường α-MEM chứa huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS), 10 ng/ml M-CSF, và 2 ng/ml TGF-β (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.), chế phẩm tế bào tạo thành được nhân lên trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng trong lượng 200 µl và các tế bào được nuôi cấy trong 2 ngày trong buồng ủ CO_2 . Dung dịch nuôi cấy cũ trong đĩa 96 giếng được loại, và 100 µl môi trường MEM-α được bổ sung vào mỗi giếng, 100 µl môi trường MEM-α chứa FBS 10% mà TNFα (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) và

M-CSF của người tái tổ hợp được bổ sung vào để thu nồng độ cuối lần lượt là 30 ng/ml và 10 ng/ml. Đối với dung dịch nuôi cấy tế bào, kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 6 hoặc kháng thể khảm của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột được tạo ra trong Ví dụ 19 được bổ sung ở nồng độ từ 0,125 đến 4 μg/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong thêm 3 ngày trong buồng ủ CO_2 . CÙng thời gian đó, giếng trong đó các tế bào được nuôi cấy bằng cách bổ sung OCIF/OPG của người tái tổ hợp được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả của Công bố đơn Patent số WO 96/26217 ở nồng độ 100 ng/ml cũng được điều chế. Sau khi hoàn thành nuôi cấy, sự nhuộm màu TRAP được tiến hành sử dụng kit leukoxyt axit phosphataza (được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.) theo quy trình kèm theo kit, và sự hình thành của các tế bào hủy xương đa nhân dương tính với TRAP được quan sát. Kết quả là, sự hình thành của các tế bào hủy xương đa nhân khổng lồ dương tính với TRAP được ức chế bằng sự bổ sung kháng thể đa dòng kháng Siglec-15 của chuột nhắt (Fig.20). Mặc dù các tế bào hủy xương đơn nhân nhỏ được hình thành ngay cả trong trường hợp khi kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột hoặc kháng thể khảm của chúng được bổ sung, sự hình thành của các tế bào hủy xương đa nhân lớn gây ra bởi TNFα đã được ức chế gần như hoàn toàn. Mặt khác, thậm chí khi lượng đáng kể OCIF/OPG, là chất khóa RANKL, được bổ sung, sự hình thành của các tế bào hủy xương đa nhân lớn được ức chế chỉ một ít. Hơn nữa, theo cùng cách, hoạt tính của phosphataza axit kháng tartrat (tartrate-resistant acid phosphatase) (TRAP) của các tế bào hủy xương được hình thành được đo bằng quy trình được mô tả trong Ví dụ 9. Sau khi ngừng phản ứng enzym, sự hút bám của mỗi giếng ở 405 nm được xác định, và sự xác định thu được này được sử dụng là chỉ số của hoạt tính TRAP. Các kết quả được thể hiện trong Fig.21. Sự ức chế đáng kể của hoạt tính TRAP được quan sát trong trường hợp của kháng thể #32A1 và kháng thể khảm của #32A1 trong ngưỡng từ 125 ng/ml đến 4 μg/ml. Từ các kết quả này, đã thể hiện rằng kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của

chuột và kháng thể khảm của chúng ức chế mạnh quá trình dung hợp tế bào trong sự phân hóa và sự trưởng thành tế bào hủy xương gây ra bởi TNFα.

Ví dụ 27

Sự đánh giá hoạt tính sinh học của các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột #8A1 và #32A1 dựa trên sự kiểm tra đối với chuột sự hình thành tế bào hủy xương

Bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột #8A1 và #32A1 được tạo ra trong Ví dụ 6, sự ảnh hưởng đến sự phân hóa tế bào hủy xương của các tế bào không bám dính tủy xương của chuột được kiểm tra. Các tế bào không bám dính tủy sương chuột được tạo ra bằng cách cải biến phương pháp Ví dụ 8. Nghĩa là, xương đùi được cắt khỏi chân của chuột cái F344 ở độ tuổi 12 tuần và các mô mềm được loại. Cả hai đầu của xương đùi được cắt khỏi, và môi trường MEM-α được tiêm sử dụng ống tiêm với mũi tiêm cỡ 23 để hút ra các tế bào tủy xương, được thu trong ống li tâm. Sự li tâm được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 5 phút ở 100 g, và dịch nổi được loại. Đối với cục tế bào tạo thành, 1 ml đệm hemolytic (Đệm dung giải tế bào máu đỏ - Red Blood Cell Lysing Buffer, được sản xuất bởi Sigma Co., Ltd.) được bổ sung để làm huyền phù nó, và nổi tạo thành được đặt ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. 20 ml D-PBS được bổ sung vào đó, dịch nổi được ly tâm ở nhiệt độ phòng trong 5 phút ở 100 g, và dịch nổi được loại. Đối với cục tế bào tạo thành, 10 ml môi trường MEM-α (được sản xuất bởi Invitrogen, Inc.) chứa M-CSF 5 ng/ml (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.) và huyết thanh nhau thai bò 10% (FBS) được bổ sung để làm huyền phù nó. Tiếp theo, nổi tạo thành được cho qua dụng cụ lọc tế bào (40 μm Nylon, được sản xuất bởi BD Falcon) để loại các kết tụ. Các tế bào thu được này được chuyển vào bình T 75 cm^2 (để cho sự bám của các tế bào bám dính) và được nuôi cấy qua đêm trong buồng ủ CO_2. Sauk hi nuôi cấy qua đêm, các tế bào không bám dinh vào bình T được thu hồi và được sử dụng là các tế bào không bám dính tủy xương chuột.

Các tế bào không bám dính tủy xương chuột được tạo ra bằng phương pháp này được nuôi cấy và sự kiểm tra đối với sự hình thành tế bào hủy xương chuột được tiến hành theo phương pháp Ví dụ 9. Nghĩa là, các tế bào không bám dính tủy xương chuột được tạo ra từ đó được điều chế ở 1,5 x 10^5 tế bào/ml trong môi trường α-MEM chứa FBS 10% và 10 ng/ml M-CSF (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.), và chế phẩm tế bào tạo thành được nhân lên trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng trong lượng 200 µl và các tế bào được nuôi cấy trong 2 ngày trong buồng ủ CO_2 . Dung dịch nuôi cấy cũ trong đĩa 96 giếng được loại, và 100 µl môi trường MEM-α được bổ sung vào mỗi giếng, 100 µl môi trường MEM-α chứa FBS 10% mà RANKL (RANKL, được sản xuất bởi Peprotech, Inc.) và M-CSF của người được bổ sung vào để thu nồng độ cuối lần lượt là 20 ng/ml và 10 ng/ml. Đối với dung dịch nuôi cấy tế bào, kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột #8A1 hoặc #32A1 được tạo ra trong Ví dụ 6 được bổ sung ở nồng độ từ 31 đến 1000 ng/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong thêm 3 ngày trong buồng ủ CO_2 . Sau khi hoàn thành nuôi cấy, hoạt tính của phosphataza axit kháng tartrat (tartrate-resistant acid phosphatase) (TRAP) của các tế bào hủy xương được hình thành được đo by phương pháp được mô tả trong Ví dụ 9. Sau khi ngừng phản ứng enzym, sự hút bám của mỗi giếng ở 405 nm được xác định, và sự xác định thu được này được sử dụng là chỉ số của hoạt tính TRAP. Các kết quả được thể hiện trong Fig.22. Trong trường hợp của kháng thể #8A1, sự ức chế phụ thuộc liều dùng của hoạt tính TRAP được quan sát ở nồng độ 63 ng/ml hoặc cao hơn, và trong trường hợp của kháng thể #32A1, sự ức chế phụ thuộc liều dùng của hoạt tính TRAP được quan sát ở nồng độ 31 ng/ml hoặc cao hơn. Từ các kết quả này, đã thể hiện rằng các kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột #8A1 và #32A1 ức chế mạnh sự hình thành tế bào hủy xương chuột theo cùng cách như sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt, và hoạt tính *in vitro* của sự ức chế sự hình thành tế bào hủy xương chuột của kháng thể #32A1 cao hơn hoạt tính của kháng thể #8A1.

Ví dụ 28

Thiết kế kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (2)

a) Thiết kế phiên bản được làm tương thích với người của #32A1

a)-i) Thiết kế trình tự axit amin của #32A1 được làm tương thích với người

Kháng thể #32A1 được làm tương thích với người được tạo ra theo phương pháp nhìn chung đã biết là sự ghép CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Đối với các quy định của các vùng CDR, các quy định Kabat (SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST VOL. I, FIFTH EDTION (1991)) được sử dụng cho tất cả ngoại trừ đối với CDRH2. Đối với CDRH2, trình tự của chúng được tạo ra ngắn hơn năm gốc ở đầu C so với quy định Kabat sử dụng là quy định của riêng nó. Trong chuỗi nặng chứa CDRH2 được xác định từ đó, trình tự CDR thu được từ chuột được tạo ra ngắn hơn và nhiều hơn trình tự khung được hợp nhất, và do đó, khi nó được cung cấp đến người, nó có thể được nhận ra ít hơn nhiều là kháng nguyên khác loại. Kháng thể nhận được lựa chọn dựa trên mức độ tương đồng axit amin trong vùng khung. Trình tự của vùng khung của #32A1 được so sánh với tất cả các khung của người trong cơ sở dữ liệu Kabat (Nuc. Acid Res. 29, 205-206 (2001)) liên quan đến các trình tự axit amin kháng thể. Kết quả là, đối với chuỗi L, GF4/1,1'CL được lựa chọn là phần tử nhận dựa trên mức độ tương đồng trình tự 71% trong vùng khung. Đối với chuỗi H, M37GO37'CL được lựa chọn là phần tử nhận dựa trên mức độ tương đồng trình tự 73% trong vùng khung. Trong phạm vi của chuỗi L, các gốc axit amin trong vùng khung của GF4/1,1'CL, và trong phạm vi của chuỗi H, các gốc axit amin trong vùng khung của M37GO37'CL được sắp sếp với các gốc axit amin của #32A1, và các vị trí khi các axit amin khác được sử dụng được xác định. Các vị trí của các gốc này được phân tích sử dụng mô hình không gian ba chiều của #32A1 được cấu trúc trong a)-i) của Ví dụ 22. Tiếp theo, các gốc cho được ghép trên nhân tố nhận

được lựa chọn theo quan điểm được đề xuất bởi Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Bằng cách chuyển một số gốc cho được chọn lọc đến kháng thể tiếp nhận, các trình tự #32A1 được làm tương thích với người được cấu trúc được mô tả trong Các ví dụ sau.

a)-ii) Sự được làm tương thích với người chuỗi nặng #32A1

a)-ii)-i) Chuỗi nặng typ h#32A1-H1-1:

Chuỗi nặng 32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 23 (isoleuxin), 24 (leuxin), 26 (threonin), 32 (lyzin), 43 (threonin), 61 (axit glutamic), 83 (axit glutamic), 85 (leuxin), 86 (axit glutamic), 89 (valin), 95 (axit aspartic), 96 (xerin), 97 (axit glutamic), 98 (xerin), 100 (valin), 104 (valin), 105 (xerin), 114 (isoleuxin), 118 (threonin), 134 (valin), 135 (methionin), và 140 (leuxin) của 32A1 nêu trong SEQ ID NO: 28 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng leuxin, valin, xerin, glutamin, alanin, glyxin, alanin, valin, lyzin, phenylalanin, asparagin, alanin, lyzin, asparagin, leuxin, methionin, asparagin, valin, alanin, threonin, leuxin, và xerin, được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-H1-1".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-H1-1 nêu trong SEQ ID NO: 99 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 99, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 141 đến 466 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 99 nêu trong SEQ ID NO: 98 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 98, trình tự bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 421 đến 1398 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 98 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 99 cũng

được thể hiện trong Fig.54.

a)-iii) Sự được làm tương thích với người chuỗi nhẹ #32A1

a)-iii)-i) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-15:

Chuỗi nhẹ 32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 21 (axit aspartic), 23 (valin), 24 (leuxin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 31 (alanin), 32 (valin), 34 (leuxin), 36 (glutamin), 40 (isoleuxin), 66 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 102 (glutamin), 103 (alanin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 110 (phenylalanin), 122 (alanin), 123 (glyxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) của 32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit glutamic, leuxin, methionin, threonin, xerin, leuxin, prolin, axit glutamic, leuxin, alanin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, prolin, axit glutamic, phenylalanin, leuxin, tyrosine, glyxin, glutamin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-15".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-15 nêu trong SEQ ID NO: 103 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 103, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 103 nêu trong SEQ ID NO: 102 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 102, trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 102 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 103 cũng được thể hiện trong Fig.56.

a)-iii)-ii) Chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-16:

Chuỗi nhẹ 32A1 được làm tương thích với người được thiết kế bằng cách thay thế axit amin các số 21 (axit aspartic), 23 (valin), 24 (leuxin), giữa 29 và 30 (nghĩa là chèn gốc bị mất từ khung đọc của chuột), 31 (alanin), 32 (valin), 34 (leuxin), 36 (glutamin), 40 (isoleuxin), 66 (glutamin), 99 (asparagin), 100 (prolin), 101 (valin), 102 (glutamin), 103 (alanin), 104 (axit aspartic), 106 (isoleuxin), 108 (threonin), 123 (glyxin), 127 (leuxin), 129 (leuxin), 130 (arginin), và 132 (alanin) of 32A1 nêu trong SEQ ID NO: 30 trong phần danh mục trình tự lần lượt bằng axit glutamic, leuxin, methionin, threonin, xerin, leuxin, prolin, axit glutamic, leuxin, alanin, xerin, xerin, leuxin, axit glutamic, prolin, axit glutamic, phenylalanin, leuxin, glutamin, valin, isoleuxin, lyzin, và threonin, được đặt tên là "chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-16".

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-16 nêu trong SEQ ID NO: 105 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 20 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 105, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 133 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 134 đến 238 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 105 nêu trong SEQ ID NO: 104 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 60 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 104, trình tự bao gồm các nucleotit từ 61 đến 399 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 400 đến 714 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nhẹ. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 104 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 105 cũng được thể hiện trong Fig.57.

b) Sự sản xuất gen của kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

b)-i) Sự xây dựng vectơ biểu hện chuỗi nặng của người liên hợp pEG2

Đoạn ADN chứa trình tự ADN mã hóa các axit amin của trình tự tín hiệu và vùng bảo toàn của IgG2 người nêu trong SEQ ID NO: 106 được tổng hợp (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Artificial gene Synthesis Service), và được tiêu hủy bằng các enzym cắt hạn chế NheI và PmeI, qua đó đoạn ADN khoảng 1100 bp được thu. Đoạn ADN này được gắn vào đoạn ADN khoảng 6200 bp thu được bằng cách phân hủy pEF1/FCCU-1 bằng NheI và PmeI và loại đoạn ADN khoảng 1100 bp, qua đó vectơ biểu hện chuỗi nặng kháng thể được làm tương thích với người (typ hIgG2) liên hợp pEG2 được tạo ra.

b)-ii) Sự xây dựng vectơ biểu hện chuỗi nặng h#32A1-H1-1

Đoạn ADN thu được bằng cách tổng hợp ADN chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng h#32A1-H1-1 được dung hợp với tín hiệu kích thích bài tiết được thể hiện bằng axit amin các số từ 1 đến 140 của SEQ ID NO: 99 trong phần danh mục trình tự (Invitrogen), và tách ADN bằng enzym cắt hạn chế BlpI được chèn vào trong vectơ biểu hện chuỗi nặng kháng thể được làm tương thích với người (typ hIgG2) liên hợp (pEG2) ở vị trí được tách bằng enzym cắt hạn chế BlpI, qua đó vectơ biểu hện chuỗi nặng h#32A1-H1-1 được tạo ra. Vectơ biểu hện thu được từ đó được đặt tên là "pEG2/h#32A1-H1-1".

b)-iii) Sự xây dựng vectơ biểu hện chuỗi nặng h#32A1-H5

Chuỗi nặng 32A1 được làm tương thích với người trong đó trình tự tín hiệu và vùng bảo toàn của chuỗi nặng typ h#32A1-T5H được thiết kế trong b)-iv) của Ví dụ 22 được thay đổi thành ở trong typ IgG2 được đặt tên là "chuỗi nặng typ h#32A1-H5".

Trình tự axit amin của chuỗi nặng typ h#32A1-H5 nêu trong SEQ ID NO: 101 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 1 đến 19 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 101, trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 20 đến 140 của chúng, và trình tự bao gồm các gốc axit amin từ 141 đến 466 của chúng tương ứng lần lượt với trình tự tín hiệu, vùng biến đổi chuỗi nặng,

và vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 101 nêu trong SEQ ID NO: 100 trong phần danh mục trình tự. Trình tự bao gồm các nucleotit từ 1 đến 57 của trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 100, trình tự bao gồm các nucleotit từ 58 đến 420 của chúng, và trình tự bao gồm các nucleotit từ 421 đến 1398 của chúng lần lượt mã hóa trình tự tín hiệu, trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng, và trình tự vùng bảo toàn chuỗi nặng. Trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 100 và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 101 cũng được thể hiện trong Fig.55.

Đoạn ADN thu được bằng cách tách pEF1/FCCU/h#32A1-T5H được tạo ra trong Ví dụ 23 bằng enzym cắt hạn chế BlpI được chèn vào trong vectơ biểu hện chuỗi nặng kháng thể được làm tương thích với người (typ hIgG2) liên hợp (pEG2) ở vị trí được tách bằng enzym cắt hạn chế BlpI, qua đó vectơ biểu hện chuỗi nặng h#32A1-H5 được tạo ra. Vectơ biểu hện thu được từ đó được đặt tên là "pEG2/h#32A1-H5".

b)-iv) Sự xây dựng các vectơ biểu hện chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-15 và h#32A1-L2-16

Các ADN mỗi chúng chứa gen mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-15 hoặc h#32A1-L2-16 được dung hợp với tín hiệu kích thích bài tiết được thể hiện bằng axit amin các số từ 1 đến 133 của SEQ ID NO: 103 trong phần danh mục trình tự hoặc axit amin các số từ 1 đến 133 của SEQ ID NO: 105 được tổng hợp (Invitrogen), và các vectơ biểu hện chuỗi nhẹ typ h#32A1-L2-15 và h#32A1-L2-16 được cấu trúc theo cùng cách như trong Ví dụ 23. Các vectơ biểu hện thu được từ đó được đặt tên lần lượt là "pEF6KCL/h#32A1-L2-15" và "pEF6KCL/h#32A1-L2-16".

c) Sự điều chế kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột

c)-i) Sự sản xuất kháng thể được làm tương thích với người

1,2 x 10^9 tế bào của các tế bào FreeStyle 293F (Invitrogen) trong pha sinh trưởng logarit được nhân lên trong 1,2 L môi trường biểu hiện FreeStyle 293 sạch (Invitrogen) và được cho nuôi cấy lắc ở 37°C trong buồng ủ CO_2 8% ở 90 vòng/phút trong 1 giờ. 3,6 mg polyetylenimin (Polyscience, #24765) được hòa tan trong 20 ml môi trường Opti-Pro SFM (Invitrogen). Tiếp theo, plasmit biểu hiện chuỗi H (0,4 mg) và plasmit biểu hiện chuỗi L (0,8 mg) được điều chế sử dụng Kit plasmit PureLink HiPure (PureLink HiPure Plasmid Kit) (Invitrogen, Inc.) được tạo huyền phù trong 20 ml môi trường Opti-Pro SFM. Tiếp theo, 20 ml chất lỏng hỗn hợp các plasmit biểu hiện /Opti-Pro SFM được bổ sung vào 20 ml chất lỏng hỗn hợp polyetylenimin/Opti-Pro SFM, và hỗn hợp tạo thành được khuấy đều và sau đó được để yên trong 5 phút. Sau đó, hỗn hợp này được bổ sung vào các tế bào FreeStyle 293F, và nuôi cấy lắc được tiến hành trong 7 ngày ở 37°C trong buồng ủ CO_2 8% ở 90 vòng/phút. Nổi nuôi cấy tạo thành được lọc qua màng lọc con nhộng dùng một lần (Disposable Capsule Filter) (Advantec #CCS-045-E1H).

Kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T5L và pEG2/h#32A1-H5 được đặt tên là "h#32A1-H5/L5"; kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-T5L và pEG2/h#32A1-H1-1 được đặt tên là "h#32A1-H1-1/L5"; kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-L2-15 và pEG2/h#32A1-H1-1 được đặt tên là "h#32A1-H1-1/L2-15"; và kháng thể được làm tương thích với người của #32A1 thu được bằng sự kết hợp pEF6KCL/h#32A1-L2-16 và pEG2/h#32A1-H1-1 được đặt tên là "h#32A1-H1-1/L2-16".

c)-ii) Sự tinh chế kháng thể được làm tương thích với người

Dịch nổi nuôi cấy được thu trong c)-i) ở trên được tinh sạch bằng quy trình hai bước bao gồm sắc ký ái lực rProtein A (ở từ 4 đến 6°C) và gồm

hydroxyapatit (ở nhiệt độ phòng). Bước thay thế đệm sau khi tinh sạch bằng sắc ký ái lực rProtein A và sau khi tinh sạch bằng gốm hydroxyapatit được tiến hành ở nhiệt độ phòng. Đầu tiên, từ 1100 đến 1200 ml dịch nổi nuôi cấy được cho qua MabSelect SuRe (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience Co., Ltd., 2 x 1 ml các cột HiTrap trong các loạt) được làm cân bằng bằng PBS. Sau khi dung dịch nuôi cấy được rót qua cột, cột được rửa bằng từ 15 đến 30 ml PBS. Tiếp theo, phép tách rửa được tiến hành bằng dung dịch arginin hydroclorit 2 M (pH 4,0), và đoạn gen chứa kháng thể được thu. Đoạn này được cho qua cọt khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience Co., Ltd., 2 x 5 ml các cột khử muối HiTrap trong các loạt) và chất lỏng được thay thế bằng đệm chứa natri phosphate 5 mM, MES 50 mM, và NaCl 20 mM ở pH 6,5. Hơn nữa, dung dịch kháng thể được cho thay thế bằng đệm được cho qua cột gốm hydroxyapatit (Japan Bio-Rad Laboratories, Inc., cột Bio-Scale CHT2-1 hydroxyapatit (thể tích 2 ml)) được làm cân bằng bằng đệm chứa NaPi 5 mM, MES 50 mM, và NaCl 20 mM ở pH 6,5. Tiếp theo, sự tách rwae gradient nồng độ tuyến tính bằng natri clorit được tiến hành, và đoạn gen chứa kháng thể được thu. Đoạn này được cho qua cột khử muối (được sản xuất bởi GE Healthcare Bioscience Co., Ltd., 2 x 5 ml các cột khử mỗi HiTrap trong các loạt) và chất lỏng được thay thế bằng CBS (các đệm xitrat 10 mM chứa natri clorit 140 mM, pH 6,0). Cuối cùng, dung dịch tạo thành được cô đặc sử dụng Thiết bị lọc UF li tâm (Centrifugal UF Filter Device) VIVASPIN 20(trọng lượng phân tử đoạn: 30 K, Sartorius Co., Ltd., ở 4°C), nồng độ của IgG được điều chỉnh đến 1,0 mg/ml hoặc hơn, và dung dịch thu được từ đó được sử dụng là mẫu được tinh sạch. Các thể tích của các mẫu được tinh sạch tương ứng là như sau: h#32A1-H1-1/L5: 2,2 ml, h#32A1-H5/L5: 1,8 ml, h#32A1-H1-1/L2-16: 6,0 ml, và h#32A1-H1-1/L2-15: 2,2 ml.

Ví dụ 29

Sự đánh giá hoạt tính sinh học của kháng thể được làm tương thích với người

của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột dựa trên sự kiểm tra đối với sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt

Hiệu quả ức chế trên sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt được thể hiện bằng các kháng thể được làm tương thích với người được thu trong Các ví dụ 24 và 28 được đánh giá bằng phương pháp cải biến một phần được mô tả trong Ví dụ 9. Các tế bào không bám của tủy xương chuột nhắt được tạo ra bằng phương pháp Ví dụ 8 được điều chế ở 1,5 x 10^5 tế bào/ml trong môi trường α-MEM chứa FBS 10% và M-CSF 10 ng/ml (được sản xuất bởi R&D Systems, Inc.), chế phẩm tế bào tạo thành được nhân lên trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng trong lượng 200 µl và các tế bào được nuôi cấy trong 2 ngày trong buồng ủ CO_2 . Dung dịch nuôi cấy cũ trong đĩa 96 giếng được loại, và 100 µl môi trường MEM-α được bổ sung vào mỗi giếng, 100 µl môi trường MEM-α chứa FBS 10% mà RANKL (RANKL, được sản xuất bởi Peprotech, Inc.) và M-CSF của người được bổ sung vào để thu nồng độ cuối lần lượt là 20 ng/ml và 10 ng/ml. Đối với dung dịch nuôi cấy tế bào, kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) được tạo ra trong Ví dụ 6 hoặc mỗi loại của sáu loại kháng thể #32A1 (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5, và h#32A1-T6) được tạo ra trong Ví dụ 24 được bổ sung ở nồng độ từ 3 đến 100 ng/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong thêm 3 ngày trong buồng ủ CO_2 . Sau khi hoàn thành nuôi cấy, hoạt tính của phosphataza axit kháng tartrat (tartrate-resistant acid phosphatase) (TRAP) của các tế bào hủy xương được hình thành được đo quy trình sau. Dung dịch nuôi cấy trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng được loại bằng sự hút bám, và 50 µl đệm natri xitrat 50 mM (pH 6,1) chứa Triton 1% X-100 được bổ sung vào mỗi giếng. Tiếp theo, đĩa cấy được lắc trong 5 phút trên máy lắc đĩa để dung giải các tế bào. Đối với mỗi giếng, 50 µl dung dịch chất nền (đệm natri xitrat 50 mM (pH 6,1) chứa p-nitrophenyl phosphat 5 mg/ml và natri tartrat 0,46%) được bổ sung, và đĩa cấy được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Sau sự ủ, 50 µl dung dịch natri hydroxit 1 N được

bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng để ngừng phản ứng enzym. Sau khi ngừng phản ứng enzym, sự hút bám của mỗi giếng ở 405 nm được xác định, và sự xác định thu được này được sử dụng là chỉ số của hoạt tính TRAP. Các kết quả được thể hiện trong các Fig.44 và 45. Hơn nữa, đối với kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) được tạo ra trong Ví dụ 6, kháng thể khảm của người của kháng thể #32A1 được tạo ra trong Ví dụ 19, và 4 loại kháng thể #32A1 (h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, và h#32A1-H1-1/L2-15) được tạo ra trong Ví dụ 28, hoạt tính sinh học được đánh giá bằng cùng phương pháp như trong kiểm tra này, và các kết quả được thể hiện trong các Fig.46 và 47. Trong tất cả các trường hợp của 10 typ kháng thể #32A1 (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5, h#32A1-T6, h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, và h#32A1-H1-1/L2-15) mà hoạt tính được đánh giá, hoạt tính ức chế sự hình thành tế bào hủy xương về cơ bản có thể so sánh với của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) hoặc kháng thể khảm của người của kháng thể #32A1 được quan sát.

