



(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) 
1-0022251

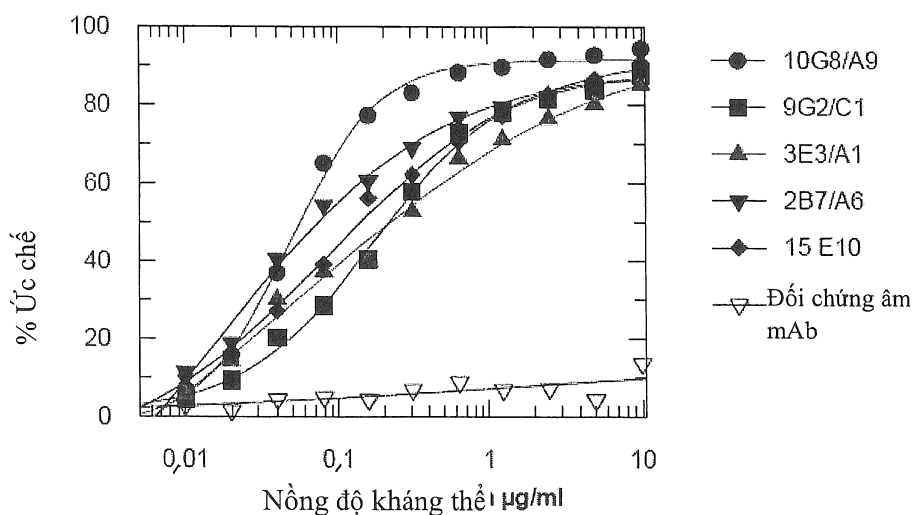
(51)⁷ **C07K 16/24**

(13) **B**

(21)	1-2013-01912	(22)	21.11.2011		
(86)	PCT/EP2011/070604	21.11.2011	(87)	WO2012/069433	31.05.2012
(30)	61/416,495	23.11.2010	US		
(45)	25.11.2019	380	(43)	25.10.2013	307
(73)	Glaxo Group Limited (GB) 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, United Kingdom				
(72)	BEMBRIDGE, Gary Peter (GB), CHUNG, Chun-wa (GB), FEENEY, Maria (GB), FORD, Susannah Karen (GB), KIRBY, Ian (GB), MCADAM, Ruth (GB)				
(74)	Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)				

(54) **KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI ONCOSTATIN M (OSM) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết đặc hiệu với Oncostatin M (OSM), cụ thể là OSM người (hOSM) và ngăn cản sự liên kết của OSM với thụ thể gp130 nhưng không tương tác trực tiếp với các gốc vị trí II. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các globulin miễn dịch liên kết đặc hiệu với Oncostatin M (OSM) và cụ thể là OSM của người (human OSM: hOSM).

Sáng chế cũng đề cập đến các dược phẩm chứa globulin miễn dịch này và các quy trình sản xuất chúng. Các phương án khác của sáng chế sẽ là rõ ràng trong phần mô tả dưới đây.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Oncostatin M là glycoprotein 28kDa thuộc họ interleukin 6 (IL-6) của các xytokin bao gồm IL-6, yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (Leukaemia Inhibitory Factor: LIF), yếu tố dinh dưỡng tế bào thần kinh ở thể mi (ciliary neurotrophic factor: CNTF), cardiotropin-1 (CT-1) và xytokin giống cardiotrophin-1 (Xem Kishimoto T et al (1995) Blood 86: 1243-1254) mà có chung thụ thể truyền tín hiệu xuyên màng gp130 (xem Taga T and Kishimoto T (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819). OSM được phát hiện ban đầu bởi khả năng ức chế sự sinh trưởng của dòng tế bào u ác tính A375 (xem Malik N (1989) et al Mol Cell Biol 9: 2847-2853). Do đó, nhiều tác dụng hơn được phát hiện ra và nó được phát hiện ra là chất trung gian nhiều chức năng giống như các thành viên khác của họ IL-6. OSM được sản xuất ra trong nhiều loại tế bào khác nhau bao gồm đại thực bào, tế bào T hoạt hóa (xem Zarling JM (1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743), bạch cầu đa nhân trung tính (xem Grenier A et al (1999) Blood 93:1413-1421), bạch cầu ưa axit (xem Tamura S et al (2002) Dev. Dyn. 225: 327-31), các tế bào tua (xem Suda T et al (2002) Cytokine 17:335-340). Nó cũng được biểu hiện trong tủy, thận, tinh hoàn, lá lách, dạ dày và não (xem Znoyko I et al (2005) Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 283: 182-186), và tủy xương (xem Psenak O et al (2003) Acta Haematol 109: 68-75). Các tác dụng sinh học chính của nó bao gồm