Ví dụ 30

Hiệu quả của sự bổ sung kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột trên hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (Đánh giá sử dụng đĩa phủ collagen)

Các tế bào tiền tế bào hủy xương người bình thường (Các tế bào tiền tế bào hủy xương tự nhiên của người bình thường, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. 2T-110) được nhân lên trong đĩa nuôi cất tế bào OsteoLyse 96 giếng (được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PA-1500) ở 1×10^4 tế bào/giếng theo quy trình kèm theo các tế bào. Là môi trường, môi trường thiết yếu tối thiểu đối với các tế bào tiền tế bào hủy xương (OPBM, được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-8201) được bổ sung bằng thiết bị bổ sung

OPGM (được đặt mua từ Sanko Junyaku Co., Ltd., Cat. No. PT-9501) chứa huyết thanh nhau thai bò (nồng độ cuối: 10%), RANKL của người (nồng độ cuối: 63,8 ng/ml), M-CSF của người (nồng độ cuối: 33 ng/ml), và tương tự được sử dụng. Đối với nổi nuôi cấy tạo thành, mỗi kháng thể của kháng thể đơn dòng kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột (kháng thể #32A1) được tạo ra trong Ví dụ 6, kháng thể khảm của người của kháng thể #32A1 được tạo ra trong Ví dụ 19, và 10 typ của các kháng thể #32A1 (h#32A1-T1, h#32A1-T2, h#32A1-T3, h#32A1-T4, h#32A1-T5, h#32A1-T6, h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L2-16, và h#32A1-H1-1/L2-15) được tạo ra trong Các ví dụ 24 và 28 được bổ sung ở nồng độ cuối 4, 20, 100, hoặc 500 ng/ml, và các tế bào được nuôi cấy trong 5 ngày trong buồng ủ CO_2 . 10 µl phần chia của dịch nổi nuôi cấy được thu, 200 µl chất phản ứng giải phóng huỳnh quang (Fluorophore Releasing Reagent) được bao gồm trong Kit phân tích OsteoLyse (OsteoLyse Assay Kit) được bổ sung vào đó, và bằng cách sử dụng đầu đọc đĩa huỳnh quang (ARVO MX, được sản xuất bởi Perkin Elmer Inc.), phương pháp xác định hàm lượng flo theo thời gian (time-resolved fluorometry) (huỳnh quang kế phát quang liên quan đến thời gian (time-resolved fluorescence fluorometer)) (Mức thấp nhất: 340 nm, Mức cao nhất: 615 nm) phù hợp với việc xác định sự phát quang sử dụng ơ-rô-pi (Eu) được tiến hành, qua đó lượng các đoạn collagen huỳnh quang tự do được giải phóng trong dịch nổi nuôi cấy được xác định (Figs. 48 và 49). Kết quả là, lượng các đoạn collagen huỳnh quang được tăng bằng sự bổ sung RANKL bị giảm bằng sự bổ sung kháng thể #32A1 của chuột hoặc kháng thể #32A1 khảm của người theo cách phụ thuộc nồng độ. Theo cùng cách, cùng bằng tất cả 10 typ được kiểm tra của các kháng thể #32A1 được làm tương thích với người, sự ức chế phụ thuộc nồng độ được quan sát. Từ kết quả này, đã bộc lộ rằng hoạt tính tái hấp thu xương của các tế bào hủy xương người bị ức chế bởi các kháng thể #32A1 được làm tương thích với người liên kết đặc hiệu với protein Siglec-15.

Ví dụ 31

Đánh giá sinh học kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột sử dụng các con chuột bị cắt bỏ buồng trứng

Hiệu quả ức chế trên sự giảm mật độ khoáng xương trong các con chuột bị cắt bỏ buồng trứng biểu hiện bằng các kháng thể được làm tương thích với người được thu trong Các ví dụ 24 và 28 có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 15.

Ví dụ 32

Sự đánh giá hoạt tính sinh học của kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể đơn dòng #32A1 kháng Siglec-15 chuột nhắt của chuột dựa trên sự kiểm tra đối với sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt by sự kích thích bằng TNFα

Hiệu quả ức chế trên sự hình thành tế bào hủy xương của chuột nhắt by sự kích thích bằng TNFα biểu hiện bằng các kháng thể được làm tương thích với người được thu trong Các ví dụ 24 và 28 có thể được đánh giá bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 26.

Ví dụ 33

Xác định tính ổn định nhiệt của kháng thể được làm tương thích với người sử dụng phép đo nhiệt lượng quét khác nhau (differential scanning calorimetry - DSC)

Đối với h#32A1-H5/L5, h#32A1-H1-1/L5, h#32A1-H1-1/L2-15, và h#32A1-H1-1/L2-16, tính ổn định nhiệt được xác định. Mỗi mẫu của các mẫu này được điều chế ở nồng độ 0,5 mg/ml (trong dung dịch CBS), và 400 µl phần chia của chúng được sử dụng là dung dịch mẫu đối với sự xác định DSC. Các điều kiện cho sự xác định DSC được đặt như sau. Nghĩa là, nhiệt độ ban đầu được đặt đến 20°C, nhiệt độ cuối được đặt đến 100°C, tỉ lệ tăng nhiệt độ được

đặt đến 60°C/giờ, và thời gian lọc được đặt đến 10 giây. Dung dịch tham khảo, CBS được sử dụng. Là dụng cụ để đo DSC, bục VP-Capillary DSC được sản xuất bởi MicroCal Inc. USA được sử dụng. Đường chuẩn (đường cong quét thu được bằng cách đổ đầy dung dịch tham khảo cũng trong tế bào mẫu) được từ từ đường cong quét thu được đối với mỗi dung dịch mẫu, qua đó sự điều chỉnh đúng đường cơ bản được tiến hành. Fig.50 thể hiện ảnh ghi nhiệt đối với h#32A1-H5/L5, Fig.51 thể hiện ảnh ghi nhiệt đối với h#32A1-H1-1/L5, Fig.52 thể hiện ảnh ghi nhiệt đối với h#32A1-H1-1/L2-15, và Fig.53 thể hiện ảnh ghi nhiệt đối với h#32A1-H1-1/L2-16. Khi giá trị đỉnh chóp trong mỗi ảnh ghi nhiệt nhận được là nhiệt độ điểm giữa biến tính nhiệt (midpoint temperature - Tm) trong vùng Fab, giá trị Tm của h#32A1-H5/L5 là 81,2°C, giá trị Tm của h#32A1-H1-1/L5 là 84,1°C, giá trị Tm của h#32A1-H1-1/L2-15 là 80,0°C, và giá trị Tm của h#32A1-H1-1/L2-16 (IgG2) là 77,9°C.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Kháng thể kháng Siglec-15 khảm hoặc được làm tương thích với người của sáng chế có khả năng ức chế hoạt tính phân hóa tế bào hủy xương hoặc tái hấp thu xương, và dược phẩm chứa kháng thể kháng Siglec-15 có thể là chất điều trị hoặc ngăn ngừa đối với bệnh chuyển hóa xương bất thường.

Số truy nhập

FERM BP-10999

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này liên kết với polypeptit bao gồm các gốc axit amin từ 39 đến 165 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và ức chế sự hình thành tế bào hủy xương và sự tái hấp thu xương tế bào hủy xương tùy ý, trong đó kháng thể trong ống nghiệm ức chế sự hình thành tế bào hủy xương ở nồng độ bằng hoặc nhỏ hơn 1µg/ml, và trong đó kháng thể này chứa:

trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi có CDRH1, CDRH2, và CDRH3, trong đó CDRH1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44, CDRH2 chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45 và SEQ ID NO: 97, và CDRH3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46; và

trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi có CDRL1, CDRL2, và CDRL3, trong đó CDRL1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47, CDRL2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48, và CDRL3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49.

2. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 1, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 và trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các gốc axit amin từ 21 đến 132 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43.

3. Đoạn chức năng của kháng thể theo điểm 1, trong đó đoạn chức năng này được chọn từ nhóm bao gồm Fab, F(ab')2, Fab' và Fv.

4. Kháng thể theo điểm 1, khác biệt ở chỗ kháng thể này là scFv.

5. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 1, khác biệt ở chỗ kháng thể này là kháng thể thể khảm.

6. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 5, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng

chứa các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 237 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 43.

7. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 1, khác biệt ở chỗ kháng thể này được làm tương thích với người.

8. Kháng thể theo điểm 6, trong đó chuỗi nặng có vùng bảo toàn của chuỗi nặng G2 globulin miễn dịch của người và chuỗi nhẹ có vùng bảo toàn của chuỗi nhẹ κ globulin miễn dịch của người.

9. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

a1) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51;

a2) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53;

a3) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55;

a4) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57;

a5) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59;

a6) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99;

a7) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101;

a8) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 95% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ a1) đến a7);

a9) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 99% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ a1) đến a7); và

a10) trình tự axit amin có sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung từ một đến vài gốc axit amin trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ a1) đến a7); và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự axit amin sau:

b1) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61;

b2) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63;

b3) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65;

b4) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 132 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67;

b5) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69;

b6) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71;

b7) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103;

b8) trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105;

b9) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 95% so với trình tự bất

20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 132 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67.

14. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

15. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71.

16. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

17. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

18. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103.

19. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105.

20. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61.

21. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63.

22. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65.

kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b8);

b10) trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 99% so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b8); và

b11) trình tự axit amin có sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung từ một đến vài gốc axit amin trong một trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được chọn từ b1) đến b8).

10. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61.

11. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 53 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 63.

12. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 20 đến 140 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ 21 đến 133 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65.

13. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin chứa các gốc axit amin từ

23. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 237 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67.

24. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 57 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

25. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 470 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71.

26. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

27. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69.

28. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng

chứa các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103.

29. Kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này theo điểm 9, khác biệt ở chỗ kháng thể hoặc đoạn chức năng của kháng thể này chứa trình tự chuỗi nặng chứa các gốc axit amin từ 20 đến 466 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 99 và trình tự chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin từ 21 đến 238 của trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105.

30. Dược phẩm để điều trị và/hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường, khác biệt ở chỗ dược phẩm này chứa ít nhất một kháng thể trong số các kháng thể hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 29 và ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm các bisphosphonat, vitamin D3 hoạt tính, canxitonin và các dẫn xuất của nó, các hormon như estradiol, các SERM (selective estrogen receptor modulators - các chất điều biến thụ thể estrogen có chọn lọc), ipriflavon, vitamin K_2 (menatetrenon), các chế phẩm canxi, PTH (parathyroid hormone - hormon tuyến cận giáp), các chất kháng viêm không steroit, các thụ thể TNF hòa tan, các kháng thể kháng TNF-α hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các kháng thể kháng PTHrP (parathyroid hormone-related protein - protein liên quan đến hormon tuyến cận giáp) hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các chất đối kháng thụ thể IL-1, các kháng thể kháng thụ thể IL-6 hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này, các kháng thể kháng RANKL hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này và OCIF (osteoclastogenesis – yếu tố ức chế sự sản sinh tế bào hủy xương).

31. Dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa sự chuyển hóa xương bất thường, khác biệt ở chỗ dược phẩm này chứa ít nhất một kháng thể trong số các kháng thể hoặc các đoạn chức năng của các kháng thể này theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 29.

32. Polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 6, và 9 đến 29.

33. Polynucleotit theo điểm 32, khác biệt ở chỗ polynucleotit này chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 40 và trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 396 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 42.

34. Polynucleotit theo điểm 33, khác biệt ở chỗ polynucleotit này chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 40 và trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 711 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 42.

35. Polynucleotit theo điểm 33, khác biệt ở chỗ polynucleotit này chứa:

(a) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nucleotit sau:

a1) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50;

a2) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52;

a3) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54;

a4) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 56;

a5) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58;

a6) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98;

a7) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 100;

a8) trình tự nucleotit của polynucleotit lai với polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với một trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được chọn từ a1) đến a7) dưới các điều kiện nghiêm ngặt; và

a9) trình tự nucleotit có sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung từ một đến vài nucleotit trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được chọn từ a1) đến a7); và

(b) polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nucleotit sau:

b1) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 60;

b2) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62;

b3) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 64;

b4) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 396 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 66;

b5) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68;

b6) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70;

b7) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 102;

b8) trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 104;

b9) trình tự nucleotit của polynucleotit lai với polynucleotit chứa trình tự nucleotit bổ sung với một trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được chọn từ b1) đến b8) trong điều kiện nghiêm ngặt; và

b10) trình tự nucleotit có sự thay thế, sự loại bỏ, hoặc sự bổ sung từ một đến vài nucleotit trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit được chọn từ b1) đến b8).

36. Polynucleotit theo điểm 35, khác biệt ở chỗ polynucleotit này chứa polynucleotit chứa:

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 60; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 64; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 396 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 66; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 56, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 100, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 102; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 420 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 399 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 104; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 50, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 60; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 52, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 62; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 64; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 54, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 711 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 66; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 56, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1410 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 58, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 70; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 100, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 68; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 102; hoặc

trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 58 đến 1398 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 98, và polynucleotit chứa trình tự nucleotit chứa các nucleotit từ 61 đến 714 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 104.

37. Vectơ biểu hiện, trong đó vectơ biểu hiện này chứa một polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit theo các điểm từ 32 đến 36.

38. Tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 6, và từ 9 đến 29, trong đó tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể này chứa một polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit theo các điểm từ 32 đến 36.

39. Tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 6, và từ 9 đến 29, trong đó tế bào chủ được biến nạp để biểu hiện kháng thể này chứa vectơ theo điểm 37.

40. Phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2, 6, và 9 đến 29, trong đó phương pháp sản xuất kháng thể này có bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 38 hoặc 39, và tinh chế kháng thể từ sản phẩm nuôi cấy tạo thành.

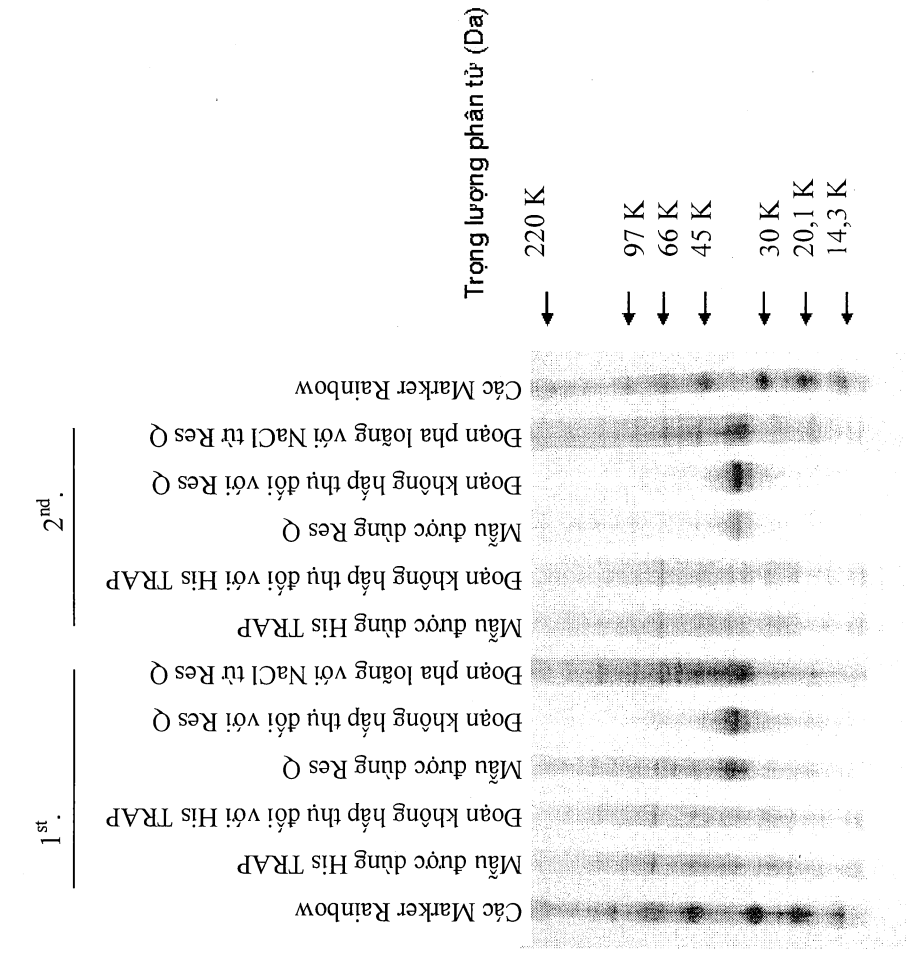

Trọng lượng phân tử (Da)
220 K
97 K
66 K
45 K
30 K
20,1 K
14,3 K
1st.
2nd.
Các Marker Rainbow
Mẫu được dùng His TRAP
Đoạn không hấp thụ đối với His TRAP
Mẫu được dùng Res Q
Đoạn không hấp thụ đối với Res Q
Đoạn pha loãng với NaCl từ Res Q
Mẫu được dùng His TRAP
Đoạn không hấp thụ đối với His TRAP
Mẫu được dùng Res Q
Đoạn không hấp thụ đối với Res Q
Đoạn pha loãng với NaCl từ Res Q
Các Marker Rainbow

Fig.1

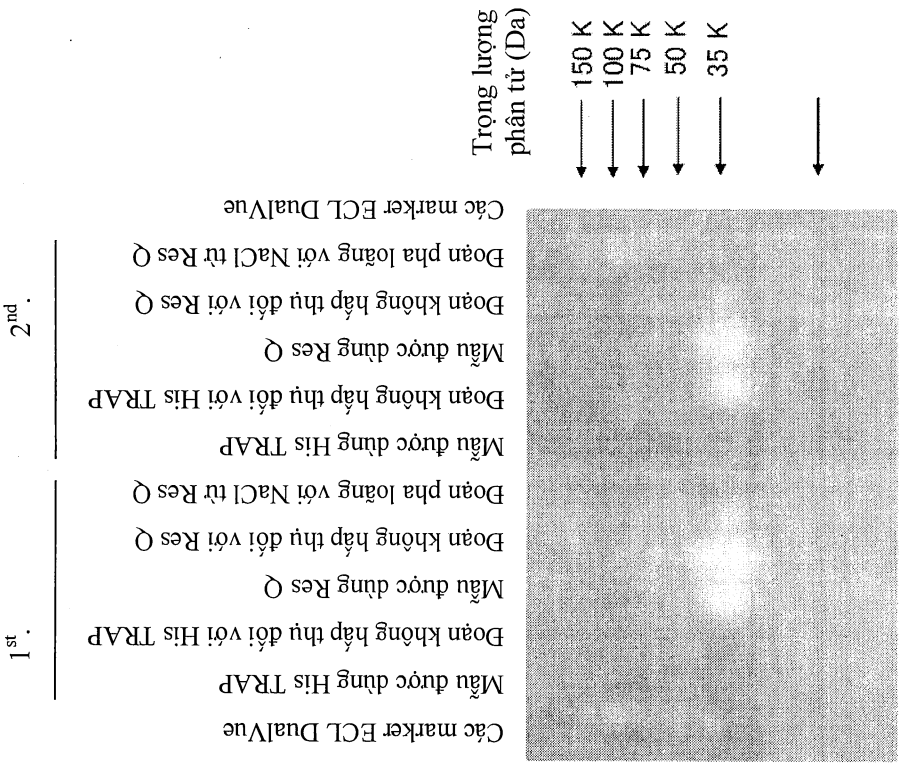

Trọng lượng phân tử (Da)
150 K
100 K
75 K
50 K
35 K
1st.
Các marker ECL DualVue
Mẫu được dùng His TRAP
Đoạn không hấp thụ đối với His TRAP
Mẫu được dùng Res Q
Đoạn không hấp thụ đối với Res Q
Đoạn pha loãng với NaCl từ Res Q
2nd.
Mẫu được dùng His TRAP
Đoạn không hấp thụ đối với His TRAP
Mẫu được dùng Res Q
Đoạn không hấp thụ đối với Res Q
Đoạn pha loãng với NaCl từ Res Q
Các marker ECL DualVue

Fig.2

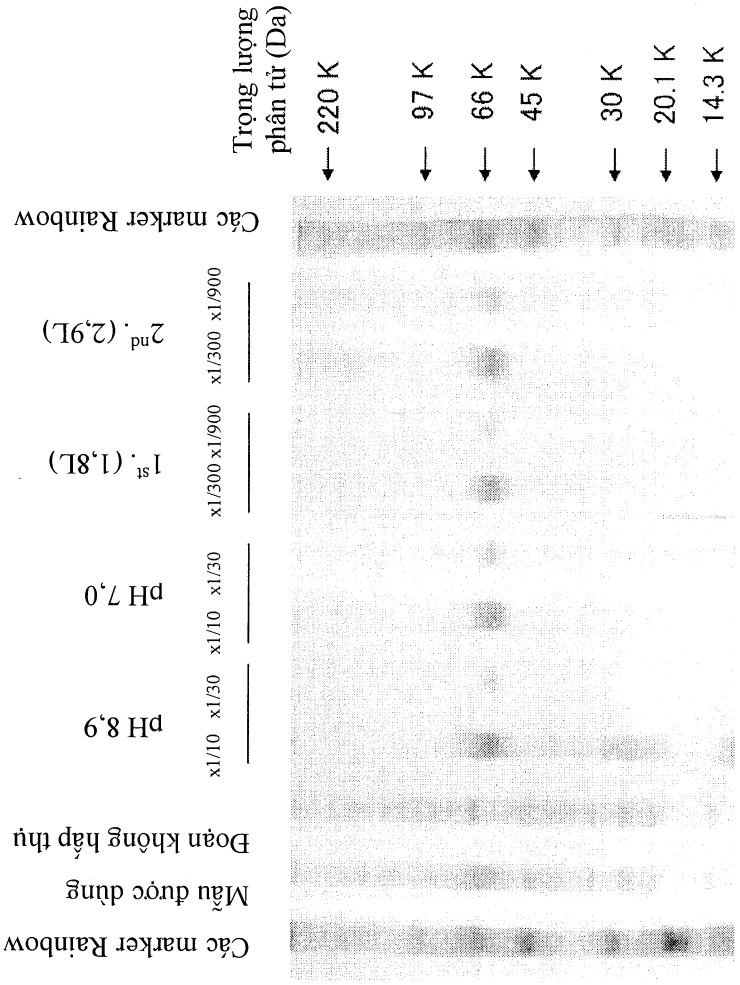

Trọng lượng phân tử (Da)
220 K
97 K
66 K
45 K
30 K
20.1 K
14.3 K
Các marker Rainbow
Mẫu được dùng
Đoạn không hấp thụ
pH 8,9
x1/10 x1/30
pH 7,0
x1/10 x1/30
1st. (1,8L)
x1/300 x1/900
2nd. (2,9L)
x1/300 x1/900
Các marker Rainbow

Fig.3

Fig.4

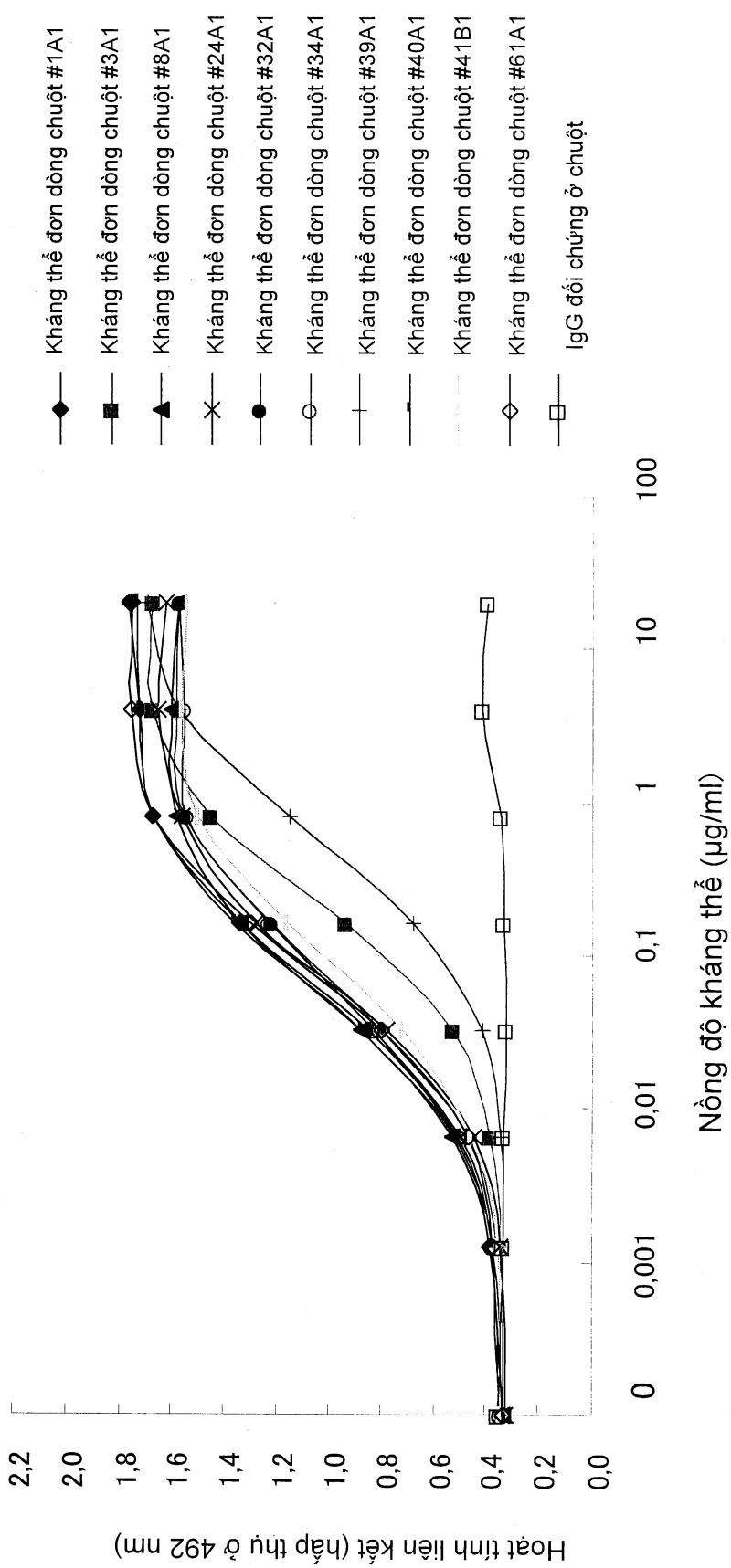

Kháng thể đơn dòng chuột #1A1
Kháng thể đơn dòng chuột #3A1
Kháng thể đơn dòng chuột #8A1
Kháng thể đơn dòng chuột #24A1
Kháng thể đơn dòng chuột #32A1
Kháng thể đơn dòng chuột #34A1
Kháng thể đơn dòng chuột #39A1
Kháng thể đơn dòng chuột #40A1
Kháng thể đơn dòng chuột #41B1
Kháng thể đơn dòng chuột #61A1
IgG đối chứng ở chuột
Hoạt tính liên kết (hấp thụ ở 492 nm)
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (µg/ml)

Fig.5

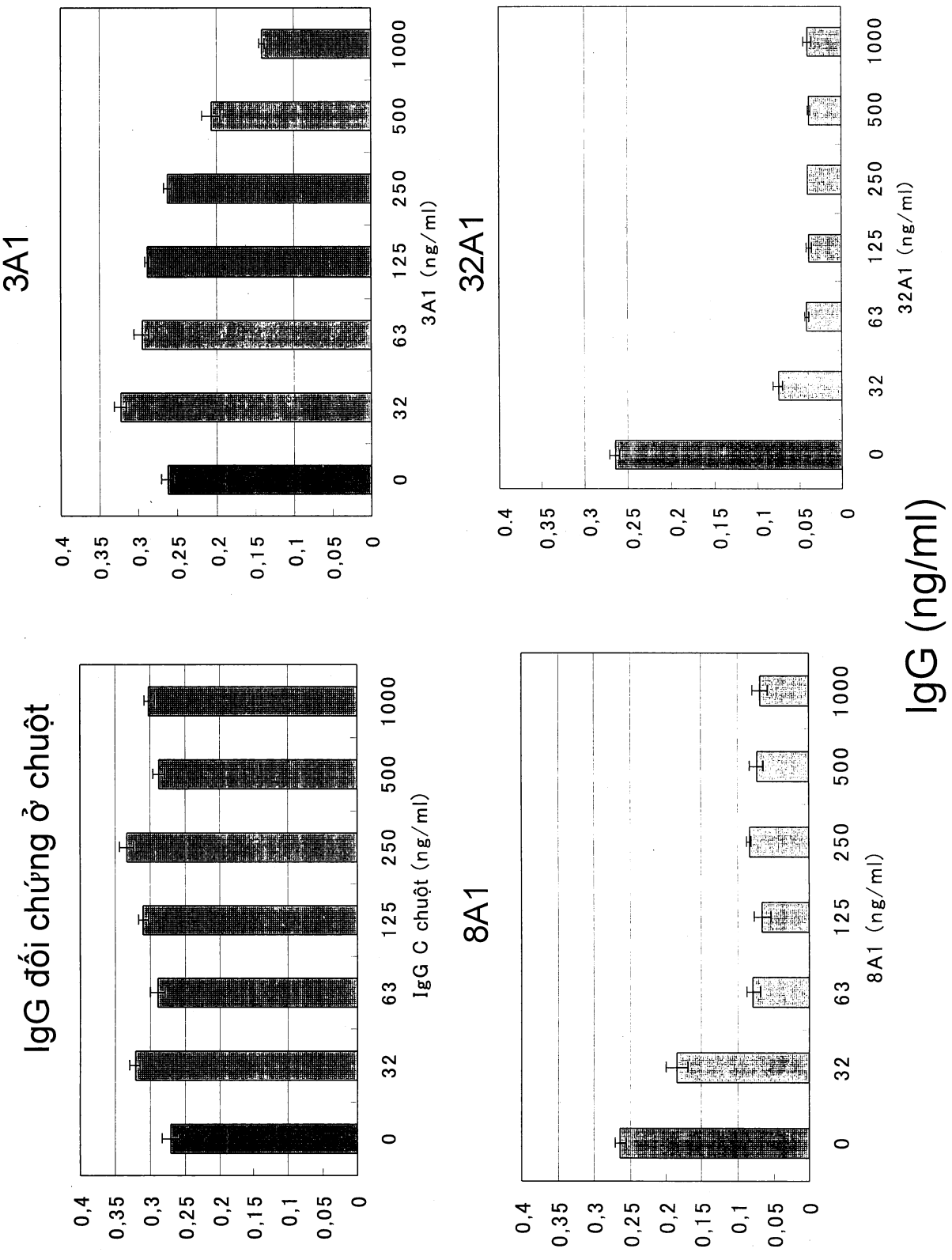

Hoạt tính TRAP (A405 nm)
IgG đối chứng ở chuột
IgG C chuột (ng/ml)
3A1
3A1 (ng/ml)
32A1
32A1 (ng/ml)
8A1
8A1 (ng/ml)
IgG (ng/ml)
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
32
63
125
250
500
1000