hoạt hóa màng trong (xem Brown TJ et al (1993) Blood 82: 33-7), hoạt hóa phản ứng pha cấp tính (xem Benigni F et al (1996) Blood 87: 1851-1854), cảm ứng sự tăng sinh và biệt hóa tế bào, điều hòa sự giải phóng chất trung gian gây viêm và sự tạo máu (xem Tanaka M et al (2003) 102: 3154-3162), tái tạo xương (xem de Hooge ASK (2002) Am J Pathol 160: 1733-1743) và thúc đẩy sự tạo mạch mới (xem Vasse M et al (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:1835-1842) và làm lành vết thương.

Các thụ thể cho OSM (thụ thể β của OSM, "OSMR β ") được biểu hiện trên một khoảng rộng tế bào bao gồm các tế bào biểu mô, tế bào sụn, nguyên bào sợi (xem Langdon C et al (2003) J Immunol 170: 548-555), cơ trơn, neuron, hạch bạch huyết, xương, tim, ruột non, phổi và thận (xem Tamura S et al (2002) Mech Dev 115: 127-131) và các tế bào màng trong. Một số bằng chứng gợi ý là các tế bào màng trong là đích chính đối với OSM. Các tế bào này biểu hiện cả thụ thể ái lực cao và thấp với số lượng cao hơn từ 10 đến 20 lần và thể hiện các thay đổi sâu sắc và kéo dài về kiểu hình sau khi kích thích bằng OSM (xem Modur V et al (1997) J Clin Invest 100: 158-168). Thêm vào đó, OSM là yếu tố sinh trưởng tự tiết chính đối với các tế bào xacom Kaposi, các tế bào này được cho là có nguồn gốc màng trong (xem Murakami-Mori K et al (1995) J Clin Invest 96:1319-1327).

Cũng như các xytokin thuộc họ IL-6 khác, OSM liên kết với glycoprotein biến đổi tín hiệu xuyên màng gp130. Đặc điểm chính của các xytokin gp130 là sự tạo thành các phức hợp thụ thể oligome mà bao gồm gp130 và một hoặc nhiều đồng thụ thể phụ thuộc vào phối tử (xem trong Heinrich PC et al (2003) Biochem J. 374: 1-20). Do đó, các xytokin này có thể gây ra cả tác dụng sinh học chung và tác dụng sinh học riêng trên *in vitro* và *in vivo* tùy thuộc vào thành phần của phức hợp thụ thể được tạo thành. OSM người (hOSM) khác với các xytokin IL-6 còn lại ở chỗ nó có thể tạo ra các phức hợp với gp130 và một trong hai đồng thụ thể, LIFR hoặc thụ thể

oncostatin (OSMR). Fig. 27 minh họa tương tác giữa hOSM và gp130, LIFR và OSMR.

Cấu trúc tinh thể của hOSM đã được làm sáng tỏ và được chỉ ra là bao gồm bốn bó xoắn α với hai vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Hai vị trí liên kết phối tử riêng biệt được nhận biết bởi sự tạo đột biến điểm trên phân tử hOSM (xem Deller MC et al (2000) Structural Fold Des. 8:863-874). Vị trí thứ nhất, được gọi là vị trí II (đôi khi “vị trí 2”) tương tác với gp130 và vị trí thứ hai, còn gọi là vị trí III (đôi khi “vị trí 3”), ở đầu đối diện của phân tử tương tác với LIFR hoặc OSMR. Các thử nghiệm gây đột biến đã chỉ ra rằng các vị trí liên kết đối với LIFR và OSMR gần như là giống nhau nhưng một đột biến axit amin duy nhất có thể phân biệt giữa hai vị trí này.