Fig.6

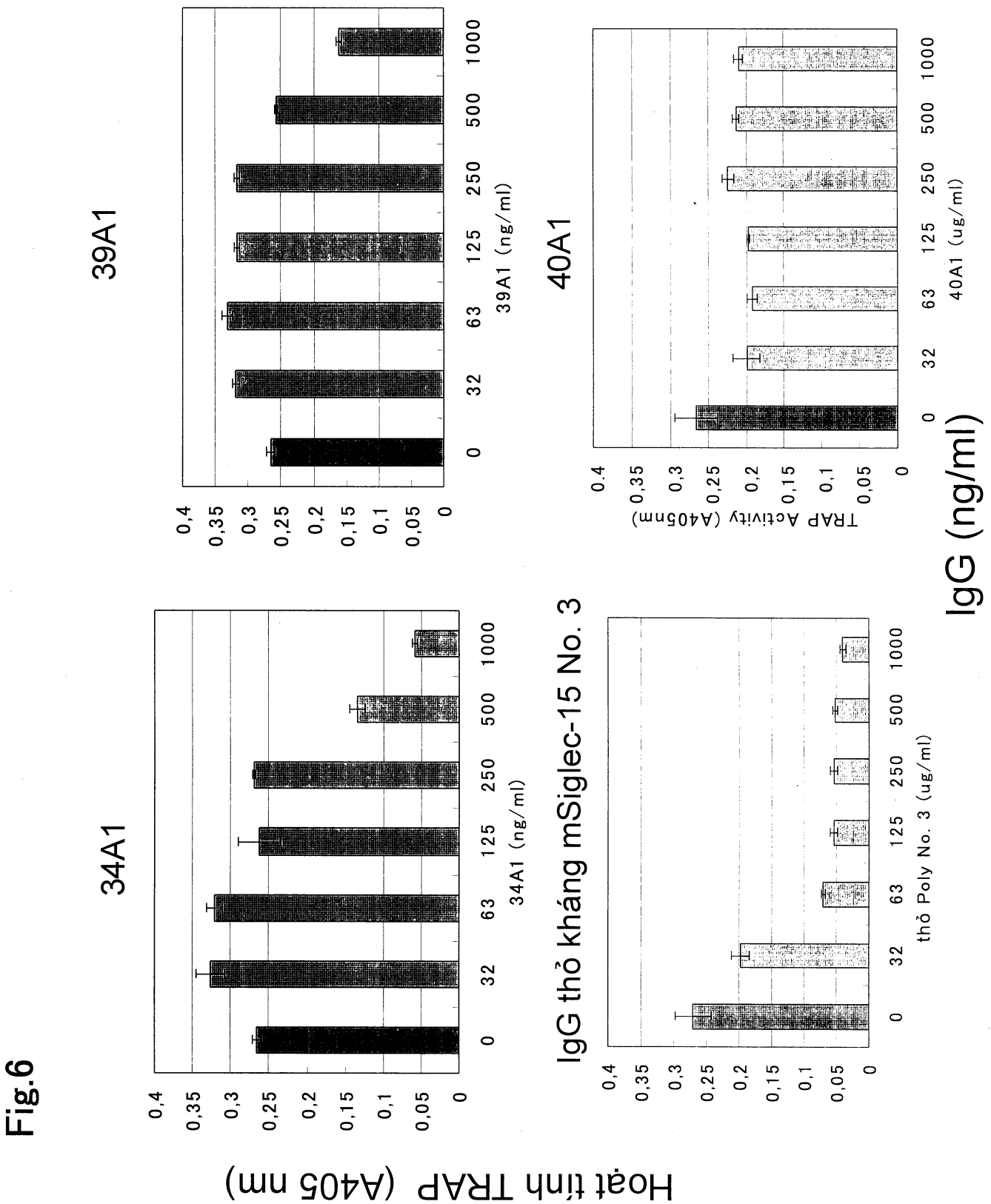
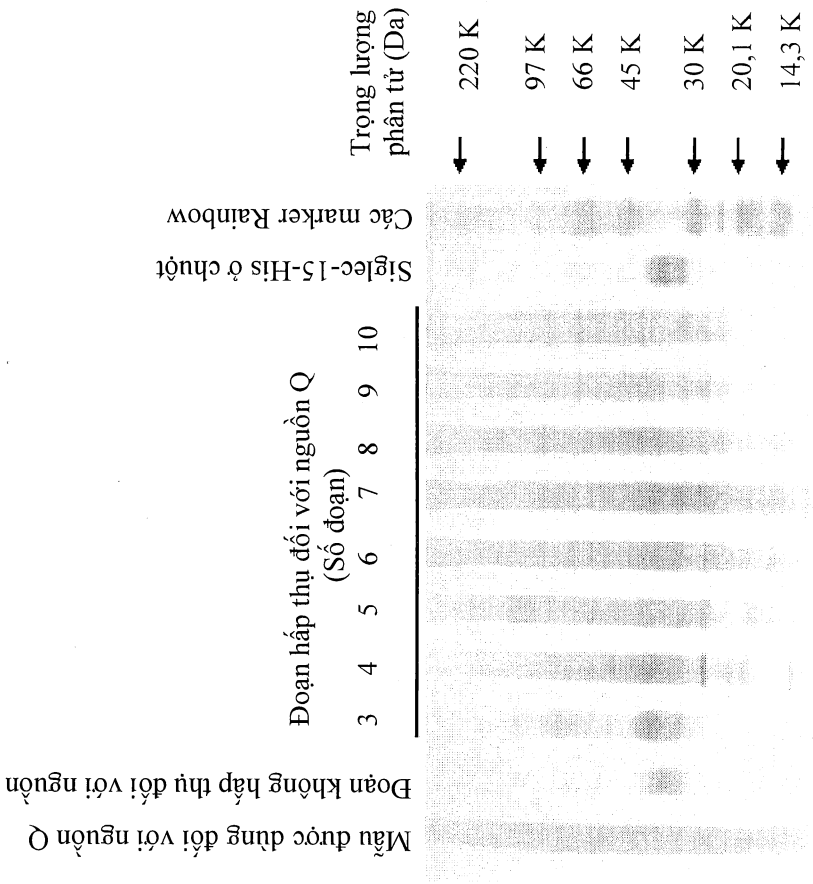

34A1
39A1
40A1
Hoạt tính TRAP (A405 nm)
TRAP Activity (A405nm)
34A1 (ng/ml)
39A1 (ng/ml)
40A1 (ug/ml)
IgG thỏ kháng mSiglec-15 No. 3
thỏ Poly No. 3 (ug/ml)
IgG (ng/ml)
0
32
63
125
250
500
1000
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05

Fig.7


Trọng lượng phân tử (Da)
220 K
97 K
66 K
45 K
30 K
20,1 K
14,3 K
Các marker Rainbow
Siglec-15-His ở chuột
Đoạn hấp thụ đối với nguồn Q (Số đoạn)
3 4 5 6 7 8 9 10
Đoạn không hấp thụ đối với nguồn
Mẫu được dùng đối với nguồn Q

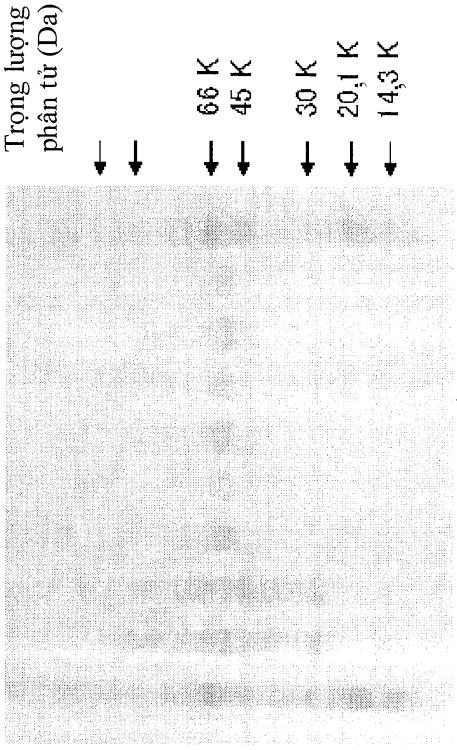

Trọng lượng phân tử (Da)
66 K
45 K
30 K
20,1 K
14,3 K
Các marker Rainbow
Mẫu được dùng đối với HiTrap protein A
Đoạn không hấp thụ đối với HiTrap protein A
Đoạn pha loãng dung môi với Arg x 1/100
Đoạn pha loãng dung môi với Arg x 1/300
Đoạn pha loãng dung môi với NaCl x 1/100
Đoạn pha loãng dung môi với NaCl x 1/300
Đoạn không có dung môi thay thế x 1/100
Đoạn không có dung môi thay thế x 1/300
Các marker Rainbow

Fig.8

Fig.9

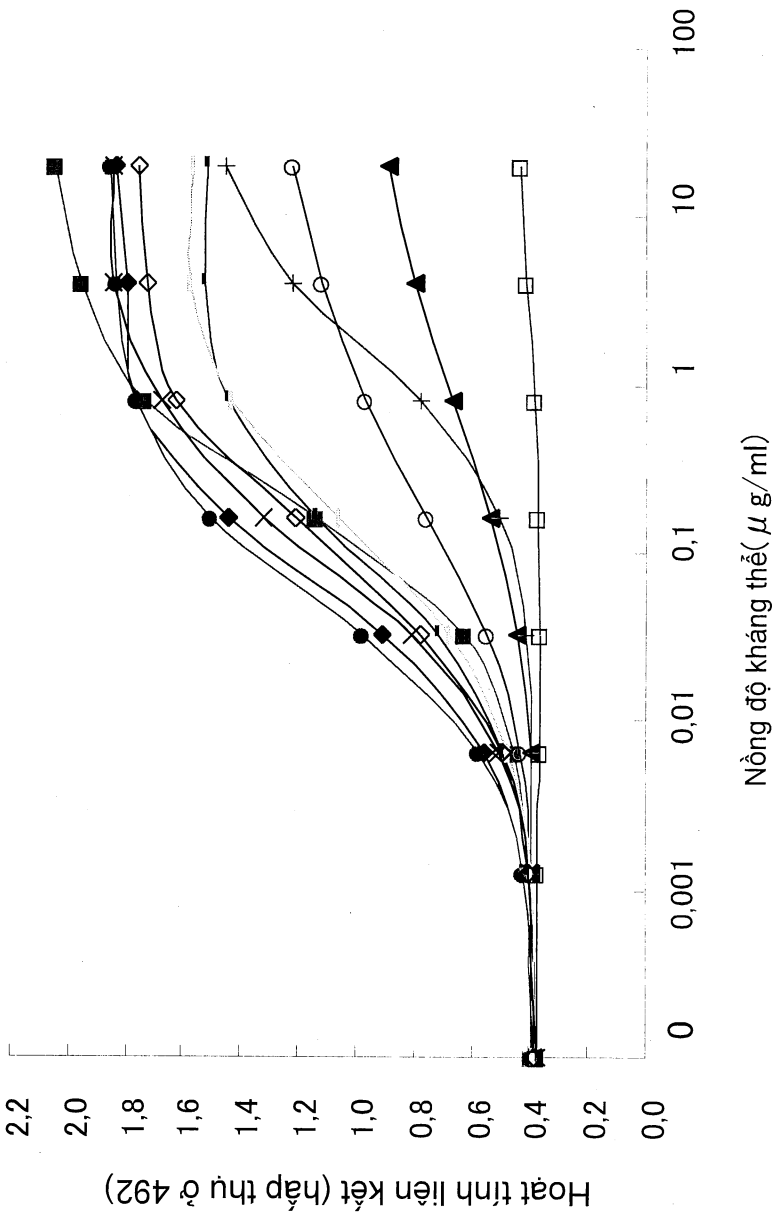

Hoạt tính liên kết (hấp thụ ở 492)
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể(μ g/ml)
Kháng thể đơn dòng chuột #1A1
Kháng thể đơn dòng chuột #3A1
Kháng thể đơn dòng chuột #8A1
Kháng thể đơn dòng chuột #24A1
Kháng thể đơn dòng chuột #32A1
Kháng thể đơn dòng chuột #34A1
Kháng thể đơn dòng chuột #39A1
Kháng thể đơn dòng chuột #40A1
Kháng thể đơn dòng chuột #41B1
Kháng thể đơn dòng chuột #61A1
IgG đối chứng ở chuột

Fig.10

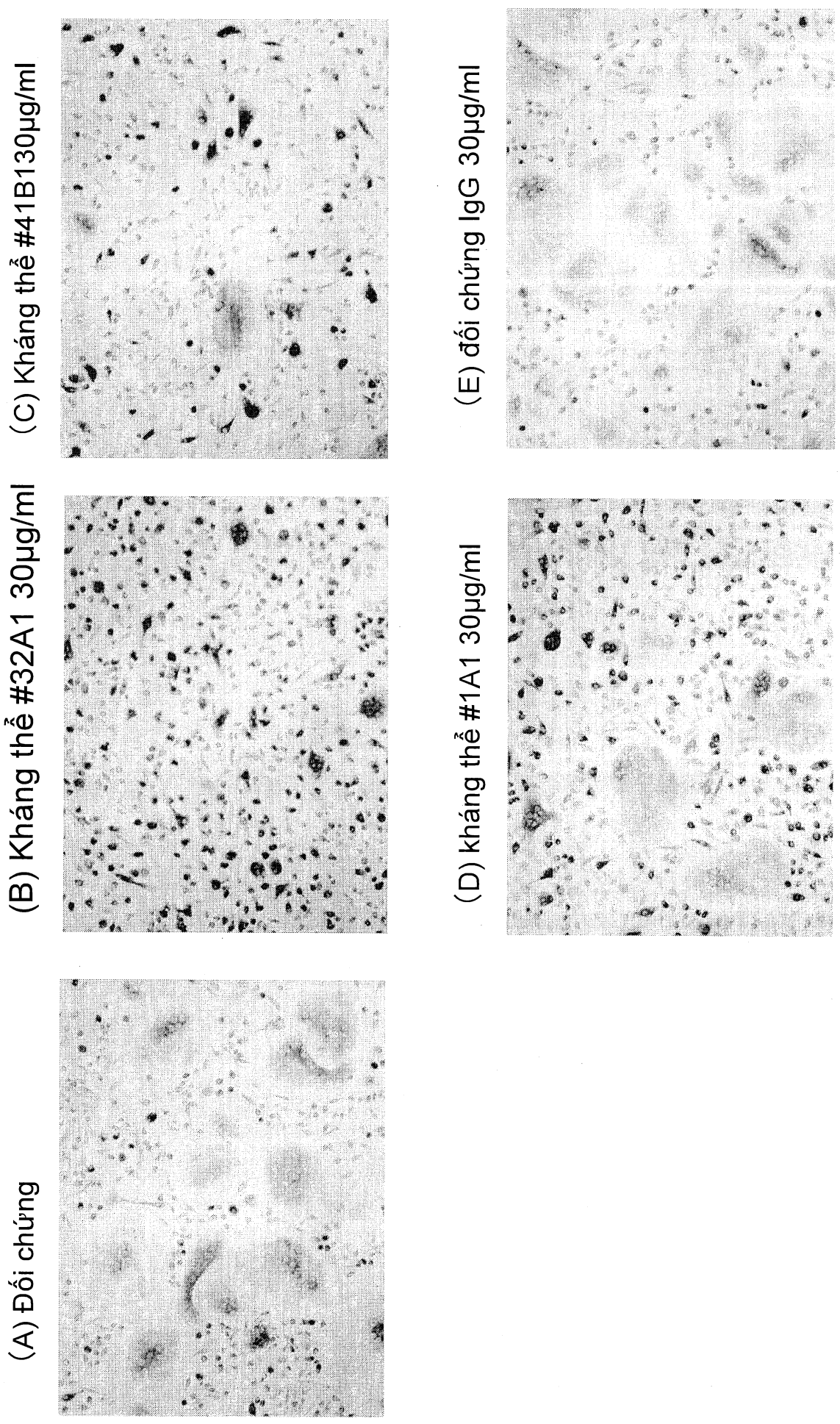

(A) Đối chứng
(B) Kháng thể #32A1 30µg/ml
(C) Kháng thể #41B130µg/ml
(D) kháng thể #1A1 30µg/ml
(E) đối chứng IgG 30µg/ml

Fig.11

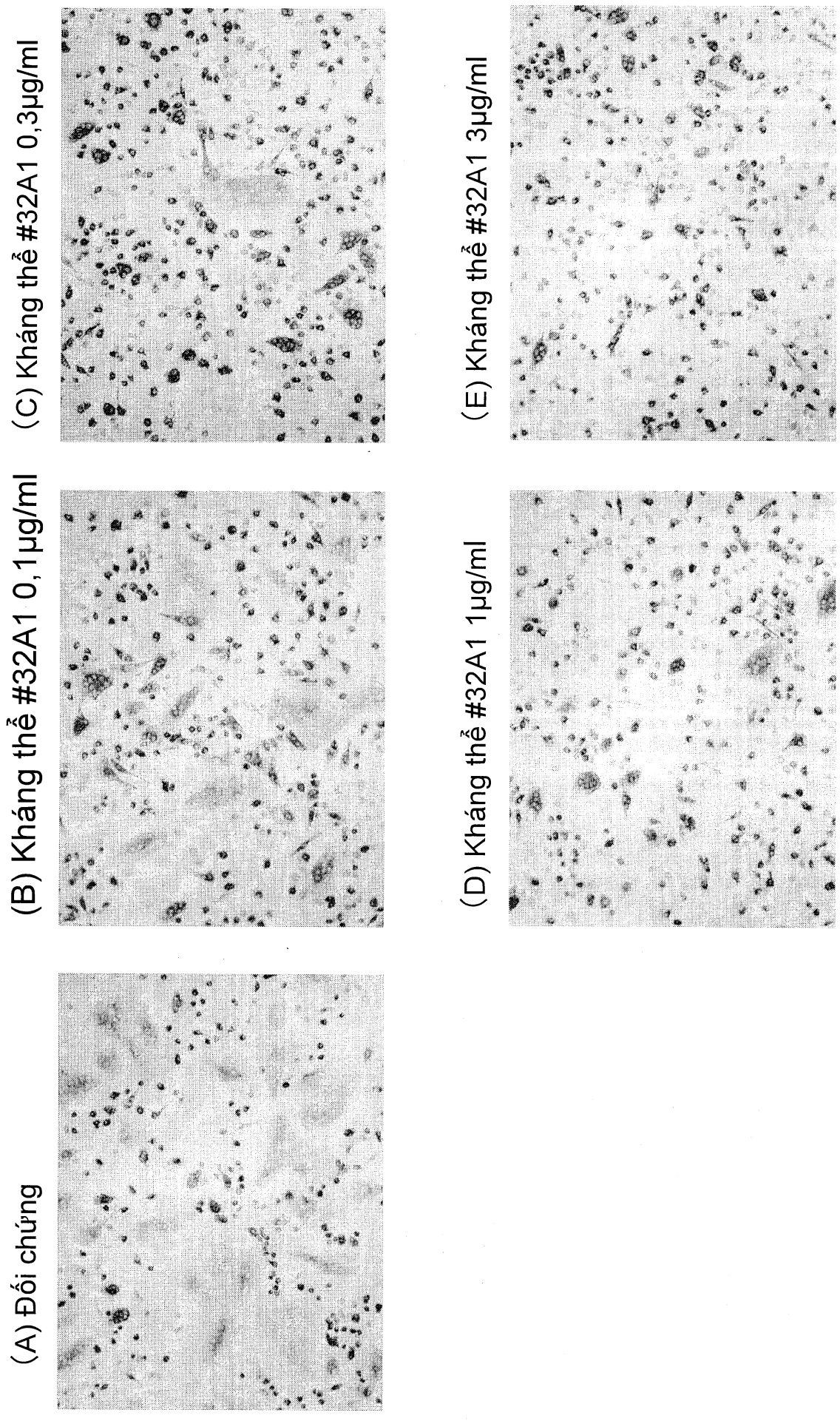

(A) Đối chứng
(B) Kháng thể #32A1 0,1µg/ml
(C) Kháng thể #32A1 0,3µg/ml
(D) Kháng thể #32A1 1µg/ml
(E) Kháng thể #32A1 3µg/ml

Fig.12

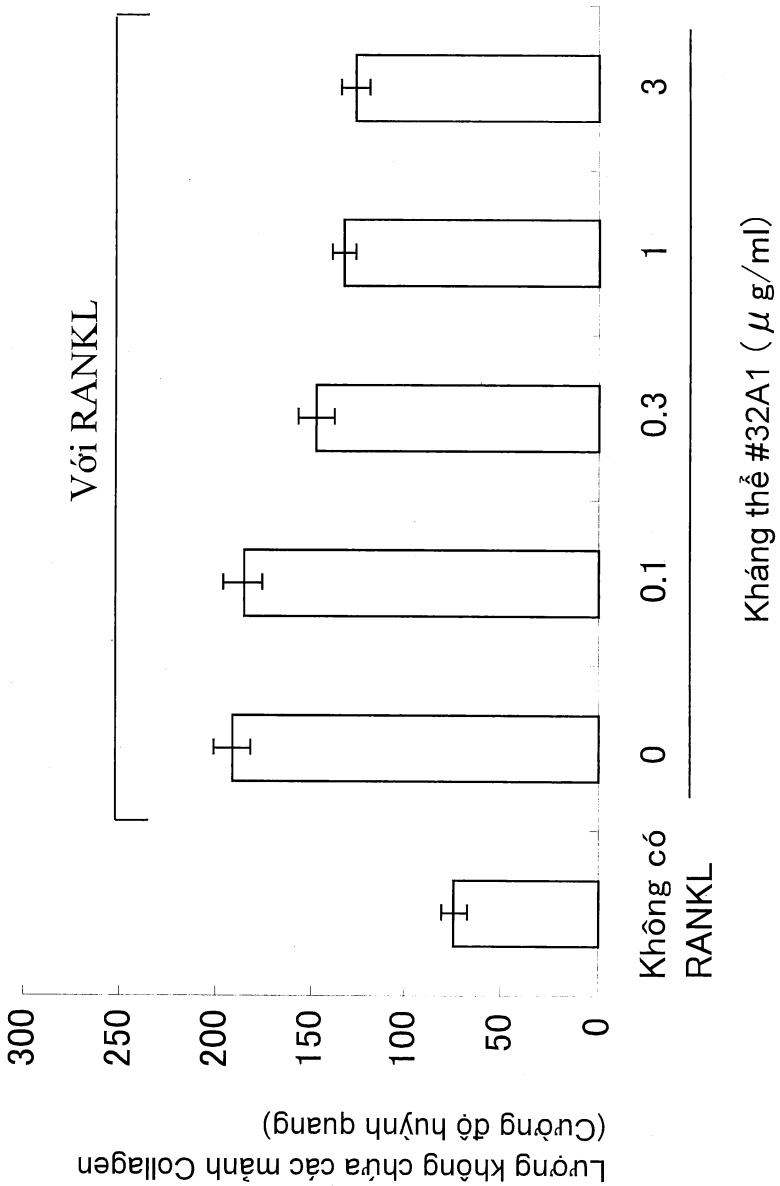

Lượng không chứa các mảnh Collagen
(Cường độ huỳnh quang)
300
250
200
150
100
50
0
Với RANKL
Không có RANKL
0
0.1
0.3
1
3
V
Kháng thể #32A1 (μg/ml)

Fig.13

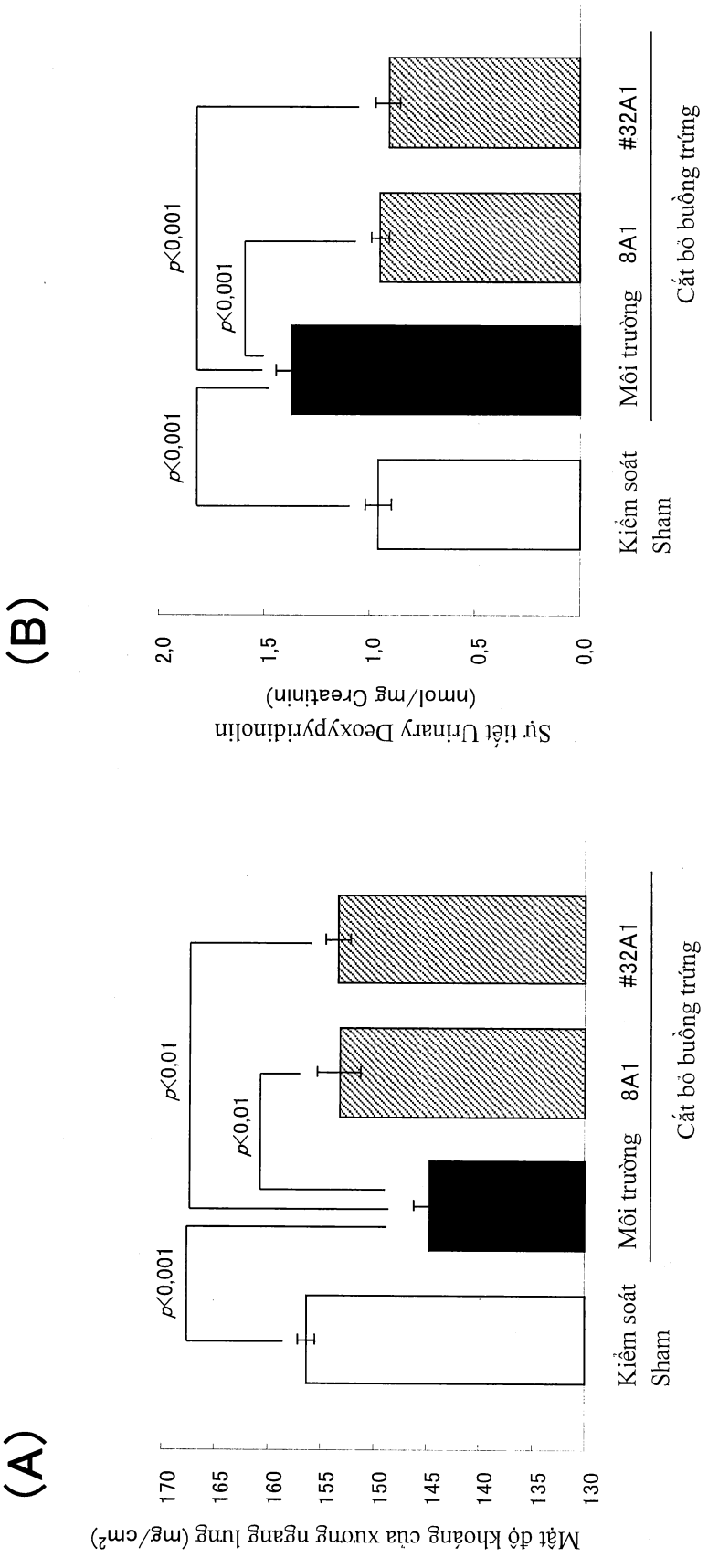

(A)
Mật độ khoáng của xương ngang lưng (mg/cm²)
170
165
160
155
150
145
140
135
130
p<0,001
p<0,01
p<0,01
Kiểm soát
Sham
Môi trường
8A1
#32A1
Cắt bỏ buồng trứng
(B)
Sự tiết Urinary Deoxypyridinolin
(nmol/mg Creatinin)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
p<0,001
p<0,001
p<0,001
Kiểm soát
Sham
Môi trường
8A1
#32A1
Cắt bỏ buồng trứng

Fig.14

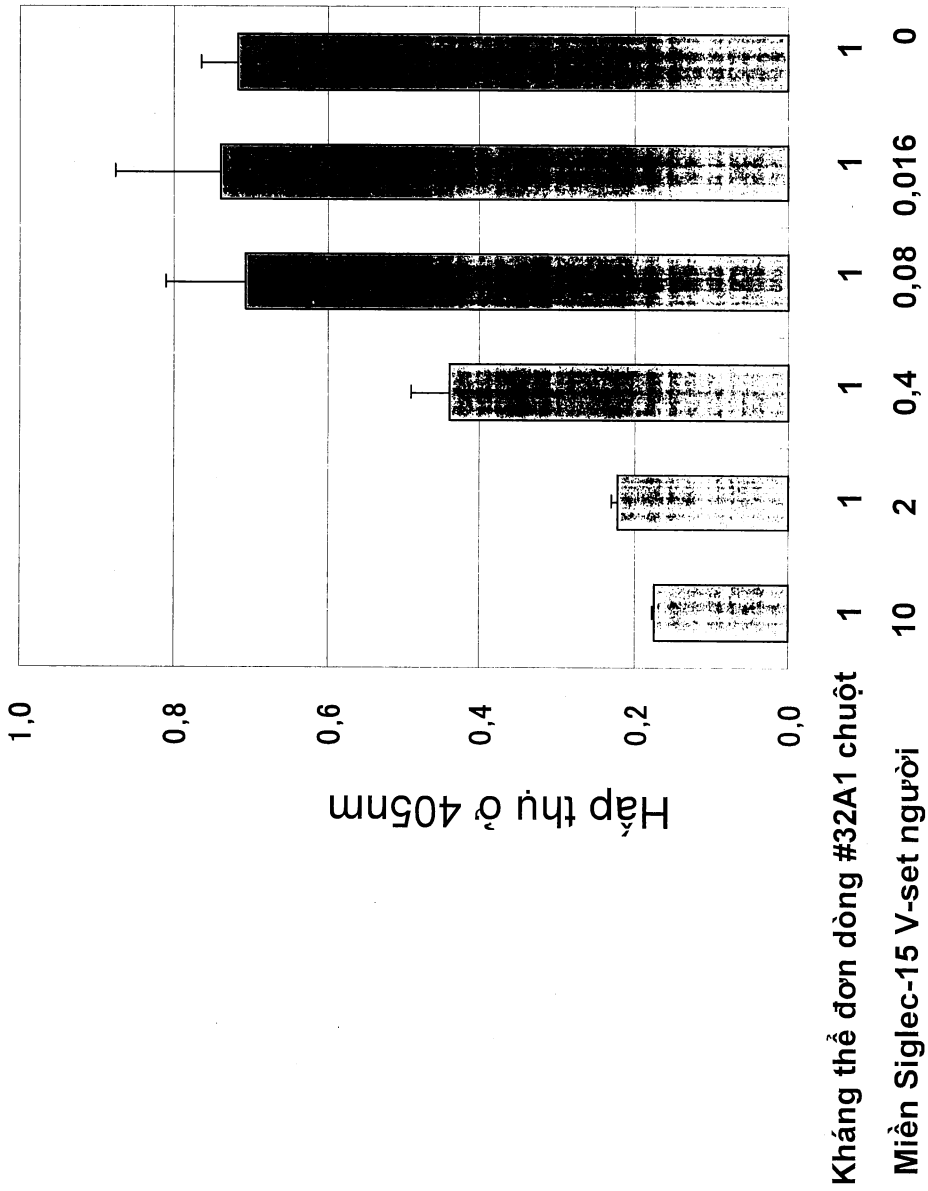

Hấp thụ ở 405nm
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Kháng thể đơn dòng #32A1 chuột 1 1 1 1 1 1
Miền Siglec-15 V-set người 10 2 0,4 0,08 0,016 0
Unit: μg/ml

Fig.15

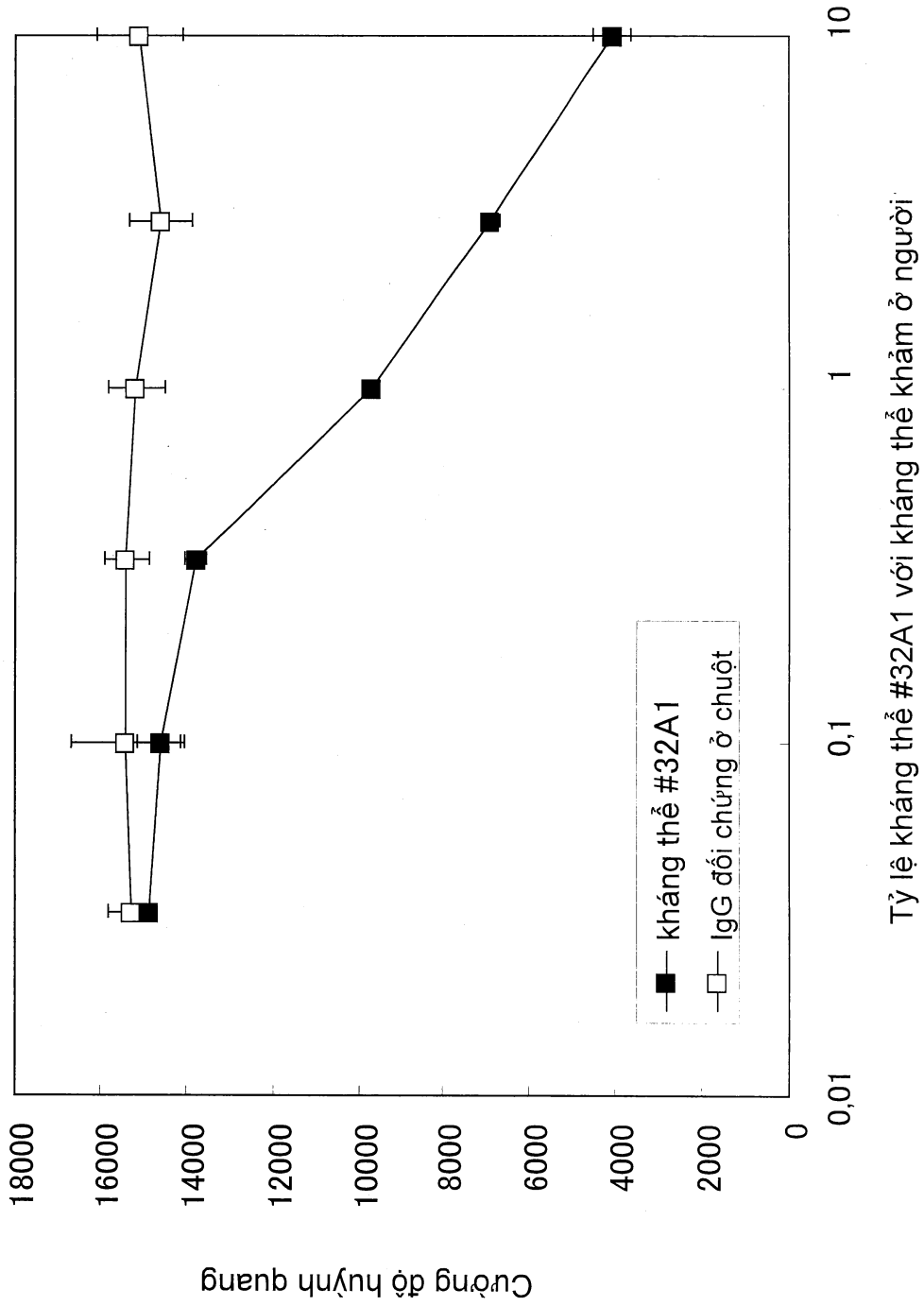

Cường độ huỳnh quang
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0,01
0,1
1
10
Tỷ lệ kháng thể #32A1 với kháng thể khảm ở người
kháng thể #32A1
IgG đối chứng ở chuột

Fig.16

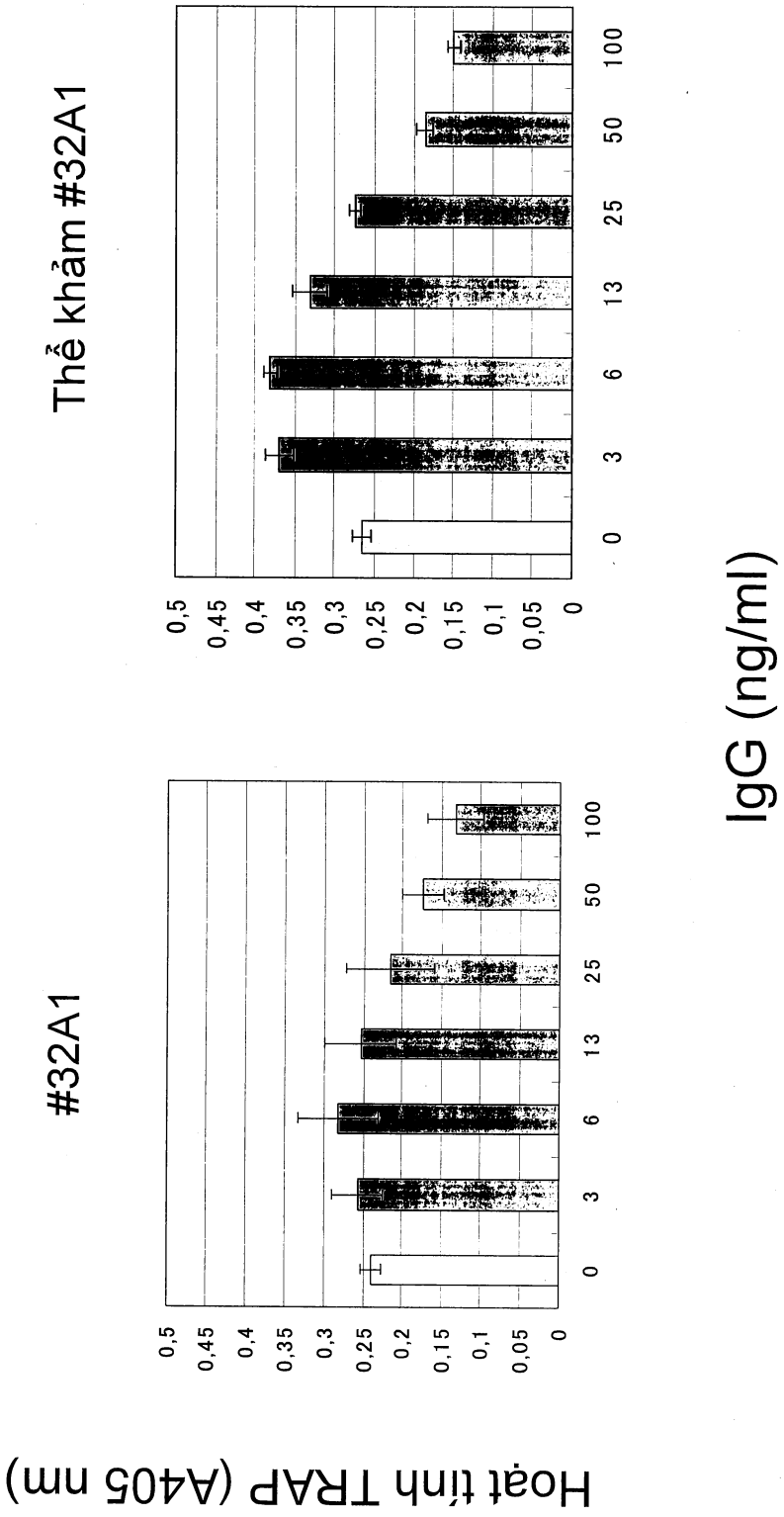

#32A1
Thể khảm #32A1
Hoạt tính TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
3
6
13
25
50
100

Fig.17

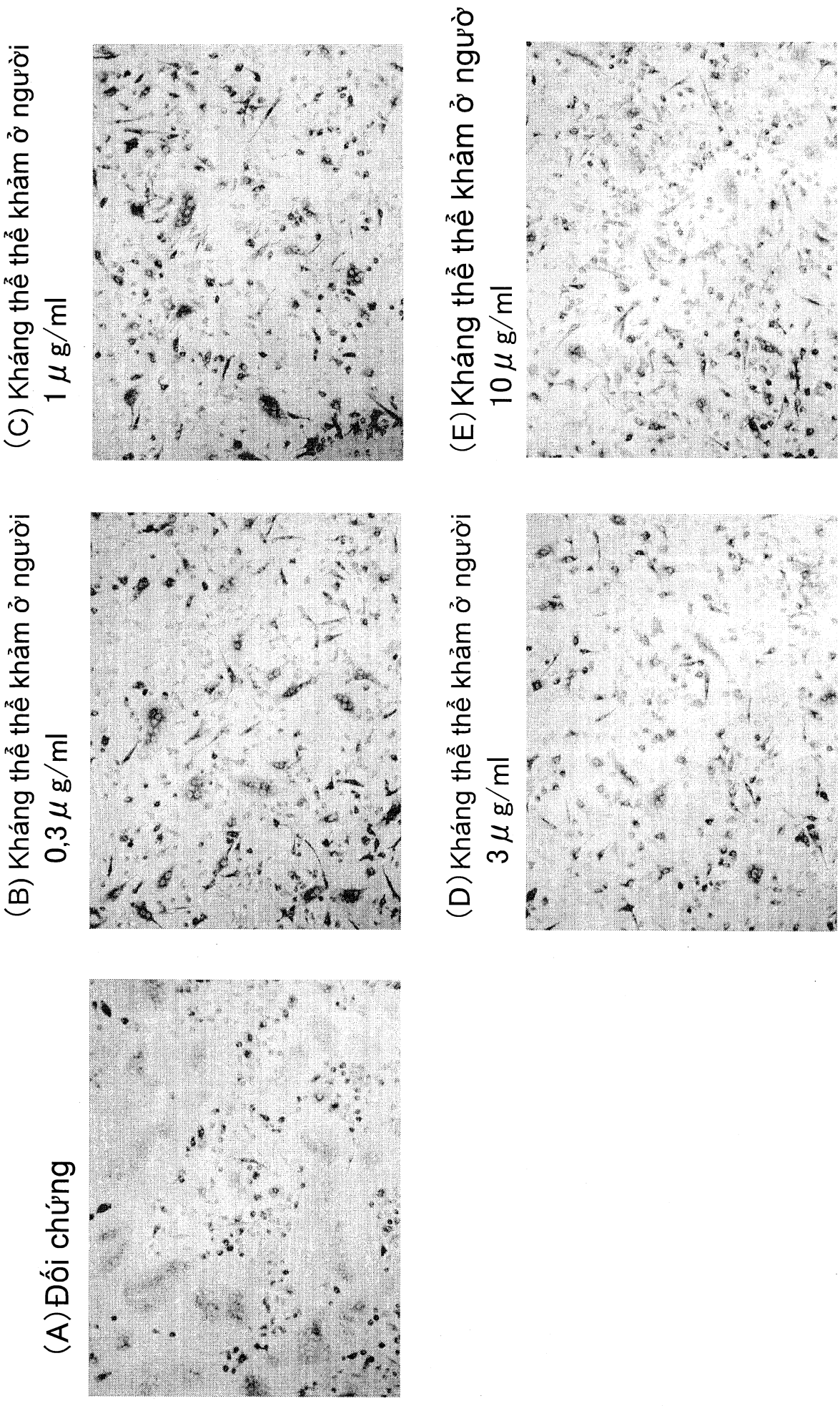

(A) Đối chứng
(B) Kháng thể khảm ở người 0,3 μg/ml
(C) Kháng thể khảm ở người 1 μg/ml
(D) Kháng thể khảm ở người 3 μg/ml
(E) Kháng thể khảm ở người 10 μg/ml

Fig.18

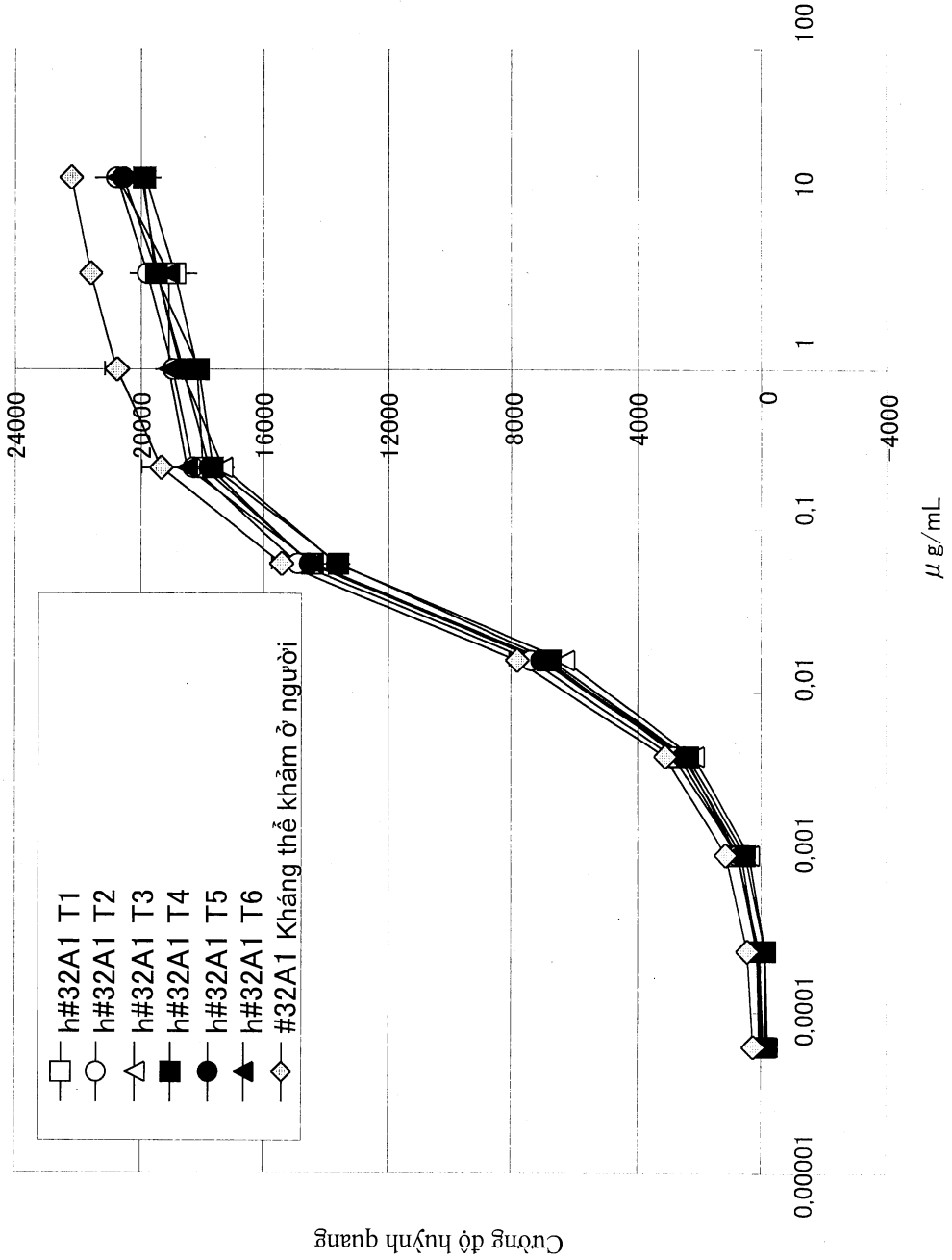

Cường độ huỳnh quang
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
-4000
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
μg/mL
h#32A1 T1
h#32A1 T2
h#32A1 T3
h#32A1 T4
h#32A1 T5
h#32A1 T6
#32A1 Kháng thể khảm ở người

Fig.19

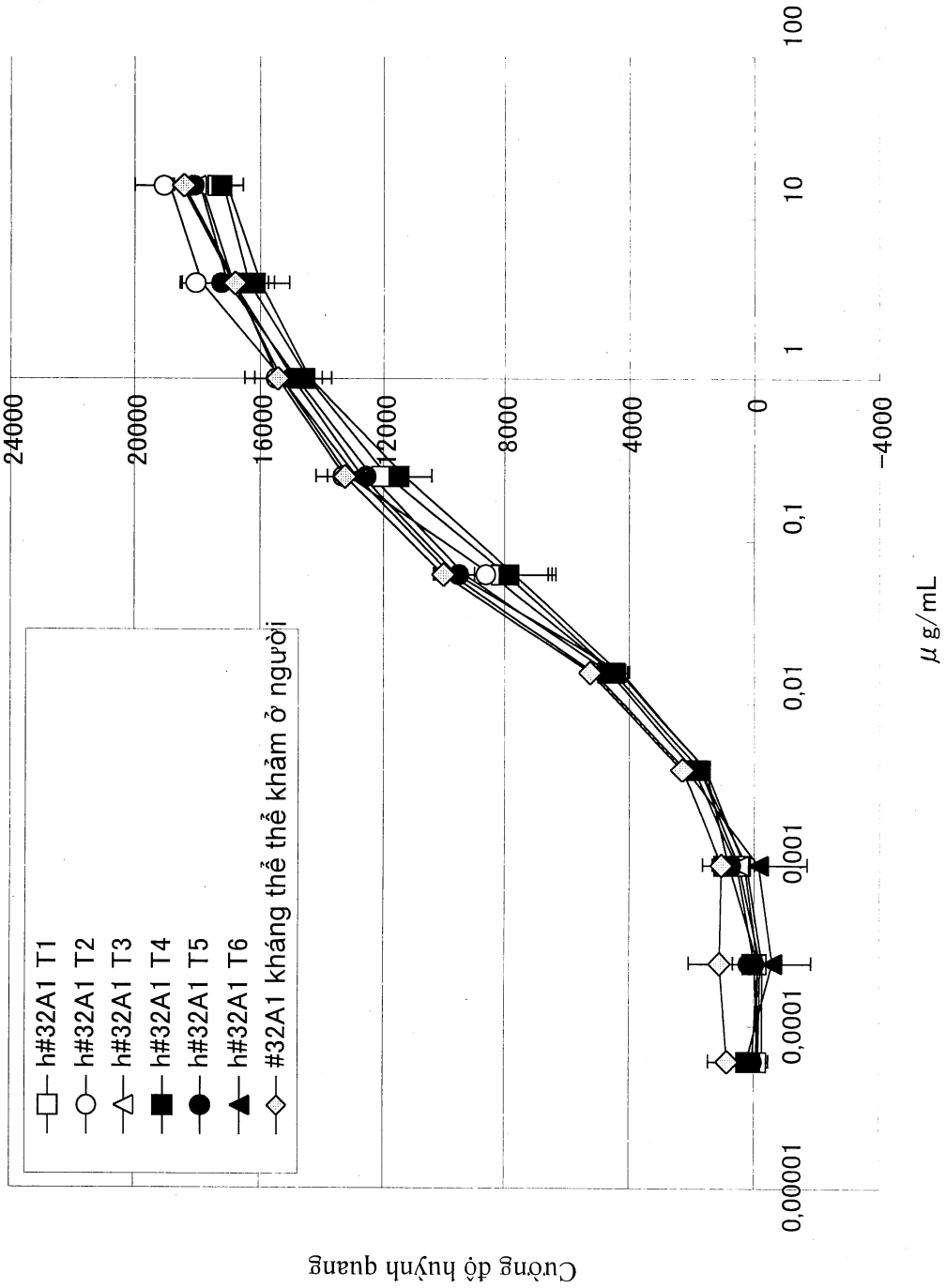
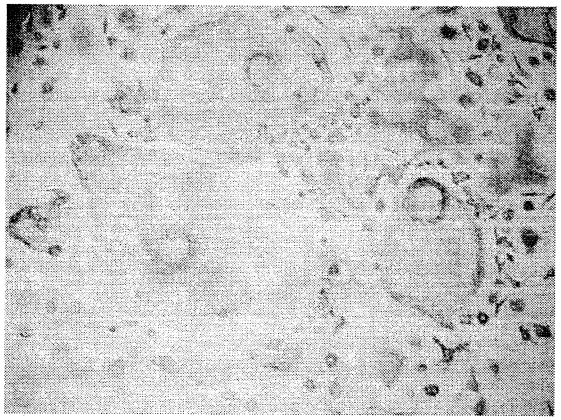
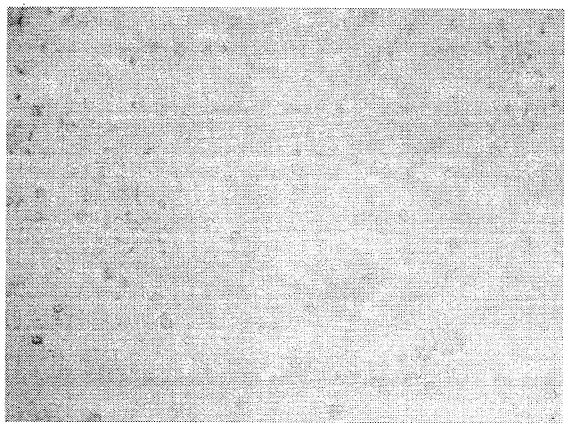

Cường độ huỳnh quang
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
−4000
0,00001
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
10
100
μg/mL
h#32A1 T1
h#32A1 T2
h#32A1 T3
h#32A1 T4
h#32A1 T5
h#32A1 T6
#32A1 kháng thể thể khảm ở người

Fig.20

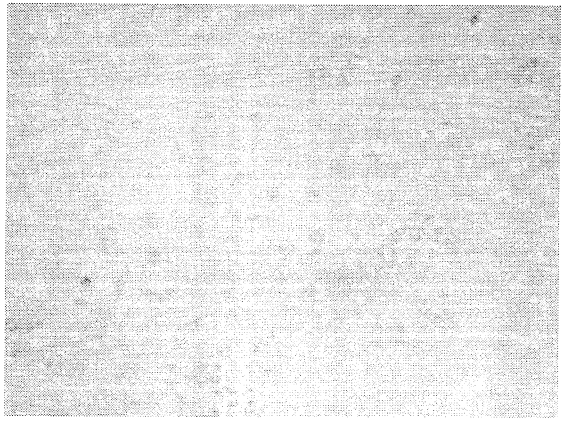
(A).Đối chứng : 30 ng/ml TNFα



(B) TNF α + 1 μ g/ml #32A1



(C) TNFα + 1μg/ml #32A1 thể khảm



(D) TNF α + 100 ng/ml OCIF/OPG

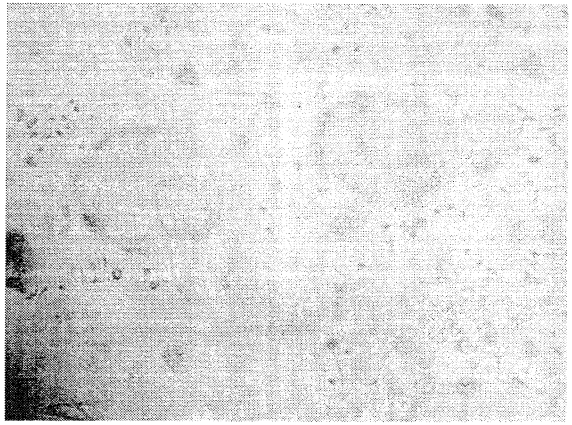


Fig.21

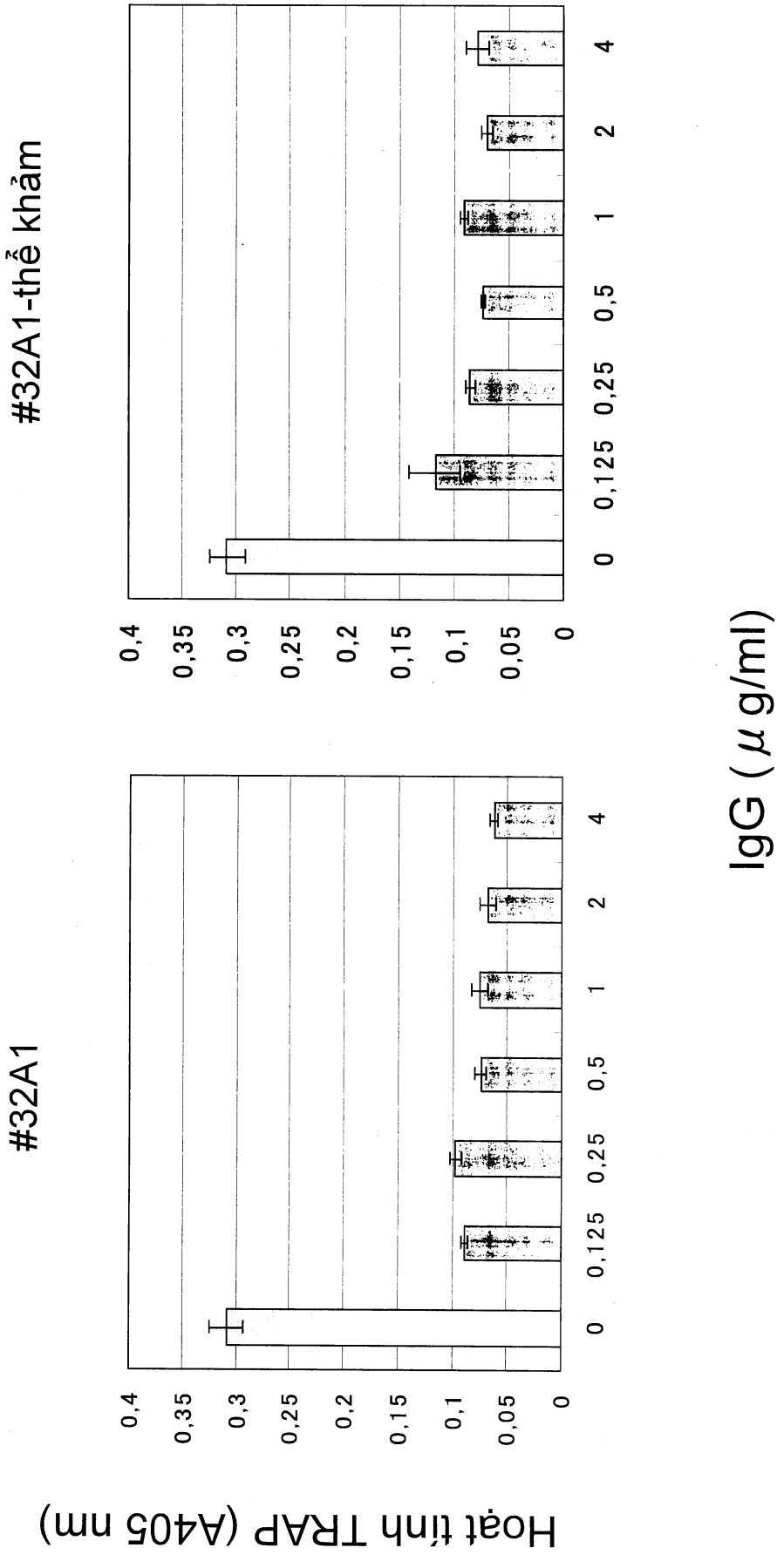

#32A1
#32A1-thể khảm
Hoạt tính TRAP (A405 nm)
IgG (μ g/ml)
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
0,125
0,25
0,5
1
2
4

Fig.22

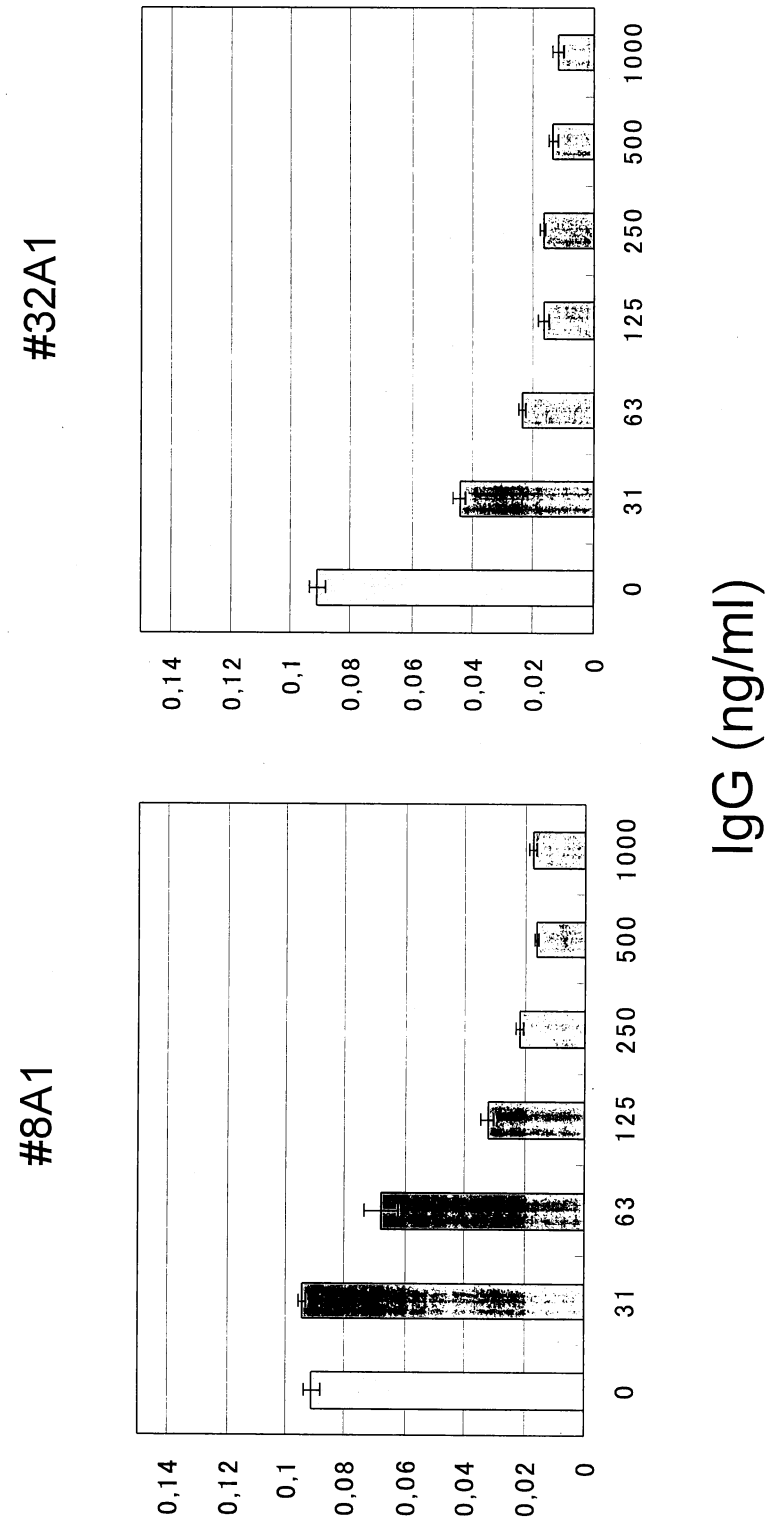

Hoạt tính TRAP (A405 nm)
#8A1
#32A1
0,14
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
0
31
63
125
250
500
1000
IgG (ng/ml)

Fig. 23

SEQ ID NO:27: Trình tự Nucleotit được tách dòng của chuỗi nặng #32A1 chuột (vùng biến đổi + alpha)

ATGAAGTTGTGGTTGAGCTGGATATTCCTTGTTGTTCTTTTCAAAGGTGTGAGGTGTGAGGTGCAAATTTTGGAGACTGG
AGGAGGCTTGGTGAAGCCCGGTGGTTCCCTGAGACTGTCTTGTGCAACGTCTGGATTCAATTTCAATGATTATTTCATGA
ACTGGGTCCGTCAGGCTCCAGAAAAGGGGCTAGAGTGGGTTGCTCAAATAAGGAACAAAATTTATACTTATGCCACATTT
TATGCGGAGTCTTTGGAAGGCAGAGTCACAATCTCACGAGACGATTCCGAAAGCAGTGTCTACCTGCAAGTGAGCAGTTT
AAGAGCTGAAGACACTGCCATTTATTACTGTACAAGATCCCTAACTGGGGGAGACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAG
TCATGGTCACAGTCTCCTTAGCTGAAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGAACTGCTCTCAAAAGTAAC
TCCATGGTGACCCTGGGATGC

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), trình tự một phần của vùng bất biến (421-501)

SEQ ID NO:28: trình tự axit amin được mã hóa bởi chuỗi nặng #32A1 chuột được tách dòng (vùng biến đổi + alpha)

MKLWLSWIFLVVLFKGVRCEVQILETGGGLVKPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATF
YAESLEGRVTISRDDSESSVYLQVSSLRAEDTAIYYCTRSLTGGDYFDYWGQGVMVTVSLAETTAPSVYPLAPGTALKSN
SMVTLGC

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), Trình tự một phần của vùng bất biến (141-167)

Fig. 24

SEQ ID NO:29: Trình tự nucleotit được tách dòng của chuỗi nhẹ #32A1 chuột (vùng biến đổi + alpha)

ATGGAGACAGACAGACTCCTGCTATGGGCACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTGTCTTGACCCAGTC
TCCTGCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACAATCTCCTGTAGGGCCAGCCAAAGTGTCACTATTTCTGGATATA
GTTTTATACACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCAACCCAGACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGCCTCTGGG
ATCCCGGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATCCTGTGCAGGCTGATGATATTGC
AACCTATTTCTGTCAGCAGAGTAGGAAATCTCCGTGGACGTTCGCTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAGACGGGCTGATG
CTGCACCAACTGTATCT

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-396), Trình tự một phần của vùng bất biến (397-417)

SEQ ID NO:30: Trình tự axit amin được mã hóa bởi chuỗi nhẹ #32A1 chuột được tách dòng (vùng biến đổi + alpha)

METDRLLLWALLLWVPGSTGDIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQQPRLLIYRASNLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTINPVQADDIATYFCQQSRKSPWTFAGGTKLELRRADAAPTVS

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-132), Trình tự một phần của vùng bất biến (133-139)

Fig. 25

SEQ ID NO: 40: Trình tự nucleotit của chuỗi nặng kháng thể khảm ở người #32A1

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGCAAATTTTGGAGACTGG
AGGAGGCTTGGTGAAGCCCGGTGGTTCCCTGAGACTGTCTTGTGCAACGTCTGGATTCAATTTCAATGATTATTTCATGA
ACTGGGTCCGTCAGGCTCCAGAAAAGGGGCTAGAGTGGGTTGCTCAAATAAGGAACAAAATTTATACTTATGCCACATTT
TATGCGGAGTCTTTGGAAGGCAGAGTCACAATCTCACGAGACGATTCCGAAAGCAGTGTCTACCTGCAAGTGAGCAGTTT
AAGAGCTGAAGACACTGCCATTTATTACTGTACAAGATCCCTAACTGGGGGAGACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAG
TCATGGTCACAGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGC
GGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCC
CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC
CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAATGA

Trình tự tín hiệu (1-57), vùng biến đổi (58-420), Vùng bất biến (421-1413, bao gồm codon kết thúc)

SEQ ID NO: 41: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể khảm ở người #32A1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQILETGGGLVKPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATF
YAESLEGRVTISRDDSESSVYLQVSSLRAEDTAIYYCTRSLTGGDYFDYWGQGVMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), vùng biến đổi (20-140), Vùng bất biến (141-470)

Fig. 26

SEQ ID NO: 42: Trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ kháng thể khảm của người #32A1

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACATTGTCTTGACCCAGTC
TCCTGCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACAATCTCCTGTAGGGCCAGCCAAAGTGTCACTATTTCTGGATATA
GTTTTATACACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCAACCCAGACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGCCTCTGGG
ATCCCGGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATCCTGTGCAGGCTGATGATATTGC
AACCTATTTCTGTCAGCAGAGTAGGAAATCTCCGTGGACGTTCGCTGGAGGCACCAAGCTGGAATTGAGACGTACGGTGG
CCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAAT
AACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGAC
CGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGG
TGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGGGGAGTGTTAG

Trình tự tín hiệu (1-60), vùng biến đổi (61-396), Vùng bất biến (397-714, bao gồm codon kết thúc)

SEQ ID NO: 43: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể khảm của người #32A1

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQQPRLLIYRASNLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTINPVQADDIATYFCQQSRKSPWTFAGGTKLELRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), vùng biến đổi (21-132), Vùng bất biến (133-237)

Fig.27

SEQ ID NO:50: Trình tự nucleotit của h#32A1-T1H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AACTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAACCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCGC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAAATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTTCAAATGAACTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Trình tự tín hiệu (1-57) , Vùng biến đổi (58-420) , Vùng bất biến (421-1410)

SEQ ID NO:51: Trình tự axit amin của h#32A1-T1H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19) , Vùng biến đổi (20-140) , Vùng bất biến (141-470)

Fig.28

SEQ ID NO:52: Trình tự nucleotit của h#32A1-T2H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AACTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTGGTGCAACCTGGCGGCTCCCTGAGACTGAGCTGTGCCGC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAAGCCCCTGAGAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAAATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTGG
AGGGCAGAGTGACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGTCCTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCCTGACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Trình tự tín hiệu (1-57) , Vùng biến đổi (58-420) , Vùng bất biến (421-1410)

SEQ ID NO:53: Trình tự axit amin của h#32A1-T2H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19) , Vùng biến đổi (20-140) , Vùng bất biến (141-470)

Fig.29

SEQ ID NO:54: Trình tự nucleotit của h#32A1-T3H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGATCGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGAGAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGAGTGACCATCTCCAGAGACGACAGCGAGTCCAGCGTGTACCTTCAGATGTCCAGCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Trình tự tín hiệu (1-57) , Vùng biến đổi (58-420) , Vùng bất biến (421-1410)

SEQ ID NO:55: Trình tự axit amin của h#32A1-T3H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQIVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPEKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDDSESSVYLQMSSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19) , Vùng biến đổi (20-140) , Vùng bất biến (141-470)

Fig.30

SEQ ID NO:56: Trình tự nucleotit của h#32A1-T5H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGGTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGTCCACCGTGTACCTTCAGATGAACTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Trình tự tín hiệu (1-57) , Vùng biến đổi (58-420) , Vùng bất biến (421-1410)

SEQ ID NO:57: Trình tự axit amin của h#32A1-T5H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRFTISRDNSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19) , Vùng biến đổi (20-140) , Vùng bất biến (141-470)

Fig.31

SEQ ID NO:58: Trình tự nucleotit của h#32A1-T6H

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGGTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGAGAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGAGTGACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGTCCACCGTGTACCTTCAGATGTCCAGCCT
TAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTTGTGACAGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCC
CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCCTGCCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
AGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCA
AA

Trình tự tín hiệu (1-57) , Vùng biến đổi (58-420) , Vùng bất biến (421-1410)

SEQ ID NO:59: Trình tự axit amin của h#32A1-T6H

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPEKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRVTISRDNSKSTVYLQMSSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19) , Vùng biến đổi (20-140) , Vùng bất biến (141-470)

Fig.32

SEQ ID NO:60: Trình tự nucleotit của h#32A1-T1L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAAGCTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCGTGCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCGTGTACTACTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Trình tự tín hiệu (1-60) , Vùng biến đổi (61-399) , Vùng bất biến (400-714)

SEQ ID NO:61: Trình tự axit amin của h#32A1-T1L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPKLLIYRASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20) , Vùng biến đổi (21-133) , Vùng bất biến (134-238)

Fig.33

SEQ ID NO:62: Trình tự nucleotit của h#32A1-T2L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGATGACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAGACTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCGTGCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCGTGTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Trình tự tín hiệu (1-60) , Vùng biến đổi (61-399) , Vùng bất biến (400-714)

SEQ ID NO:63: Trình tự axit amin của h#32A1-T2L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPRLLIYRASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20) , Vùng biến đổi (21-133) , Vùng bất biến (134-238)

Fig.34

SEQ ID NO:64: Trình tự nucleotit của h#32A1-T3L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCAGCCTAGACTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCACCTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Trình tự tín hiệu (1-60) , Vùng biến đổi (61-399) , Vùng bất biến (400-714)

SEQ ID NO:65: Trình tự axit amin của h#32A1-T3L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQQPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYFCQQSRKSPWTFAGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20) , Vùng biến đổi (21-133) , Vùng bất biến (134-238)

Fig.35

SEQ ID NO:66: Trình tự nucleotit của h#32A1-T4L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTGTAG
AGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGC
CAGCAGCCTAGACTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGATTCT
CCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGTGGC
CACCTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGCTGGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGT
CCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGG
TGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAGGGG
GGAGTGT

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-396), Vùng bất biến (400-711)

SEQ ID NO:67: Trình tự axit amin của h#32A1-T4L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPALAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPG
QQPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYFCQQSRKSPWTFAGGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-132), Vùng bất biến (133-237)

Fig.36

SEQ ID NO:68: Trình tự nucleotit của h#32A1-T5L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAAGCTTCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCACCTACTACTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Trình tự tín hiệu (1-60) , Vùng biến đổi (61-399) , Vùng bất biến (400-714)

SEQ ID NO:69: Trình tự axit amin của h#32A1-T5L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPKLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYYCQQSRKSPWTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20) , Vùng biến đổi (21-133) , Vùng bất biến (134-238)

Fig.37

SEQ ID NO:70: Trình tự nucleotit của h#32A1-T6L

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGACA
TCGTGCTTACCCAGAGCCCTGACTCCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAGCTG
TAGAGCCTCCCAGAGCGTGACCATCTCCGGCTACAGCTTCATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGCCAGCCTCCTAGACTGCTGATCTACAGAGCCTCCAACCTTGCCAGCGGCATCCCTGCCAGAT
TCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGACGT
GGCCACCTACTTCTGTCAGCAGAGCAGAAAGTCCCCTTGGACCTTCGCCGGCGGCACCAAGGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Trình tự tín hiệu (1-60) , Vùng biến đổi (61-399) , Vùng bất biến (400-714)

SEQ ID NO:71: Trình tự axit amin của h#32A1-T6L

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQPPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVATYFCQQSRKSPWTFAGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20) , Vùng biến đổi (21-133) , Vùng bất biến (134-238)

Fig.38

SEQ ID NO:72: Trình tự axit amin của h#32A1-T7H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Vùng biến đổi (1-121), Vùng bất biến (122-451)

SEQ ID NO:73: Trình tự axit amin của h#32A1-T8H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Vùng biến đổi (1-121), Vùng bất biến (122-451)

SEQ ID NO:74: Trình tự axit amin của h#32A1-T9H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Vùng biến đổi (1-121), Vùng bất biến (122-451)

Fig.39

SEQ ID NO:75: Trình tự axit amin của h#32A1-T10H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRVTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Vùng biến đổi (1-121), Vùng bất biến (122-451)

SEQ ID NO:76: Trình tự axit amin của h#32A1-T11H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPEKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Vùng biến đổi (1-121), Vùng bất biến (122-451)

SEQ ID NO:77: Trình tự axit amin của h#32A1-T12H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQIRNKIYTYATFYAE
SLEGRVTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

Vùng biến đổi (1-121), Vùng bất biến (122-451)

Fig.40

SEQ ID NO:78: Trình tự axit amin của h#32A1-T7L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:79: Trình tự axit amin của h#32A1-T8L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:80: Trình tự axit amin của h#32A1-T9L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:81: Trình tự axit amin của h#32A1-T10L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:82: Trình tự axit amin của h#32A1-11L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

Fig.41

SEQ ID NO:83: Trình tự axit amin của h#32A1-T12L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:84: Trình tự axit amin của h#32A1-T13L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:85: Trình tự axit amin của h#32A1-T14L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:86: Trình tự axit amin của h#32A1-T15L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:87: Trình tự axit amin của h#32A1-T16L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

Fig.42

SEQ ID NO:88: Trình tự axit amin của h#32A1-T17L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:89: Trình tự axit amin của h#32A1-T18L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:90: Trình tự axit amin của h#32A1-T19L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:91: Trình tự axit amin của h#32A1-T20L

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQPPRLLIYRASNLASGVPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:92: Trình tự axit amin của h#32A1-T21L

EILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

Fig.43

SEQ ID NO:93: Trình tự axit amin của h#32A1-T22L

EILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYFCQQSRKSPWTFAQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:94: Trình tự axit amin của h#32A1-T23L

EILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:95: Trình tự axit amin của h#32A1-T24L

EILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQAPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

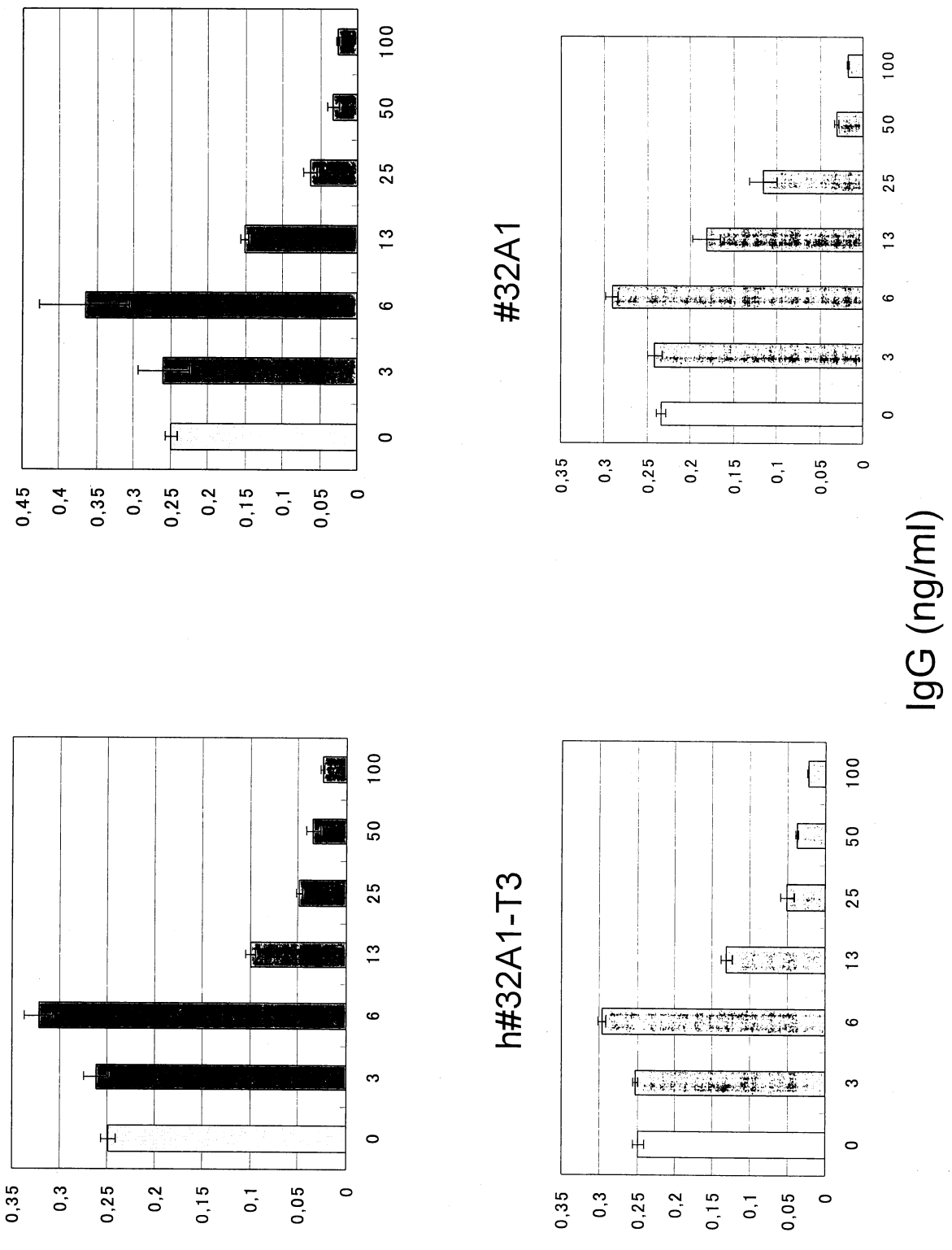
Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

SEQ ID NO:96: Trình tự axit amin của h#32A1-T25L

DILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKPGQQPRLLIYRASNLASGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYFCQQSRKSPWTFAGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi (1-113), Vùng bất biến (114-218)

Fig.44


h#32A1-T2
h#32A1
h#32A1-T1
h#32A1-T3
Hoạt tính TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0
3
6
13
25
50
100
0,05
0,1
0,15
0,2
0,25
0,3
0,35
0,4
0,45

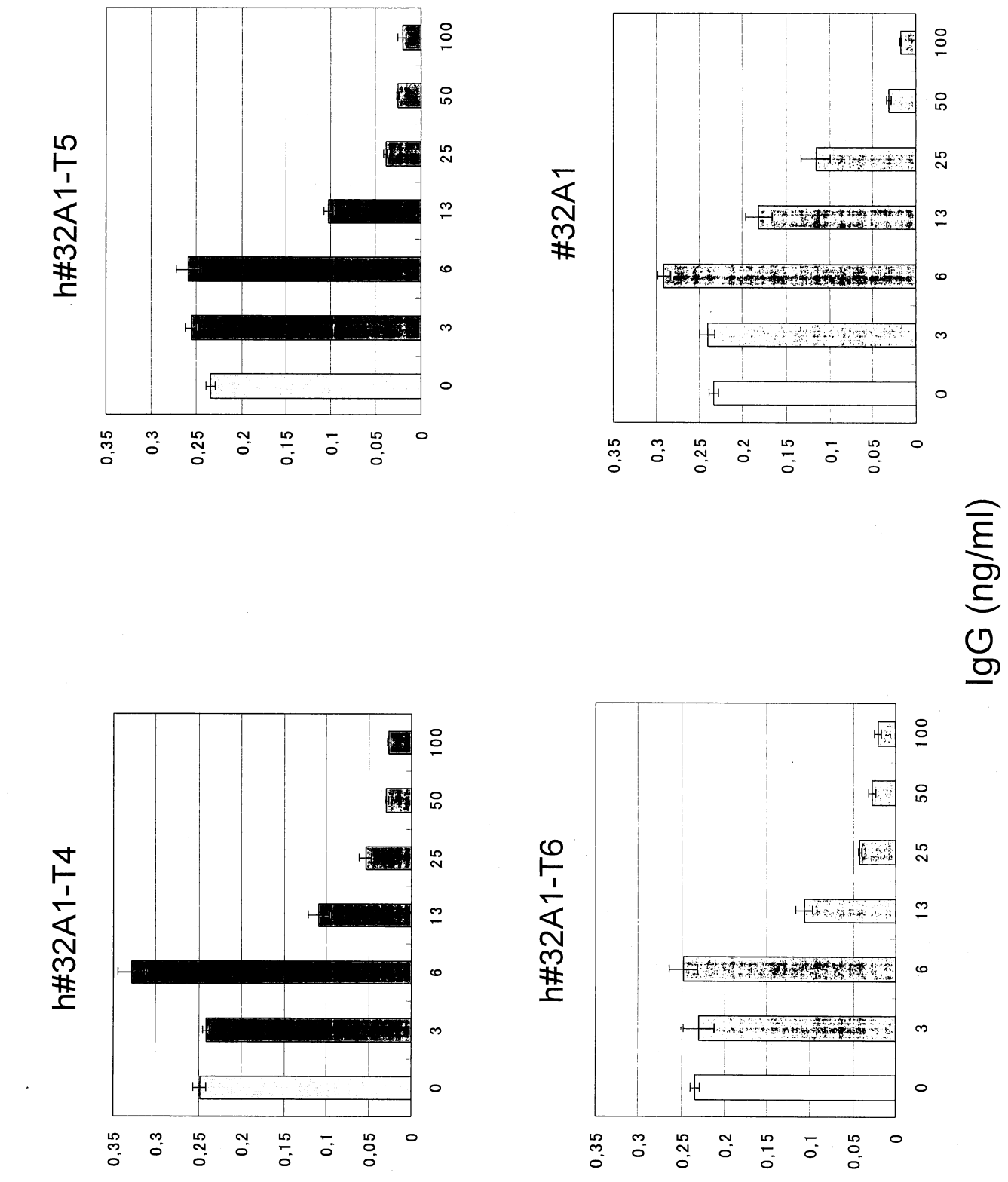

h#32A1-T5
#32A1
h#32A1-T4
h#32A1-T6
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
3
6
13
25
50
100
Hoạt tính TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)

Fig.45

Fig.46

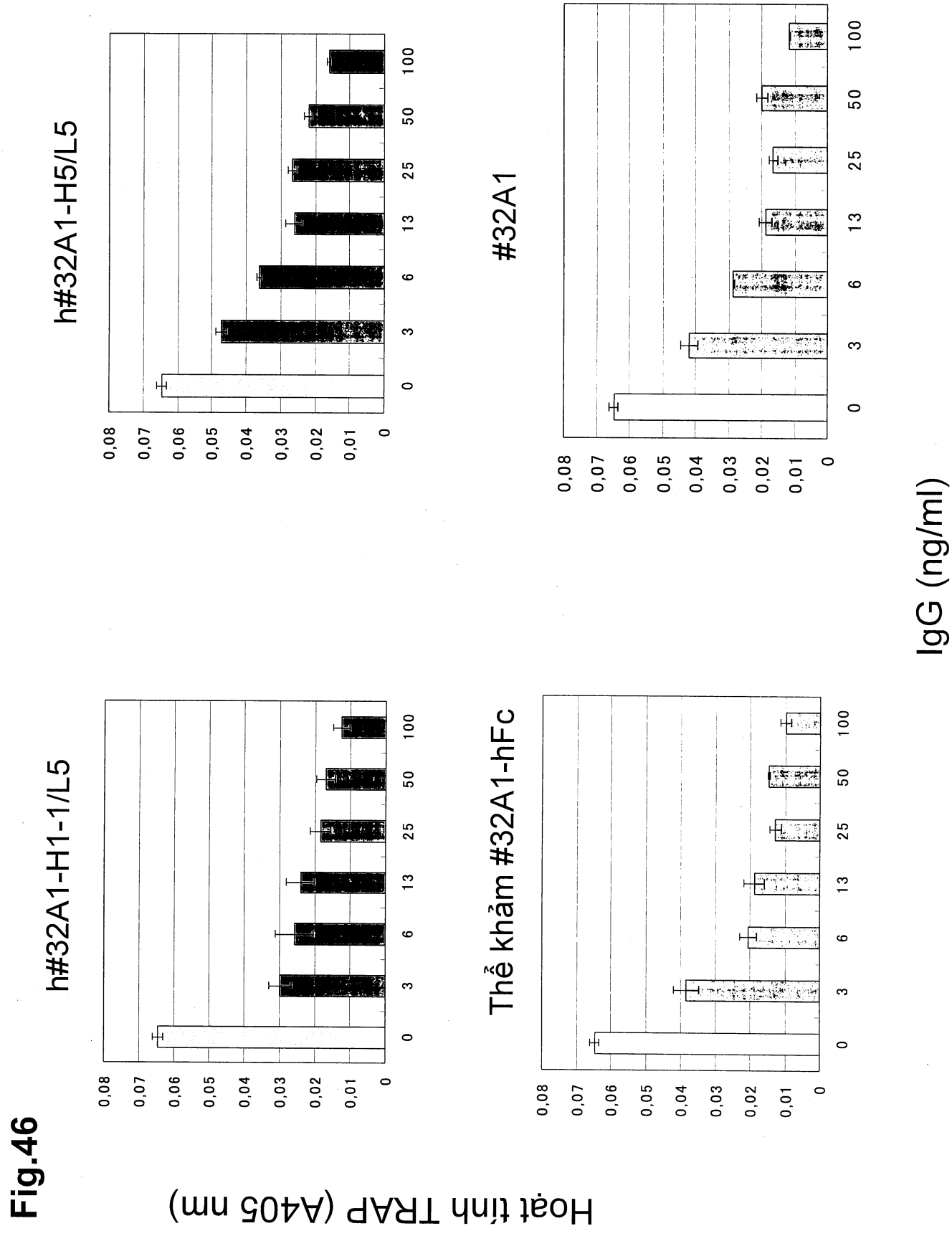

h#32A1-H1-1/L5
h#32A1-H5/L5
Thể khảm #32A1-hFc
#32A1
Hoạt tính TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
0
3
6
13
25
50
100

Fig.47

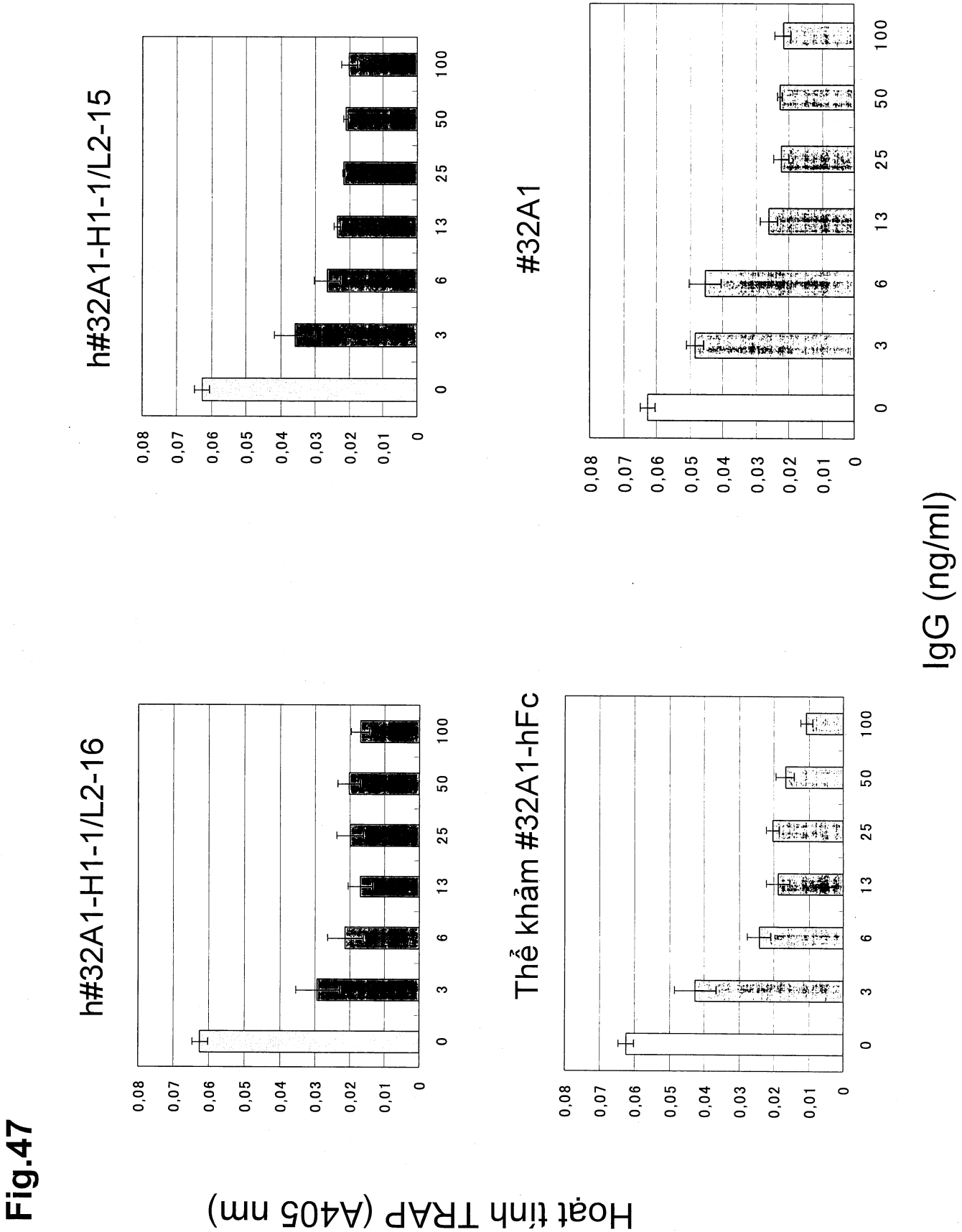
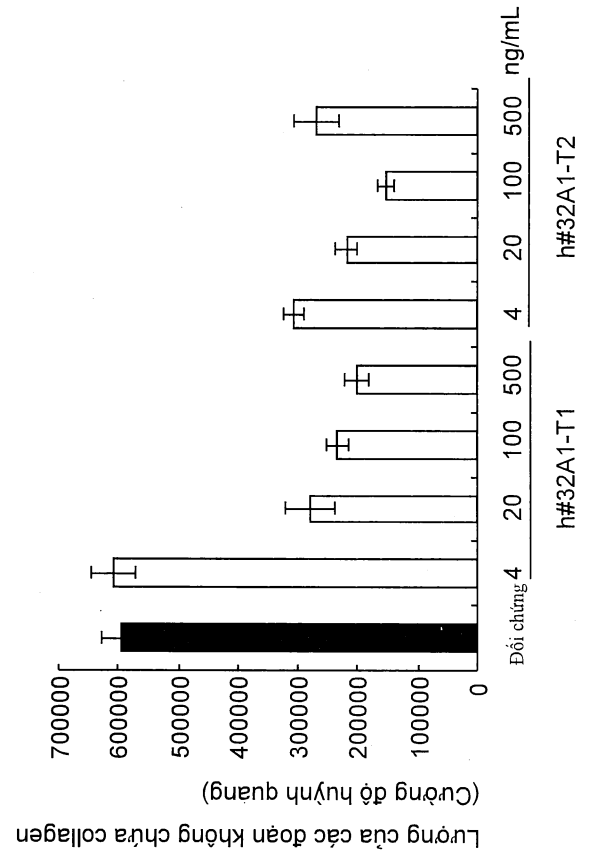
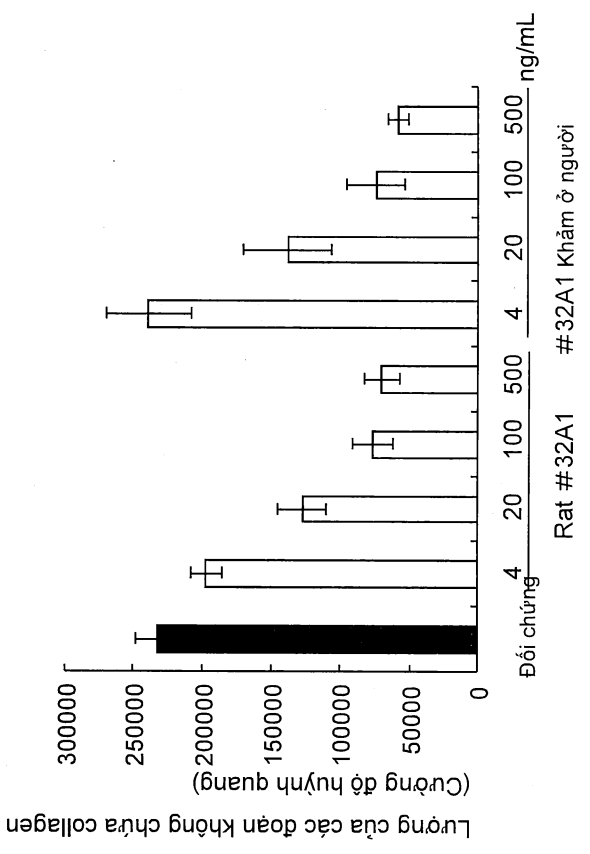
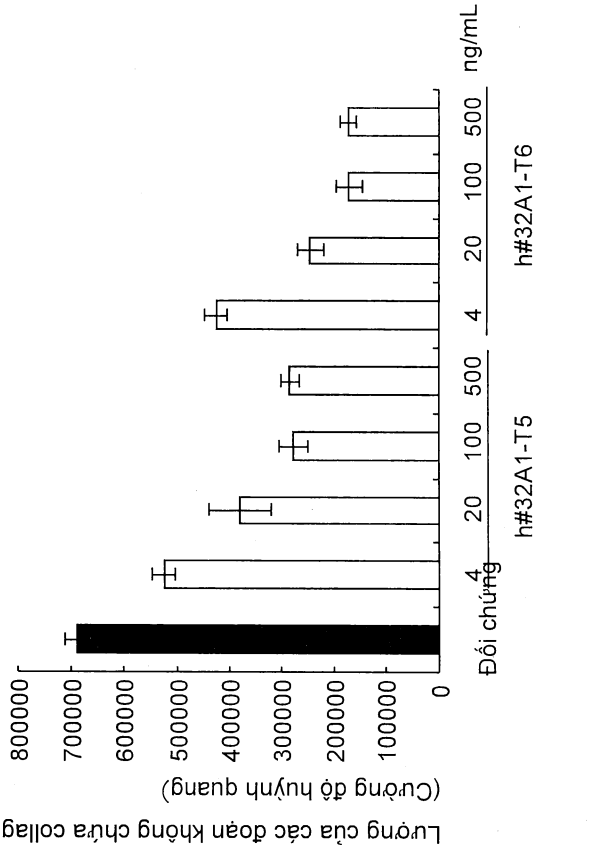

h#32A1-H1-1/L2-15
#32A1
h#32A1-H1-1/L2-16
Thể khảm #32A1-hFc
Hoạt tính TRAP (A405 nm)
IgG (ng/ml)
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
0
3
6
13
25
50
100

Fig.48


Lượng của các đoạn không chứa collagen
(Cường độ huỳnh quang)
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Đối chứng
4
20
100
500
ng/mL
h#32A1-T1
h#32A1-T2


Lượng của các đoạn không chứa collagen
(Cường độ huỳnh quang)
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Đối chứng
4
20
100
500
ng/mL
Rat #32A1
#32A1 Khảm ở người


Lượng của các đoạn không chứa collagen
(Cường độ huỳnh quang)
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Đối chứng
4
20
100
500
ng/mL
h#32A1-T5
h#32A1-T6

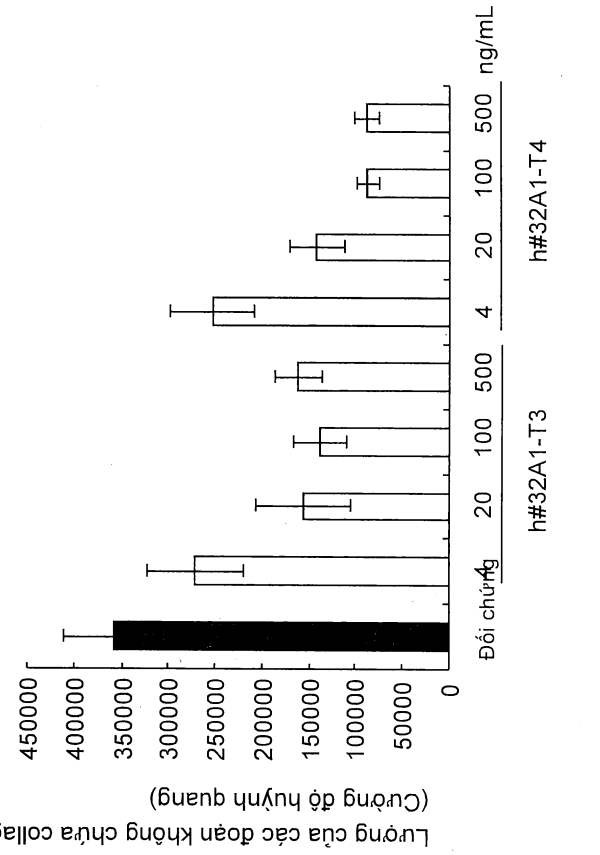
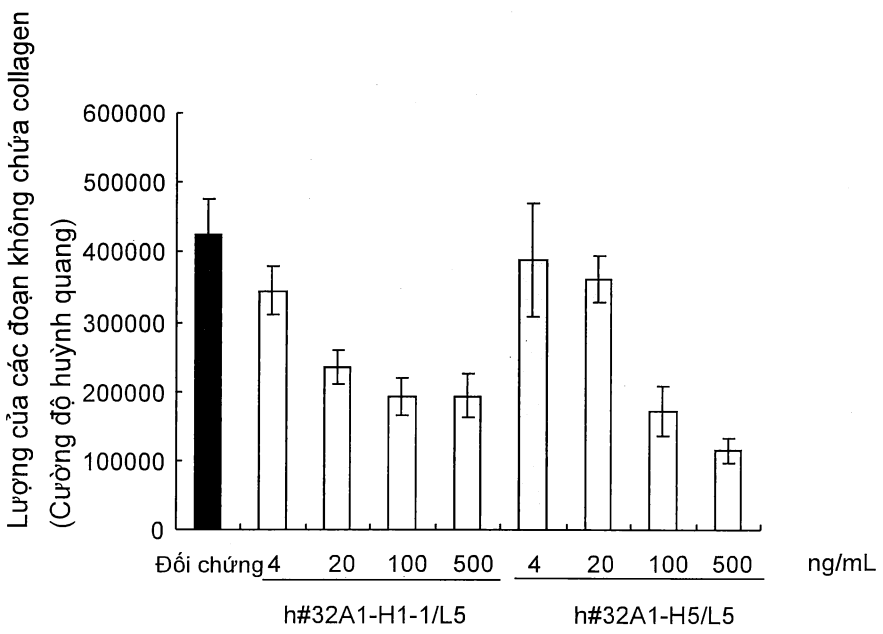

Lượng của các đoạn không chứa collagen
(Cường độ huỳnh quang)
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Đối chứng
4
20
100
500
ng/mL
h#32A1-T3
h#32A1-T4

Fig.49


Lượng của các đoạn không chứa collagen
(Cường độ huỳnh quang)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Đối chứng
4
20
100
500
4
20
100
500
ng/mL
h#32A1-H1-1/L5
h#32A1-H5/L5

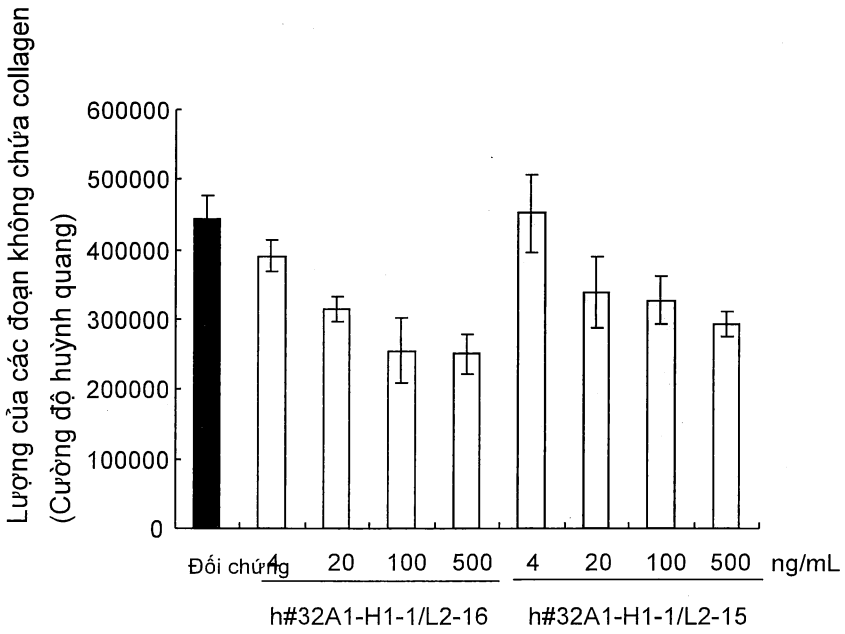

Lượng của các đoạn không chứa collagen
(Cường độ huỳnh quang)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Đối chứng
4
20
100
500
4
20
100
500
ng/mL
h#32A1-H1-1/L2-16
h#32A1-H1-1/L2-15

Fig.50

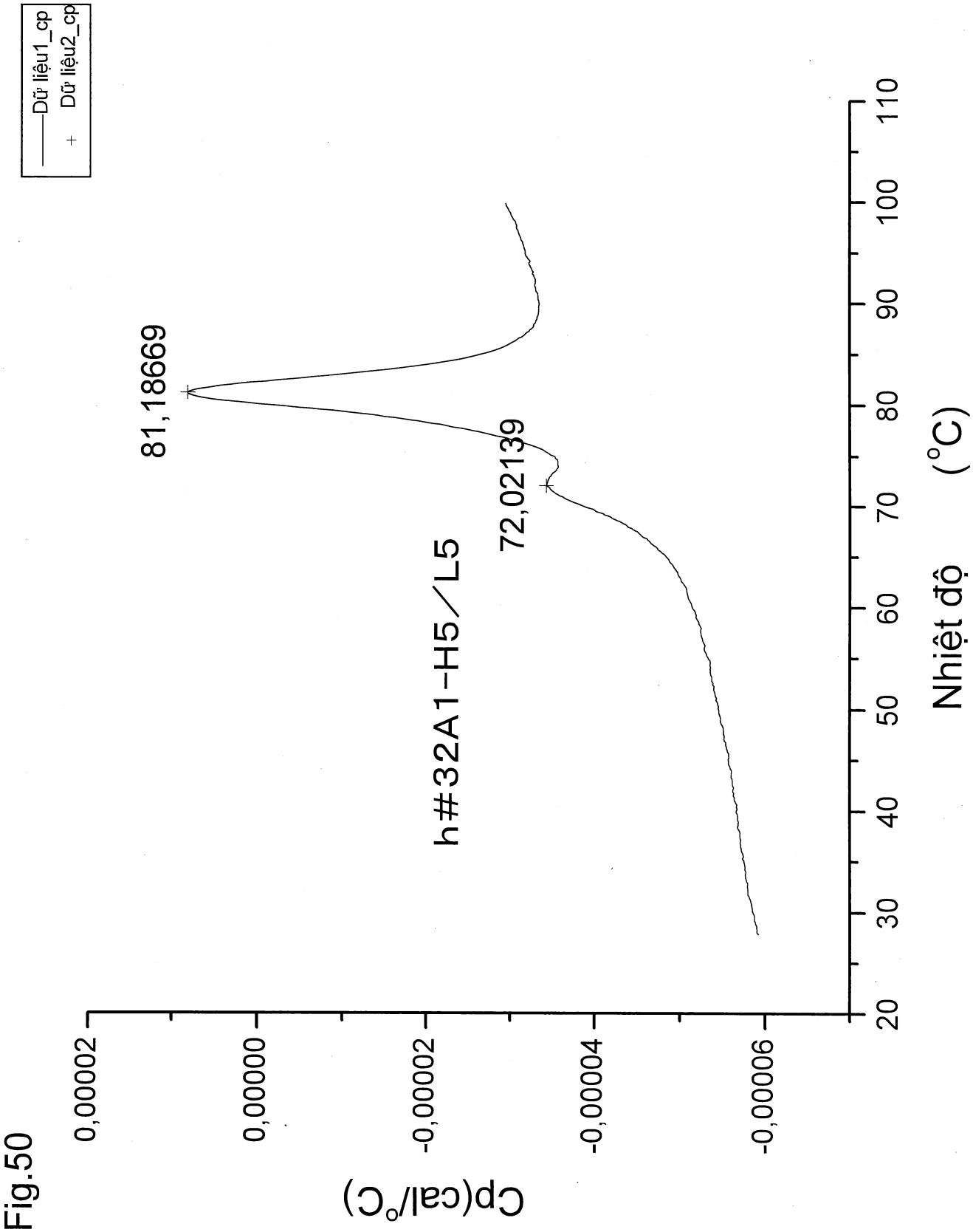
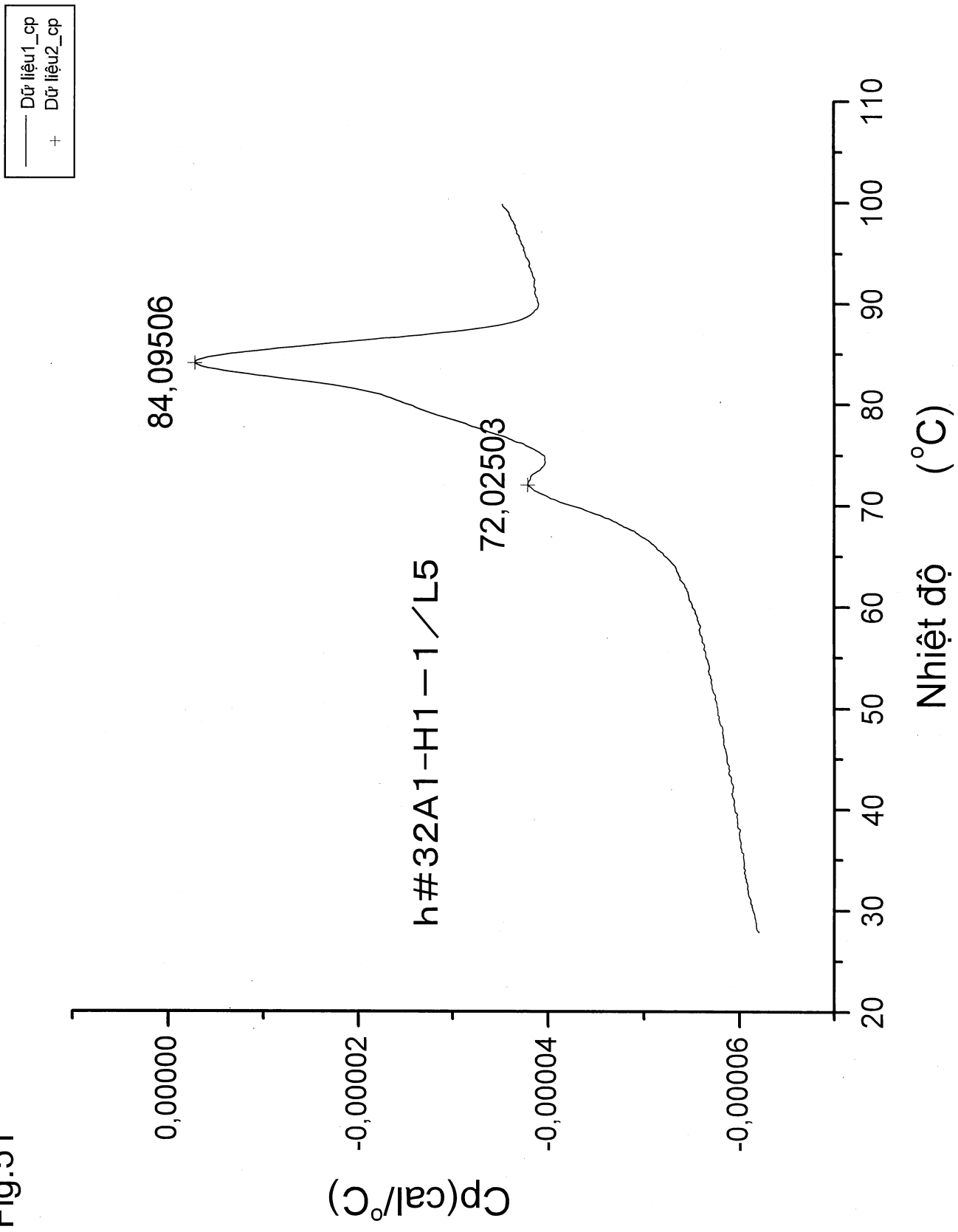

Dữ liệu1_cp
Dữ liệu2_cp
81,18669
72,02139
h#32A1-H5／L5
0,00002
0,00000
-0,00002
-0,00004
-0,00006
Cp(cal/°C)
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Nhiệt độ (°C)

Fig.51


Dữ liệu1_cp
Dữ liệu2_cp
84,09506
72,02503
h#32A1-H1-1/L5
0,00000
-0,00002
-0,00004
-0,00006
Cp(cal/°C)
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Nhiệt độ (°C)

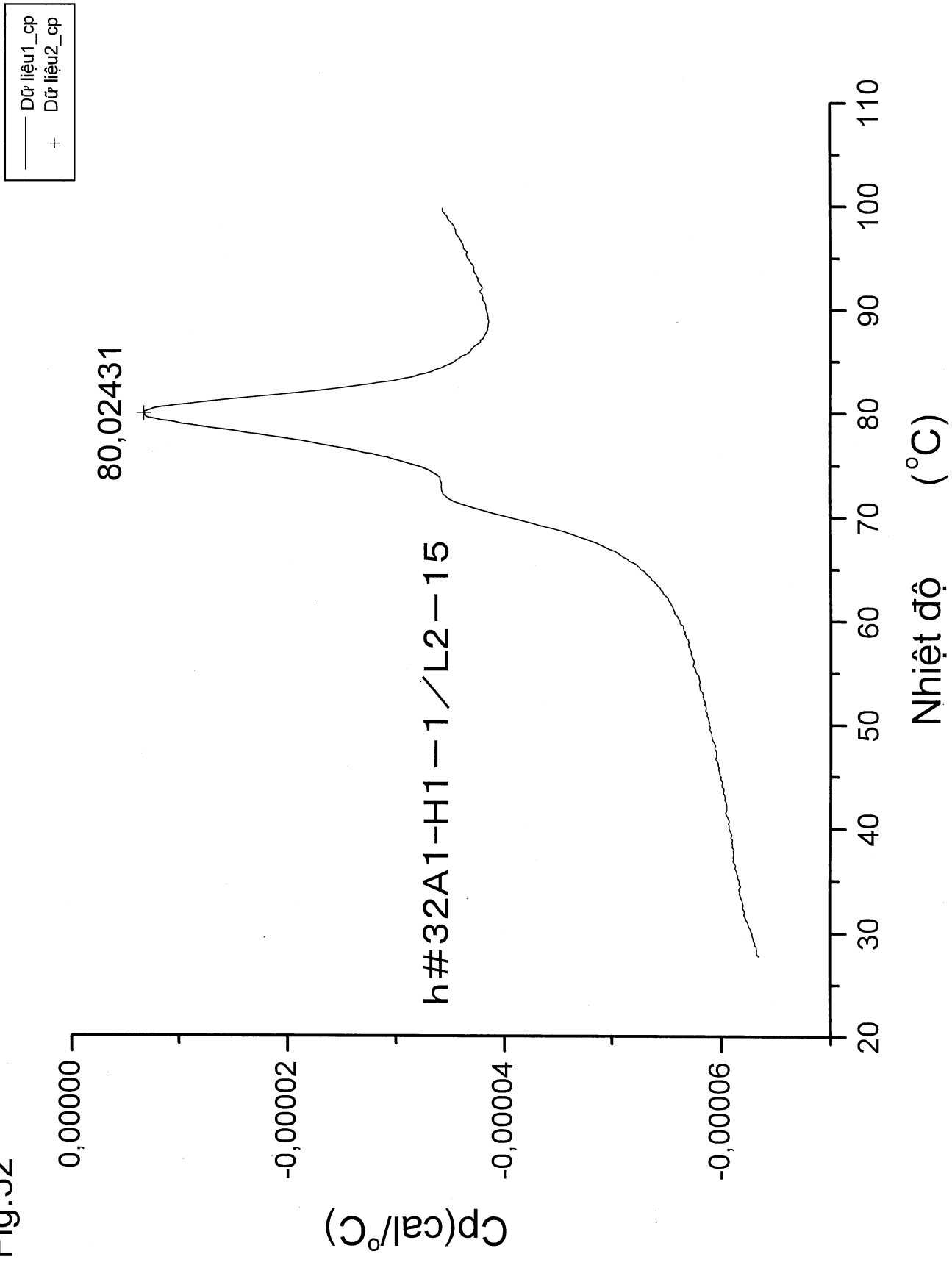

Dữ liệu1_cp
Dữ liệu2_cp
80,02431
h#32A1-H1—1／L2—15
Cp(cal/°C)
0,00000
-0,00002
-0,00004
-0,00006
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Nhiệt độ (°C)

Fig.52

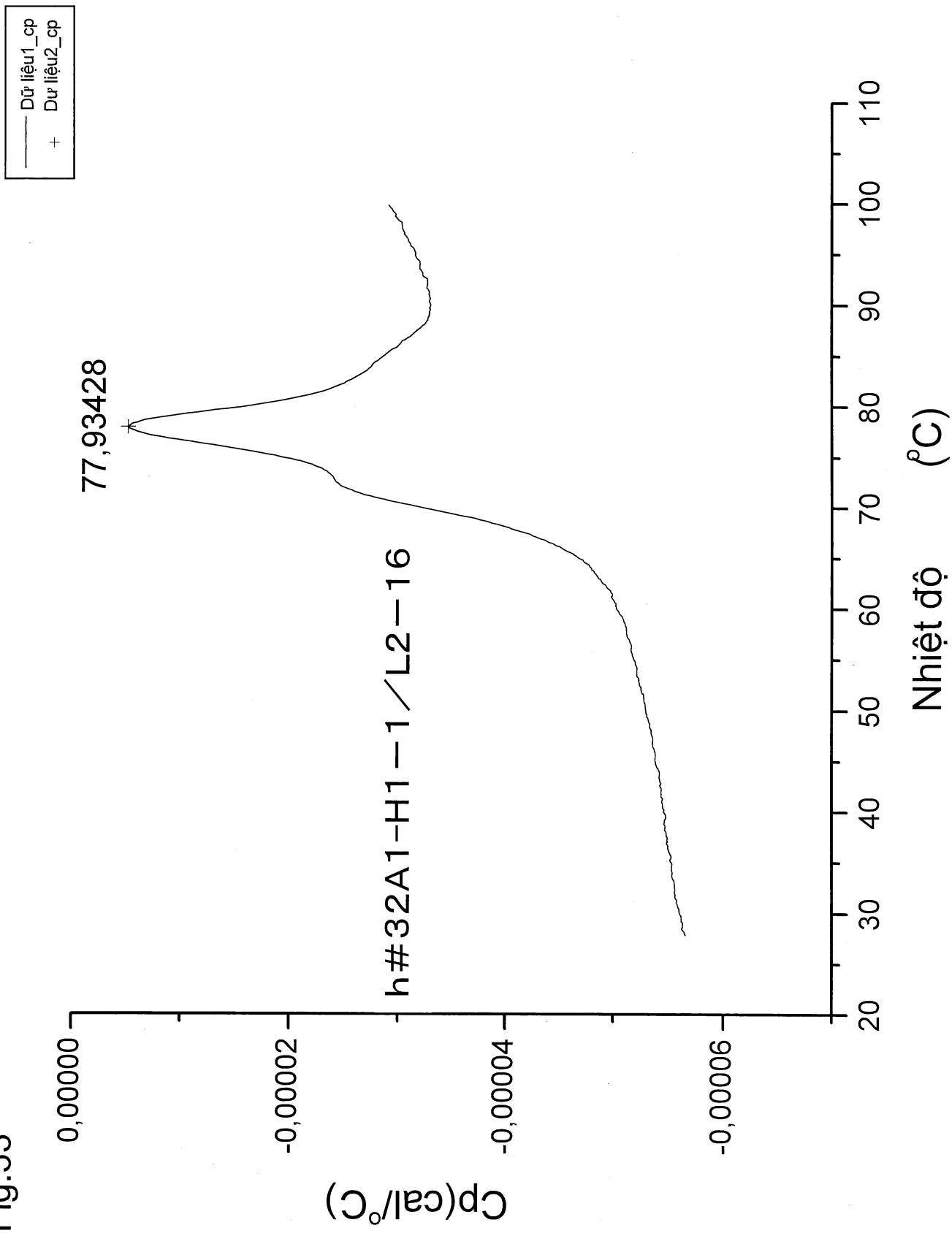

Dữ liệu1_cp
Dữ liệu2_cp
77,93428
h#32A1-H1-1/L2-16
Cp(cal/°C)
0,00000
-0,00002
-0,00004
-0,00006
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Nhiệt độ (°C)

Fig.53

Fig.54

SEQ ID NO:98: Trình tự nucleotit của h#32A1-H1-1

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTCC
AGCTTGTGGAAAGCGGAGGGGGACTCGTTCAGCCAGGAGGCTCTCTGCGCCTGTCATGCGCTGC
CAGCGGATTTAATTTCAATGATTATTTTATGAACTGGGTCAGGCAGGCTCCGGGAAAAGGGCTG
GAATGGGTCGCCCAGATCAGAAACAAGATCTATACTTACGCTACATTCTACGCCGCATCTGTAA
AGGGGAGGTTTACAATTAGTCGCGACAATGCAAAAAATAGTCTGTATCTCCAAATGAACTCCCT
CCGCGCAGAGGATACTGCTGTCTACTACTGCGCCAGGTCCTTGACTGGCGGCGACTATTTTGAT
TACTGGGGACAGGGCACCCTGGTGACGGTGAGCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCC
CTCTGGCCCCTTGTAGCCGTTCCACCAGCGAGTCCACCGCCGCCCTTGGCTGTCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACTCCGGAGCCCTTACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTTTACTCCCTGAGCTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCT
CCAACTTCGGCACCCAAACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGACCGTGGAGCGTAAGTGTTGTGTGGAGTGTCCTCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCCGGA
CCTTCCGTGTTCCTTTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGTACCCCTGAGG
TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGTGAGGAGCAATTCAACAGCACCTTCCGT
GTGGTGTCCGTGCTTACCGTGGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGG
TGAGCAACAAGGGACTTCCTGCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGCCAACCTCG
TGAGCCTCAAGTGTACACCCTTCCTCCTAGCCGTGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTT
ACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAAC
CTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTTGACAGCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAG
CAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTTGGCAACAAGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAAAAGAGCCTTTCCCTGAGCCCTGGAAAG

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-420), Vùng bất biến (421-1398)

SEQ ID NO:99: Trình tự axit amin của h#32A1-H1-1

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAASVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-140), Vùng bất biến (141-466)

Fig.55

SEQ ID NO:100: Trình tự nucleotit của h#32A1-H5

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGC
AGGTGGTGGAGAGCGGCGGCGGACTTGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTTAGCTGTGCCAC
CTCCGGCTTCAACTTCAACGACTACTTCATGAACTGGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTG
GAGTGGGTGGCCCAGATCAGAAACAAGATCTACACCTACGCCACCTTCTACGCCGAGAGCCTTG
AGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGTCCACCGTGTACCTTCAGATGAACTCCCT
GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTACCAGAAGCCTTACCGGCGGCGACTACTTCGAC
TACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCTCAGCCAGCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCC
CTCTGGCCCCTTGTAGCCGTTCCACCAGCGAGTCCACCGCCGCCCTTGGCTGTCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACTCCGGAGCCCTTACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTTTACTCCCTGAGCTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCT
CCAACTTCGGCACCCAAACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGA
CAAGACCGTGGAGCGTAAGTGTTGTGTGGAGTGTCCTCCTTGTCCTGCCCCTCCTGTGGCCGGA
CCTTCCGTGTTCCTTTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGTACCCCTGAGG
TGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGTGAGGAGCAATTCAACAGCACCTTCCGT
GTGGTGTCCGTGCTTACCGTGGTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGG
TGAGCAACAAGGGACTTCCTGCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGACCAAGGGCCAACCTCG
TGAGCCTCAAGTGTACACCCTTCCTCCTAGCCGTGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTT
ACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAAC
CTGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTATGCTTGACAGCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAG
CAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGTTGGCAACAAGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAAAAGAGCCTTTCCCTGAGCCCTGGAAAG

Trình tự tín hiệu (1-57), Vùng biến đổi (58-420), Vùng bất biến (421-1398)

SEQ ID NO:101: Trình tự axit amin của h#32A1-H5

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPGKGL
EWVAQIRNKIYTYATFYAESLEGRFTISRDNSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSLTGGDYFD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự tín hiệu (1-19), Vùng biến đổi (20-140), Vùng bất biến (141-466)

Fig.56

SEQ ID NO:102: Trình tự nucleotit của h#32A1-L2-15

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGAAA
TTCTGATGACGCAGAGTCCTGCAACTCTTAGTCTGTCACCTGGCGAGAGAGCCACACTCAGCTG

CCGAGCGTCCCAGTCCGTGACCATTAGCGGCTATTCTTTTATTCATTGGTATCAGCAAAAGCCT
GGACAGGCGCCAAGGCTGCTCATTTACAGAGCAAGCAACCTTGCCTCTGGCATTCCAGCAAGAT
TCAGCGGGAGCGGATCAGGGACAGATTTCACCTTGACCATCTCCTCCCTGGAGCCGGAGGATTT
CGCGTTGTATTATTGTCAGCAATCTAGGAAGAGTCCATGGACATTTGGCCAGGGCACCAAAGTG
GAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Trình tự tín hiệu (1-60), Vùng biến đổi (61-399), Vùng bất biến (400-714)

SEQ ID NO:103: Trình tự axit amin của h#32A1-L2-15

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQAPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYYCQQSRKSPWTFGQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu (1-20), Vùng biến đổi (21-133), Vùng bất biến (134-238)

Fig.57

SEQ ID NO:104: Trình tự nucleotit của h#32A1-L2-16

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCATATGGCGAAA
TCCTGATGACACAGAGTCCTGCGACCCTCTCCCTCTCACCAGGCGAGAGGGCCACCCTGTCTTG
TAGAGCCAGCCAGTCAGTCACTATTAGTGGATACTCATTTATCCATTGGTATCAACAGAAACCA
GGACAGGCGCCTCGGCTTCTGATCTACCGCGCCTCAAACCTTGCCTCTGGCATCCCCGCGAGGT
TCTCTGGCTCTGGCAGCGGTACCGATTTTACACTGACTATCTCAAGCCTCGAACCTGAAGACTT
CGCACTGTACTTTTGCCAGCAGAGCAGGAAGTCCCCCTGGACTTTTGCACAGGGAACCAAAGTC
GAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTCATCTTCCCCCCCTCCGACGAGCAGCTGA
AGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCA
GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACAG
GGGGGAGTGT

Trình tự tín hiệu （1-60）, Vùng biến đổi （61-399）, constant Region （400-714）

SEQ ID NO:105: Trình tự axit amin của h#32A1-L2-16

MVLQTQVFISLLLWISGAYGEILMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVTISGYSFIHWYQQKP
GQAPRLLIYRASNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFALYFCQQSRKSPWTFAQGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Trình tự tín hiệu （1-20）, Vùng biến đổi （21-133）, constant Region （134-238）

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> Kháng thể kháng Siglec-15 và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> DSPCT-FP1021

<150> JP 2009-94613
<151> 2009-04-09

<160> 106

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 987
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(987)
<223> Tác giả: Hiruma, Yoshiharu; Tsuda, Eisuke
<223> Tác giả: Takizawa, Takeshi; Nakayama, Makiko

<400> 1

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg       48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                  10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc       96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg      144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc      192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc      240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct      288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc      336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc      384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
```

```
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc      480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag      576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg gcc tcg acg gtc gcc ctc ctg ctc ggc gct ctc ggc      816
Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly
            260                 265                 270

ttc aag gcg ctg ctg ctg ctc ggg gtc ctg gcc gcc cgc gct gcc cgc      864
Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg
        275                 280                 285

cgc cgc cca gag cat ctg gac acc ccg gac acc cca cca cgg tcc cag      912
Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln
    290                 295                 300

gcc cag gag tcc aat tat gaa aat ttg agc cag atg aac ccc cgg agc      960
Ala Gln Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Asn Pro Arg Ser
305                 310                 315                 320

cca cca gcc acc atg tgc tca ccg tga                                  987
Pro Pro Ala Thr Met Cys Ser Pro
                325
```

<210> 2
<211> 328
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
```

```
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

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

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly
            260                 265                 270

Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg
        275                 280                 285

Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln
    290                 295                 300

Ala Gln Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Asn Pro Arg Ser
305                 310                 315                 320

Pro Pro Ala Thr Met Cys Ser Pro
                325
```

<210> 3
<211> 1026

<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1026)

<400> 3

```
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag       48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                  10                  15

atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc       96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg      144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc      192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc      240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc      288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc      336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc      384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc      480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag      576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg      672
```

```
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc      720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga acc tcg acc cta gcg ctc ctg ctg ggc gcg ctg ggc ctc aag      816
Pro Gly Thr Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly Leu Lys
            260                 265                 270

gcc ttg ctg ctg ctt ggc att ctg gga gcg cgt gcc acc cga cgc cga      864
Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Gly Ala Arg Ala Thr Arg Arg Arg
        275                 280                 285

cta gat cac ctg gtc ccc cag gac acc cct cca cgg tct cag gct cag      912
Leu Asp His Leu Val Pro Gln Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln Ala Gln
    290                 295                 300

gag tcc aat tat gaa aat ttg agc cag atg agt cct cca ggc cac cag      960
Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Ser Pro Pro Gly His Gln
305                 310                 315                 320

ctg cca cgt gtt tgc tgt gag gaa ctc ctc agc cat cac cat cta gtc     1008
Leu Pro Arg Val Cys Cys Glu Glu Leu Leu Ser His His His Leu Val
                325                 330                 335

att cac cat gag aaa taa                                            1026
Ile His His Glu Lys
            340
```

<210> 4
<211> 341
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

```
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
```

```
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Gly Thr Ser Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly Leu Lys
            260                 265                 270

Ala Leu Leu Leu Leu Gly Ile Leu Gly Ala Arg Ala Thr Arg Arg Arg
        275                 280                 285

Leu Asp His Leu Val Pro Gln Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln Ala Gln
    290                 295                 300

Glu Ser Asn Tyr Glu Asn Leu Ser Gln Met Ser Pro Pro Gly His Gln
305                 310                 315                 320

Leu Pro Arg Val Cys Cys Glu Glu Leu Leu Ser His His His Leu Val
                325                 330                 335

Ile His His Glu Lys
            340
```

<210> 5
<211> 774
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(774)

<400> 5

```
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag      48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15
```

```
atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc        96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg       144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc       192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc       240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc       288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc       336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc       384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg       432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc       480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg       528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag       576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc       624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg       672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc       720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc       768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga                                                              774
```

Pro Gly

<210> 6
<211> 258
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1 5 10 15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
20 25 30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
35 40 45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
50 55 60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65 70 75 80

Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
85 90 95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
100 105 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
130 135 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145 150 155 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
165 170 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
195 200 205

Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225 230 235 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
245 250 255

Pro Gly

<210> 7
<211> 55
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR của cADN Siglec-15 chuột hòa tan

<400> 7
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatggag gggtccctcc aactc 55

<210> 8
<211> 55
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR của cADN Siglec-15 chuột hòa tan

<400> 8
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tccgggggcg ccgtggaagc ggaac 55

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mồi của cADN Siglec-15 chuột hòa tan

<400> 9
tgcgtgaagg tgcagggcag 20

<210> 10
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mồi của cADN Siglec-15 chuột hòa tan

<400> 10
cctcgcctgg tcgggtc 17

<210> 11
<211> 891
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cADN Siglec-15 chuột đích His

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(891)

<400> 11
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag 48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1 5 10 15

```
atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc       96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg      144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc      192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc      240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc      288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc      336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc      384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc      480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag      576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg      672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc      720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc gaa ggt cgt      816
```

```
Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu Gly Arg
            260                 265                 270

ggg ggt aag cct atc cct aac cct ctc ctc ggt ctc gat tct acg cgt      864
Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg
        275                 280                 285

acc ggt cat cat cac cat cac cat tga                                  891
Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> 12
<211> 296
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

```
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
```

```
    210                 215                 220

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu Gly Arg
            260                 265                 270

Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg
        275                 280                 285

Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> 13
<211> 1512
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cADN Siglec-15 chuột dung hợp Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1512)

<400> 13

```
atg gag ggg tcc ctc caa ctc ctg gcc tgc ttg gcc tgt gtg ctc cag      48
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

atg gga tcc ctt gtg aaa act aga aga gac gct tcg ggg gat ctg ctc      96
Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gcg cac agt gcc ccg gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg     144
Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

ccc gcg gag gtg aac gcg gag gct ggc gac gcg gcg gtg ctg ccc tgc     192
Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc     240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc tcg ggc gag ccg tac gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc acc     288
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

gcg gcg ccg ggc agc gag ctg tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc     336
Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgc ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctg tcc ctg cgc     384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125
```

```
gtc gag cgc ctc gcc ctg gcg gac agc ggc cgc tac ttc tgc cgc gtg      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc acc ggc gac gcc cac gat cgc tat gag agt cgc cat ggg gtc      480
Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgt ctg cgc gtg act gct gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccg ggc ccc gcg cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc acc gcc gag ggg gag      576
Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccc ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcg ggt ccc gcc cca ggc aac agc tcc      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

gct gcc ctg cag ggc cag ggt cac ggc tac cag gtg acc gcc gag ttg      672
Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

ccc gcg ctg acc cgc gac ggc cgc tac acg tgc acg gcg gcc aat agc      720
Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg ggc cgc gcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cac ggc gcc      768
Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

ccc gga gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc cag gca gag      816
Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln Ala Glu
            260                 265                 270

ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct      864
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        275                 280                 285

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag      912
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    290                 295                 300

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg      960
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305                 310                 315                 320

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac     1008
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                325                 330                 335

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac     1056
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
            340                 345                 350

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac     1104
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        355                 360                 365
```

```
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc     1152
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    370                 375                 380

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga     1200
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385                 390                 395                 400

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag     1248
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                405                 410                 415

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac     1296
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            420                 425                 430

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1344
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        435                 440                 445

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc     1392
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    450                 455                 460

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1440
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465                 470                 475                 480

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc     1488
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                485                 490                 495

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                                    1512
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            500
```

<210> 14
<211> 503
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

```
Met Glu Gly Ser Leu Gln Leu Leu Ala Cys Leu Ala Cys Val Leu Gln
1               5                   10                  15

Met Gly Ser Leu Val Lys Thr Arg Arg Asp Ala Ser Gly Asp Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Ala His Ser Ala Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Ala Glu Val Asn Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80
```

```
Trp Arg Ser Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Thr
                85                  90                  95

Ala Ala Pro Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Ser Gly Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Thr Gly Asp Ala His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu Arg Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Gly Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Pro Gly Asn Ser Ser
        195                 200                 205

Ala Ala Leu Gln Gly Gln Gly His Gly Tyr Gln Val Thr Ala Glu Leu
    210                 215                 220

Pro Ala Leu Thr Arg Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala Asn Ser
225                 230                 235                 240

Leu Gly Arg Ala Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His Gly Ala
                245                 250                 255

Pro Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln Ala Glu
            260                 265                 270

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
        275                 280                 285

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
    290                 295                 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305                 310                 315                 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
                325                 330                 335

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
        355                 360                 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
    370                 375                 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385                 390                 395                 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
```

```
                405                 410                 415

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
            420                 425                 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
        435                 440                 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
    450                 455                 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465                 470                 475                 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                485                 490                 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            500
```

<210> 15
<211> 780
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDR
<222> (1)..(780)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(780)

<400> 15

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg       48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc       96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg      144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc      192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc      240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct      288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc      336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110
```

```
cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc      384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc      480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag      576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg                                                     780
Gly Ala Ser Gly
            260
```

<210> 16
<211> 260
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
```

65 70 75 80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
85 90 95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
100 105 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
115 120 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
130 135 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145 150 155 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
165 170 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
180 185 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
195 200 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
210 215 220

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

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
245 250 255

Gly Ala Ser Gly
260

<210> 17
<211> 56
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR của cADN Siglec-15 người hòa tan

<400> 17
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatggaa aagtccatct ggctgc 56

<210> 18
<211> 52
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR của cADN Siglec-15 người hòa tan

<400> 18
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc cccgctggcg ccatggaagc gg 52

<210> 19

<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cADN Siglec-15 người đích His

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 19

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg       48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                  10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc       96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg      144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc      192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc      240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct      288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc      336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc      384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc      480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag      576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
```

```
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc gaa      816
Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu
            260                 265                 270

ggt cgt ggg ggt aag cct atc cct aac cct ctc ctc ggt ctc gat tct      864
Gly Arg Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
        275                 280                 285

acg cgt acc ggt cat cat cac cat cac cat tga                          897
Thr Arg Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> 20
<211> 298
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125
```

```
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

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

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Glu
            260                 265                 270

Gly Arg Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
        275                 280                 285

Thr Arg Thr Gly His His His His His His
    290                 295
```

<210> 21
<211> 1518
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cADN Siglec-15 người dung hợp Fc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1518)

<400> 21

```
atg gaa aag tcc atc tgg ctg ctg gcc tgc ttg gcg tgg gtt ctc ccg       48
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                   10                  15

aca ggc tca ttt gtg aga act aaa ata gat act acg gag aac ttg ctc       96
Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

aac aca gag gtg cac agc tcg cca gcg cag cgc tgg tcc atg cag gtg      144
Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

cca ccc gag gtg agc gcg gag gca ggc gac gcg gca gtg ctg ccc tgc      192
Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60
```

```
acc ttc acg cac ccg cac cgc cac tac gac ggg ccg ctg acg gcc atc      240
Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

tgg cgc gcg ggc gag ccc tat gcg ggc ccg cag gtg ttc cgc tgc gct      288
Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

gcg gcg cgg ggc agc gag ctc tgc cag acg gcg ctg agc ctg cac ggc      336
Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

cgc ttc cgg ctg ctg ggc aac ccg cgc cgc aac gac ctc tcg ctg cgc      384
Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

gtc gag cgc ctc gcc ctg gct gac gac cgc cgc tac ttc tgc cgc gtc      432
Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

gag ttc gcc ggc gac gtc cat gac cgc tac gag agc cgc cac ggc gtc      480
Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

cgg ctg cac gtg aca gcc gcg ccg cgg atc gtc aac atc tcg gtg ctg      528
Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

ccc agt ccg gct cac gcc ttc cgc gcg ctc tgc act gcc gaa ggg gag      576
Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

ccg ccg ccc gcc ctc gcc tgg tcc ggc ccg gcc ctg ggc aac agc ttg      624
Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

gca gcc gtg cgg agc ccg cgt gag ggt cac ggc cac cta gtg acc gcc      672
Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

gaa ctg ccc gca ctg acc cat gac ggc cgc tac acg tgt acg gcc gcc      720
Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
225                 230                 235                 240

aac agc ctg ggc cgc tcc gag gcc agc gtc tac ctg ttc cgc ttc cat      768
Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

ggc gcc agc ggg gac cca gct ttc ttg tac aaa gtg gtt gat atc cag      816
Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln
            260                 265                 270

gca gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca      864
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
        275                 280                 285

gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa      912
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
    290                 295                 300
```

```
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg      960
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
305                 310                 315                 320

gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac     1008
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
                325                 330                 335

gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag     1056
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
            340                 345                 350

cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac     1104
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
        355                 360                 365

cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa     1152
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
    370                 375                 380

gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag     1200
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385                 390                 395                 400

ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg     1248
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
                405                 410                 415

acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc     1296
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
            420                 425                 430

agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac     1344
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
        435                 440                 445

tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc     1392
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
    450                 455                 460

tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc     1440
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465                 470                 475                 480

ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag     1488
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
                485                 490                 495

aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa                             1518
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            500                 505
```

<210> 22
<211> 505
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22

```
Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
1               5                  10                  15

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
        35                  40                  45

Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
    50                  55                  60

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
65                  70                  75                  80

Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
            100                 105                 110

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
        115                 120                 125

Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
    130                 135                 140

Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
145                 150                 155                 160

Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
                165                 170                 175

Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
            180                 185                 190

Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
        195                 200                 205

Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
    210                 215                 220

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

Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
                245                 250                 255

Gly Ala Ser Gly Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Asp Ile Gln
            260                 265                 270

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
        275                 280                 285

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
    290                 295                 300

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
305                 310                 315                 320
```

```
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
                325                 330                 335

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
            340                 345                 350

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
        355                 360                 365

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
    370                 375                 380

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
385                 390                 395                 400

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
                405                 410                 415

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
            420                 425                 430

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
        435                 440                 445

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
    450                 455                 460

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
465                 470                 475                 480

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
                485                 490                 495

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            500                 505
```

<210> 23
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR của cADN chuỗi nặng của kháng thể #32A1 chuột

<400> 23
ggccgggtgg gctacgttgc aggtgacggt ctg 33

<210> 24
<211> 35
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi PCR của cADN chuỗi nhẹ của kháng thể #32A1 chuột

<400> 24
catgctgtac gtgctgtctt tgctgtcctg atcag 35

<210> 25
<211> 29
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mồi PCR của cADN chuỗi nặng của kháng thể #32A1 chuột

<400> 25
ctccagagtt ccaggtcacg gtgactggc 29

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mồi PCR của cADN chuỗi nhẹ của kháng thể #32A1 chuột

<400> 26
tccagttgct aactgttccg 20

<210> 27
<211> 501
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDA
<222> (1)..(501)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(501)

<400> 27
atg aag ttg tgg ttg agc tgg ata ttc ctt gtt gtt ctt ttc aaa ggt 48
Met Lys Leu Trp Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Val Leu Phe Lys Gly
1 5 10 15

gtg agg tgt gag gtg caa att ttg gag act gga gga ggc ttg gtg aag 96
Val Arg Cys Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

ccc ggt ggt tcc ctg aga ctg tct tgt gca acg tct gga ttc aat ttc 144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
35 40 45

aat gat tat ttc atg aac tgg gtc cgt cag gct cca gaa aag ggg cta 192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

gag tgg gtt gct caa ata agg aac aaa att tat act tat gcc aca ttt 240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65 70 75 80

tat gcg gag tct ttg gaa ggc aga gtc aca atc tca cga gac gat tcc 288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

gaa agc agt gtc tac ctg caa gtg agc agt tta aga gct gaa gac act 336
Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

```
gcc att tat tac tgt aca aga tcc cta act ggg gga gac tac ttt gat      384
Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc tcc tta gct gaa aca aca      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Leu Ala Glu Thr Thr
    130                 135                 140

gcc cca tct gtc tat cca ctg gct cct gga act gct ctc aaa agt aac      480
Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn
145                 150                 155                 160

tcc atg gtg acc ctg gga tgc                                         501
Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
                165
```

<210> 28
<211> 167
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 28

```
Met Lys Leu Trp Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Val Leu Phe Lys Gly
1               5                   10                  15

Val Arg Cys Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Leu Ala Glu Thr Thr
    130                 135                 140

Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn
145                 150                 155                 160

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys
                165
```

<210> 29
<211> 417
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(417)

<400> 29
atg gag aca gac aga ctc ctg cta tgg gca ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

ggc tcc act ggt gac att gtc ttg acc cag tct cct gct ttg gct gtg 96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
20 25 30

tct cta ggg cag agg gcc aca atc tcc tgt agg gcc agc caa agt gtc 144
Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

act att tct gga tat agt ttt ata cac tgg tac caa cag aaa cca gga 192
Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

cag caa ccc aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gcc tct ggg 240
Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

atc ccg gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc 288
Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

acc atc aat cct gtg cag gct gat gat att gca acc tat ttc tgt cag 336
Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
100 105 110

cag agt agg aaa tct ccg tgg acg ttc gct gga ggc acc aag ctg gaa 384
Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

ttg aga cgg gct gat gct gca cca act gta tct 417
Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
130 135

<210> 30
<211> 139
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 30

Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Ala Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
20 25 30

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly

65 70 75 80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Leu Arg Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
130 135

<210> 31
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi EFF1

<400> 31
ccacgcgccc tgtagcggcg cattaagc 28

<210> 32
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mồi EFsmaR

<400> 32
aaacccggga gctttttgca aaagcctagg 30

<210> 33
<211> 1704
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mảnh B

<400> 33
ggtaccaccc aagctggcta ggtaagcttg ctagcgccac catggtgctg cagacccagg 60

tgttcatctc cctgctgctg tggatctccg gcgcatatgg cgatatcgtg atgattaaac 120

gtacggtggc cgcccccctcc gtgttcatct tccccccctc cgacgagcag ctgaagtccg 180

gcaccgcctc cgtggtgtgc ctgctgaata acttctaccc cagagaggcc aaggtgcagt 240

ggaaggtgga caacgccctg cagtccggga actcccagga gagcgtgacc gagcaggaca 300

gcaaggacag cacctacagc ctgagcagca ccctgaccct gagcaaagcc gactacgaga 360

agcacaaggt gtacgcctgc gaggtgaccc accagggcct gagctccccc gtcaccaaga 420

gcttcaacag gggggagtgt taggggcccg tttaaacggg tggcatccct gtgacccctc 480

cccagtgcct ctcctggccc tggaagttgc cactccagtg cccaccagcc ttgtcctaat 540

aaaattaagt tgcatcattt tgtctgacta ggtgtccttc tataatatta tggggtggag 600

gggggtggta tggagcaagg ggcaagttgg gaagacaacc tgtagggcct gcggggtcta 660

ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc actgcaatct ccgcctcctg 720

ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc cgagttgttg ggattccagg catgcatgac 780

caggctcacc taatttttgt ttttttggta gagacggggt ttcaccatat tggccaggct 840

ggtctccaac tcctaatctc aggtgatcta cccaccttgg cctcccaaat tgctgggatt 900

acaggcgtga accactgctc cacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg 960

tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt 1020

tcttcccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc 1080

tcccttttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg 1140

gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg 1200

agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct 1260

cggtctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg 1320

agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt aattctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg 1380

tggaaagtcc ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc 1440

agcaaccagg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca 1500

tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatcccgc ccctaactcc 1560

gcccagttcc gcccattctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc 1620

cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 1680

aggcttttgc aaaaagctcc cggg 1704

<210> 34
<211> 1120
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tín hiệu IgG1 người + vùng bảo toàn IgG1 người

<400> 34
tgctagcgcc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60

ggtgctgagc caggtgcaat tgtgcaggcg gttagctcag cctccaccaa gggcccaagc 120

gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctggcg gcacagccgc cctgggctgc 180

ctggtcaagg actacttccc cgaacccgtg accgtgagct ggaactcagg cgccctgacc 240

agcggcgtgc acaccttccc cgctgtcctg cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 300

gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 360

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 420

acatgcccac cctgcccagc acctgaactc ctgggggggac cctcagtctt cctcttcccc 480

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 540

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 600

cataatgcca agacaaagcc ccgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 660

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 720

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg ccagccccgg 780

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 840

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 900

ggccagcccg agaacaacta caagaccacc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 960

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcagggcaa cgtcttctca 1020

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacaccc agaagagcct ctccctgtct 1080

cccggcaaat gagatatcgg gcccgtttaa acgggtggca 1120

<210> 35
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PCR mồi của cADN vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể #32A1

<400> 35
aaagctgagc gaggtgcaaa ttttggagac tggaggaggc 40

<210> 36
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PCR mồi của cADN vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể #32A1

<400> 36
aaagctgagc tgactgtgac catgactcct tggccccag 39

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mồi của cADN vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể #32A1

<400> 37

taatacgact cactataggg 20

<210> 38
<211> 42
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PCR mồi của cADN vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể #32A1

<400> 38
aaacatatgg cgacattgtc ttgacccagt ctcctgcttt gg 42

<210> 39
<211> 37
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> PCR mồi của cADN vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể #32A1

<400> 39
aaacgtacgt ctcaattcca gcttggtgcc tccagcg 37

<210> 40
<211> 1413
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng khảm #32A1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1413)

<400> 40

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg caa att ttg gag act gga gga ggc ttg gtg aag      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

ccc ggt ggt tcc ctg aga ctg tct tgt gca acg tct gga ttc aat ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aat gat tat ttc atg aac tgg gtc cgt cag gct cca gaa aag ggg cta     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtt gct caa ata agg aac aaa att tat act tat gcc aca ttt     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tat gcg gag tct ttg gaa ggc aga gtc aca atc tca cga gac gat tcc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95
```

```
gaa agc agt gtc tac ctg caa gtg agc agt tta aga gct gaa gac act      336
Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc att tat tac tgt aca aga tcc cta act ggg gga gac tac ttt gat      384
Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa gga gtc atg gtc aca gtc agc tca gcc tcc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc      528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
```

```
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa tga                                        1413
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470

<210>  41
<211>  470
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp

<400>  41

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
```

```
                85                  90                  95

Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415
```

```
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 42
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ khảm #32A1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 42

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gac att gtc ttg acc cag tct cct gct ttg gct gtg      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
            20                  25                  30

tct cta ggg cag agg gcc aca atc tcc tgt agg gcc agc caa agt gtc     144
Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
        35                  40                  45

act att tct gga tat agt ttt ata cac tgg tac caa cag aaa cca gga     192
Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

cag caa ccc aga ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gcc tct ggg     240
Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

atc ccg gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc     288
Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

acc atc aat cct gtg cag gct gat gat att gca acc tat ttc tgt cag     336
Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
            100                 105                 110

cag agt agg aaa tct ccg tgg acg ttc gct gga ggc acc aag ctg gaa     384
Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125

ttg aga cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc     432
Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
    130                 135                 140
```

```
gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat      480
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145                 150                 155                 160

aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc      528
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                165                 170                 175

ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag      576
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
            180                 185                 190

gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac      624
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
        195                 200                 205

tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg      672
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
    210                 215                 220

agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt tag              714
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 43
<211> 237
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 43

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
            20                  25                  30

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
        35                  40                  45

Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

Thr Ile Asn Pro Val Gln Ala Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
            100                 105                 110

Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125

Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
    130                 135                 140
```

```
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145                 150                 155                 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
            180                 185                 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
        195                 200                 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
    210                 215                 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 44

```
Asp Tyr Phe Met Asn
1               5
```

<210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 45

```
Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu Ser
1               5                   10                  15

Leu Glu Gly
```

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 46

```
Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
1               5                   10
```

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 47

```
Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His
1               5                   10                  15
```

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 48

Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 49

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 50
<211> 1410
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T1H

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)

<400> 50

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg       48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg caa ctg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg caa       96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc gcc tcc ggc ttc aac ttc      144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga caa gcc cct ggc aag ggc ctg      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc caa atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc      288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

aag aac agc ctg tac ctt caa atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc      336
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110
```

```
gcc gtg tac tac tgt gcc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac      384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc      528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350
```

```
gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                             1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 51
<211> 470
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 51

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
```

```
                100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430
```

```
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470

<210>  52
<211>  1410
<212>  ADN
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T2H

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(1410)

<400>  52
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg       48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

gtg ctg agc gag gtg caa ctg gtg gag agc ggc ggc gga ctg gtg caa       96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctg agc tgt gcc gcc tcc ggc ttc aac ttc      144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga caa gcc cct gag aag ggc ctg      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc caa atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctg gag ggc aga gtg acc atc tcc aga gac aac gcc      288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

aag aac agc ctg tac ctg caa atg tcc tcc ctg aga gcc gag gac acc      336
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt gcc aga agc ctg acc ggc ggc gac tac ttc gac      384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc caa ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
```

```
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc      528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400
```

```
gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                         1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 53
<211> 470
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 53

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

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

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 54

<211> 1410
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T3H

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)

<400> 54

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg       48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag atc gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag       96
Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc      144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct gag aag ggc ctg      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga gtg acc atc tcc aga gac gac agc      288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

gag tcc agc gtg tac ctt cag atg tcc agc ctg aga gcc gag gac acc      336
Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac      384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc      528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
```

```
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
```

```
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                         1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 55
<211> 470
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 55

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

Val Leu Ser Glu Val Gln Ile Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                85                  90                  95

Glu Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220
```

```
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470

<210>  56
<211>  1410
<212>  ADN
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T5H

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(1410)
```

<400> 56

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg       48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag gtg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag       96
Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc      144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct ggc aag ggc ctg      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aac agc      288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

aag tcc acc gtg tac ctt cag atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc      336
Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac      384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc tcc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc      528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240
```

```
aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                             1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 57

<211> 470
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 57

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
35 40 45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

```
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 58
<211> 1410
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T6H

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)

<400> 58

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                   10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag gtg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc     144
```

```
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct gag aag ggc ctg      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga gtg acc atc tcc aga gac aac agc      288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

aag tcc acc gtg tac ctt cag atg tcc agc ctt aga gcc gag gac acc      336
Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac      384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctt gtg aca gtg agc tca gcc tcc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cca agc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggc      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

ggc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccc      528
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc ccc gct gtc ctg cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt gag ccc      720
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccc tgc cca gca cct gaa      768
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

ctc ctg ggg gga ccc tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac      816
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac      864
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
```

```
        275                 280                 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc      912
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccc cgg gag gag cag tac aac      960
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg     1008
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca     1056
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggc cag ccc cgg gaa     1104
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac     1152
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc     1200
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggc cag ccc gag aac aac tac aag acc     1248
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

acc cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag     1296
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggc aac gtc ttc tca tgc     1344
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acc cag aag agc ctc     1392
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

tcc ctg tct ccc ggc aaa                                            1410
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 59
<211> 470
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 59

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp

```
1               5                  10                  15

Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

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

Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335
```

```
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 60
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T1L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 60

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg atg acc cag agc cct gac tcc ctt gcc      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc aac tgt aga gcc tcc cag agc     144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct     192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag cct cct aag ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc     240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80
```

```
ggc gtg cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc      288
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc gtg tac tac tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc ggc ggc ggc acc aag gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 61
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 61

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60
```

```
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 62
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T2L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 62

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg atg acc cag agc cct gac tcc ctt gcc      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc     144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct     192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
```

```
    50                  55                  60

ggc cag cct cct aga ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc      240
Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc gtg cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc      288
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc gtg tac ttc tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 63
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 63

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30
```

```
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235

<210>  64
<211>  714
<212>  ADN
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T3L

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(714)

<400>  64
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc       48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gac tcc ctt gcc       96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30
```

```
gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc      144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct      192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag cag cct aga ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc      240
Gly Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc      288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac ttc tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 65
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 65

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160


Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 66
<211> 711
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T4L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(711)

<400> 66
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc 48

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gcc ctt gcc gtg      96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
            20                  25                  30

tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc gtg     144
Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
        35                  40                  45

acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct ggc     192
Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
    50                  55                  60

cag cag cct aga ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc ggc     240
Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg     288
Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95

acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac ttc tgt cag     336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
            100                 105                 110

cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag ctg gag     384
Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
        115                 120                 125

atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc tcc     432
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
    130                 135                 140

gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg aat     480
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145                 150                 155                 160

aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc     528
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                165                 170                 175

ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc aag     576
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
            180                 185                 190

gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc gac     624
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
        195                 200                 205

tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc ctg     672
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
    210                 215                 220

agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt                 711
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235

<210>  67
<211>  237
```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 67

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
20 25 30

Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Gln Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln
100 105 110

Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 68
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T5L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 68

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc       48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gac tcc ctt gcc       96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc aac tgt aga gcc tcc cag agc      144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct      192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag cct cct aag ctt ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc      240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc      288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac tac tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220
```

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt 714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 69
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 69

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

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

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 70
<211> 714

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T6L

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 70

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc       48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gac atc gtg ctt acc cag agc cct gac tcc ctt gcc       96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

gtg tcc ctg ggc gag aga gcc acc atc agc tgt aga gcc tcc cag agc      144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc atc tcc ggc tac agc ttc atc cac tgg tac cag cag aag cct      192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

ggc cag cct cct aga ctg ctg atc tac aga gcc tcc aac ctt gcc agc      240
Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc atc cct gcc aga ttc tcc ggc agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc      288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg acc atc agc tcc ctt cag gcc gag gac gtg gcc acc tac ttc tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

cag cag agc aga aag tcc cct tgg acc ttc gcc ggc ggc acc aag gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
```

```
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt            714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 71
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 71

```
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
            20                  25                  30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220
```

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 72
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T7H

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450

<210>  73
<211>  451
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T8H

<400>  73

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
    50                  55                  60
```

```
Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

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

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380
```

```
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 74
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T9H

<400> 74

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 75
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T10H

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
```

```
                325                 330                 335

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 76
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T11H

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

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

```
    130                 135                 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 77
<211> 451
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T12H

<400> 77

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
    50                  55                  60

Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65                  70                  75                  80

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

Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 78
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T7L

<400> 78

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210>  79
<211>  218
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T8L

<400>  79

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 80
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T9L

<400> 80

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 81
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T10L

<400> 81

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 82
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T11L

<400> 82

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 83
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T12L

<400> 83

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 84
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T13L

<400> 84

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

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

```
Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210>  85
<211>  218
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T14L

<400>  85

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

```
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
                85                  90                  95

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 86
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T15L

<400> 86

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210>  87
<211>  218
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T16L

<400>  87

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 88
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T17L

<400> 88

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 89
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T18L

<400> 89

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 90
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T19L

<400> 90

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 91
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T20L

<400> 91

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

```
        35                  40                  45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210>  92
<211>  218
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T21L

<400>  92

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

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

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

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
```

```
                85                  90                  95

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

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


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

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

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

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

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

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


<210>  93
<211>  218
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  h#32A1-T22L

<400>  93

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

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

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

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
                85                  90                  95

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 94
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T23L

<400> 94

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

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

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

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 95
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T24L

<400> 95

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

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

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

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

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 96
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-T25L

<400> 96

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

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

Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

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

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

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

Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 97

Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe Tyr Ala

1 5 10

<210> 98
<211> 1398
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-H1-1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1398)

<400> 98

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg       48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gaa gtc cag ctt gtg gaa agc gga ggg gga ctc gtt cag       96
Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cca gga ggc tct ctg cgc ctg tca tgc gct gcc agc gga ttt aat ttc      144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aat gat tat ttt atg aac tgg gtc agg cag gct ccg gga aaa ggg ctg      192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gaa tgg gtc gcc cag atc aga aac aag atc tat act tac gct aca ttc      240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gca tct gta aag ggg agg ttt aca att agt cgc gac aat gca      288
Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

aaa aat agt ctg tat ctc caa atg aac tcc ctc cgc gca gag gat act      336
Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gct gtc tac tac tgc gcc agg tcc ttg act ggc ggc gac tat ttt gat      384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg gga cag ggc acc ctg gtg acg gtg agc tca gcc agc acc aag      432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cct tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tgt agc cgt tcc acc agc gag      480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

tcc acc gcc gcc ctt ggc tgt ctg gtg aag gac tac ttc cct gag cct      528
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tcc gga gcc ctt acc agc ggc gtg cac acc      576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
```

```
                180                 185                 190

ttc cct gcc gtg ctg cag tcc agc ggc ctt tac tcc ctg agc tcc gtg      624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg cct agc tcc aac ttc ggc acc caa acc tac acc tgt aac      672
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

gtg gac cac aag cct agc aac acc aag gtg gac aag acc gtg gag cgt      720
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

aag tgt tgt gtg gag tgt cct cct tgt cct gcc cct cct gtg gcc gga      768
Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

cct tcc gtg ttc ctt ttc cct cct aag cct aag gac acc ctg atg atc      816
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

agc cgt acc cct gag gtg acc tgt gtg gtg gtg gac gtg tcc cac gag      864
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

gac cct gag gtg cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac      912
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

aac gcc aag acc aag cct cgt gag gag caa ttc aac agc acc ttc cgt      960
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

gtg gtg tcc gtg ctt acc gtg gtg cac caa gac tgg ctg aac ggc aag     1008
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

gag tac aag tgt aag gtg agc aac aag gga ctt cct gcc cct atc gag     1056
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

aag acc atc tcc aag acc aag ggc caa cct cgt gag cct caa gtg tac     1104
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

acc ctt cct cct agc cgt gag gag atg acc aag aac caa gtg tcc ctt     1152
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac cct agc gac atc gcc gtg gag tgg     1200
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

gag tcc aac gga caa cct gag aac aac tac aag acc acc cct cct atg     1248
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

ctt gac agc gac ggc tcc ttc ttc ctg tac agc aag ctg acc gtg gac     1296
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430
```

```
aag tcc cgt tgg caa caa ggc aac gtg ttc agc tgt tcc gtg atg cac     1344
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

gag gcc ctg cac aac cac tac acc caa aag agc ctt tcc ctg agc cct     1392
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

gga aag                                                             1398
Gly Lys
465
```

<210> 99
<211> 466
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 99

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85                  90                  95

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205
```

```
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

Gly Lys
465
```

<210> 100
<211> 1398
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-H5

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(1398)

<400> 100

```
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1               5                  10                  15

gtg ctg agc gag gtg cag gtg gtg gag agc ggc ggc gga ctt gtg cag      96
Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30

cct ggc ggc tcc ctg aga ctt agc tgt gcc acc tcc ggc ttc aac ttc     144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
        35                  40                  45

aac gac tac ttc atg aac tgg gtg aga cag gcc cct ggc aag ggc ctg     192
Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

gag tgg gtg gcc cag atc aga aac aag atc tac acc tac gcc acc ttc     240
Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65                  70                  75                  80

tac gcc gag agc ctt gag ggc aga ttc acc atc tcc aga gac aac agc     288
Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
                85                  90                  95

aag tcc acc gtg tac ctt cag atg aac tcc ctg aga gcc gag gac acc     336
Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
            100                 105                 110

gcc gtg tac tac tgt acc aga agc ctt acc ggc ggc gac tac ttc gac     384
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
        115                 120                 125

tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtg acc gtg agc tca gcc agc acc aag     432
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

ggc cct tcc gtg ttc cct ctg gcc cct tgt agc cgt tcc acc agc gag     480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145                 150                 155                 160

tcc acc gcc gcc ctt ggc tgt ctg gtg aag gac tac ttc cct gag cct     528
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

gtg acc gtg agc tgg aac tcc gga gcc ctt acc agc ggc gtg cac acc     576
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

ttc cct gcc gtg ctg cag tcc agc ggc ctt tac tcc ctg agc tcc gtg     624
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

gtg acc gtg cct agc tcc aac ttc ggc acc caa acc tac acc tgt aac     672
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
    210                 215                 220

gtg gac cac aag cct agc aac acc aag gtg gac aag acc gtg gag cgt     720
```

```
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225                 230                 235                 240

aag tgt tgt gtg gag tgt cct cct tgt cct gcc cct cct gtg gcc gga      768
Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
                245                 250                 255

cct tcc gtg ttc ctt ttc cct cct aag cct aag gac acc ctg atg atc      816
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

agc cgt acc cct gag gtg acc tgt gtg gtg gtg gac gtg tcc cac gag      864
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

gac cct gag gtg cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cac      912
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

aac gcc aag acc aag cct cgt gag gag caa ttc aac agc acc ttc cgt      960
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

gtg gtg tcc gtg ctt acc gtg gtg cac caa gac tgg ctg aac ggc aag     1008
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

gag tac aag tgt aag gtg agc aac aag gga ctt cct gcc cct atc gag     1056
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

aag acc atc tcc aag acc aag ggc caa cct cgt gag cct caa gtg tac     1104
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

acc ctt cct cct agc cgt gag gag atg acc aag aac caa gtg tcc ctt     1152
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

acc tgt ctg gtg aag ggc ttc tac cct agc gac atc gcc gtg gag tgg     1200
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

gag tcc aac gga caa cct gag aac aac tac aag acc acc cct cct atg     1248
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

ctt gac agc gac ggc tcc ttc ttc ctg tac agc aag ctg acc gtg gac     1296
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

aag tcc cgt tgg caa caa ggc aac gtg ttc agc tgt tcc gtg atg cac     1344
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

gag gcc ctg cac aac cac tac acc caa aag agc ctt tcc ctg agc cct     1392
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

gga aag                                                             1398
Gly Lys
```

465

<210> 101
<211> 466
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 101

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe
35 40 45

Asn Asp Tyr Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Ile Tyr Thr Tyr Ala Thr Phe
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Leu Thr Gly Gly Asp Tyr Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
225 230 235 240

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
245 250 255

```
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
        275                 280                 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
    290                 295                 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
305                 310                 315                 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
            340                 345                 350

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        355                 360                 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385                 390                 395                 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
                405                 410                 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
            420                 425                 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
        435                 440                 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
    450                 455                 460

Gly Lys
465
```

<210> 102
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-L2-15

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 102

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc       48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                   10                  15

ggc gca tat ggc gaa att ctg atg acg cag agt cct gca act ctt agt       96
Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
```

```
            20                  25                  30

ctg tca cct ggc gag aga gcc aca ctc agc tgc cga gcg tcc cag tcc      144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtg acc att agc ggc tat tct ttt att cat tgg tat cag caa aag cct      192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

gga cag gcg cca agg ctg ctc att tac aga gca agc aac ctt gcc tct      240
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc att cca gca aga ttc agc ggg agc gga tca ggg aca gat ttc acc      288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ttg acc atc tcc tcc ctg gag ccg gag gat ttc gcg ttg tat tat tgt      336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys
            100                 105                 110

cag caa tct agg aag agt cca tgg aca ttt ggc cag ggc acc aaa gtg      384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gag atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc      432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg      480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac      528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc      576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc      624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc      672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt              714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235

<210>  103
<211>  238
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp
```

<400> 103

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 104
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> h#32A1-L2-16

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(714)

<400> 104

```
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc      48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1               5                  10                  15

ggc gca tat ggc gaa atc ctg atg aca cag agt cct gcg acc ctc tcc      96
Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
            20                  25                  30

ctc tca cca ggc gag agg gcc acc ctg tct tgt aga gcc agc cag tca     144
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

gtc act att agt gga tac tca ttt atc cat tgg tat caa cag aaa cca     192
Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    50                  55                  60

gga cag gcg cct cgg ctt ctg atc tac cgc gcc tca aac ctt gcc tct     240
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggc atc ccc gcg agg ttc tct ggc tct ggc agc ggt acc gat ttt aca     288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                  90                  95

ctg act atc tca agc ctc gaa cct gaa gac ttc gca ctg tac ttt tgc     336
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Phe Cys
            100                 105                 110

cag cag agc agg aag tcc ccc tgg act ttt gca cag gga acc aaa gtc     384
Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Val
        115                 120                 125

gaa atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc ccc ccc     432
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
    130                 135                 140

tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc ctg ctg     480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                 150                 155                 160

aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac     528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
                165                 170                 175

gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag gac agc     576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
            180                 185                 190

aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc aaa gcc     624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
        195                 200                 205

gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac cag ggc     672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
    210                 215                 220

ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt             714
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235
```

<210> 105
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 105

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Thr Ile Ser Gly Tyr Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Phe Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Arg Lys Ser Pro Trp Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 106
<211> 1111
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự axit nuleic mã hóa peptit tín hiệu và vùng bất biến của chuỗi nặng IgG2 người

<400> 106
aagcttgcta gcgccaccat gaaacacctg tggttcttcc tcctgctggt ggcagctccc 60

agatgggtgc tgagccaggt gcaattgtgc aggcggttag ctcagccagc accaagggcc 120

cttccgtgtt ccctctggcc ccttgtagcc gttccaccag cgagtccacc gccgcccttg 180

gctgtctggt gaaggactac ttccctgagc ctgtgaccgt gagctggaac tccggagccc 240

ttaccagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc cagcggcctt tactccctga 300

gctccgtggt gaccgtgcct agctccaact tcggcaccca aacctacacc tgtaacgtgg 360

accacaagcc tagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gcgtaagtgt tgtgtggagt 420

gtcctccttg tcctgccccc cctgtggccg gaccttccgt gttccttttc cctcctaagc 480

ctaaggacac cctgatgatc agccgtaccc ctgaggtgac ctgtgtggtg gtggacgtgt 540

cccacgagga ccctgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaacg 600

ccaagaccaa gcctcgtgag gagcaattca acagcacctt ccgtgtggtg tccgtgctta 660

ccgtggtgca ccaagactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggtg agcaacaagg 720

gacttcctgc ccctatcgag aagaccatct ccaagaccaa gggccaacct cgtgagcctc 780

aagtgtacac ccttcctcct agccgtgagg agatgaccaa gaaccaagtg tcccttacct 840

gtctggtgaa gggcttctac cctagcgaca tcgccgtgga gtgggagtcc aacggacaac 900

ctgagaacaa ctacaagacc acccctccta tgcttgacag cgacggctcc ttcttcctgt 960

acagcaagct gaccgtggac aagtcccgtt ggcaacaagg caacgtgttc agctgttccg 1020

tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccaaaagag cctttccctg agccctggaa 1080

agtgatatcg ggcccgttta aacgggtggc a 1111