Có bằng chứng ngày càng rõ hơn để củng cố cho giả thuyết là việc điều hòa tương tác OSM-gp130 có thể là có lợi trong việc điều trị RA và các bệnh và rối loạn khác, cụ thể là các bệnh viêm mãn tính và các rối loạn như bệnh viêm xương khớp mãn tính, bệnh xơ hóa phổi tự phát, đau, bệnh viêm phổi, bệnh tim mạch và bệnh vẩy nến.

OSM được phát hiện ra trong SF của bệnh nhân RA là người (xem Hui W et al (1997) 56: 184-7). Các mức nồng độ này có tương quan với; số lượng bạch cầu trung tính trong SF, các mức TNF alpha (đôi khi là “TNF”) trong SF, và các gen đánh dấu phá hủy sụn (Manicourt DH et al (2000) Arthritis Rheum 43: 281-288). Ngoài ra, mô hoạt dịch của các bệnh nhân RA tiết ra OSM tự phát ex vivo (See Okamoto H et al (1997) Arthritis and Rheumatism 40: 1096-1105). Cũng được chứng minh là OSM có mặt trong các đại thực bào hoạt dịch (Cawston TE et al (1998) Arthritis Rheum 41: 1760-1771) và như đã thảo luận trước đây, các thụ thể OSM và gp130 được biểu hiện trên tế bào màng trong, nguyên bào sợi hoạt dịch, tế bào sụn và tế bào tạo xương. Sự biểu hiện adenovirut của OSM chuột (mOSM) trong các khớp của chuột bình thường dẫn đến bệnh viêm nặng và bệnh viêm khớp ăn mòn (xem Langdon C et al (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196). Bệnh tăng triển tương tự được

thấy ở chuột tách gen thiếu TNF, IL-1, IL-6 và iNOS sau khi phân phối mOSM adenovirut (xem de Hooge ASK et al (2003) *Arthritis and Rheumatism* 48:1750-1761), chứng minh rằng OSM có thể gây ra tất cả các phương án của bệnh học bệnh viêm khớp. Việc biểu hiện OSM chuột bằng cách sử dụng vector mOSm được biểu hiện bằng adenovirut gây tổn hại cho đĩa sinh trưởng đặc trưng cho bệnh viêm khớp tự phát vị thành niên (xem de Hooge ASK et al (2003) *Arthritis and Rheumatism* 48:1750-1761). Trong mô hình thử nghiệm của bệnh viêm khớp do collagen, kháng thể kháng OSM được sử dụng để điều trị cho chuột ngăn ngừa sự tăng triển thêm của bệnh. Các kết quả tương tự được thấy khi kháng OSM được sử dụng để phòng bệnh cho chuột bị bệnh viêm khớp do pristane, mô hình tái phát/giảm bớt liên quan đến bệnh của người (xem Plater-Zyberk C et al (2001) *Arthritis and Rheumatism* 44:

Bệnh viêm xương khớp là tình trạng ảnh hưởng đến các khớp. Có 3 đặc trưng của bệnh viêm xương khớp. Bệnh này gây tổn thương cho sụn – bề mặt chắc khỏe, trơn láng các xương và cho phép các khớp di chuyển dễ dàng và không có sự chà xát. Nó dẫn đến sự tăng trưởng xương phát triển quanh gờ của các khớp, và nó gây viêm nhẹ các mô xung quanh khớp (sụn). OSM đã được chứng minh là đóng vai trò quan trọng trong việc phá vỡ sụn, gây viêm và quay vòng xương và do đó việc phong bế xytokin này có thể đóng vai trò trong các khía cạnh chính của sự phát sinh bệnh. OSM tác dụng hiệp động với IL-1 hoặc TNF để gây ra sự tiêu collagen trong sụn mũi người, liên quan đến mất proteoglycan (PG) và collagen, tình trạng sau có tương quan với sự cảm ứng của MMP-1 và MMP-13. OSM với IL-1 cũng sẽ gây ra sự mất PG từ sụn khớp của người, nhưng sự gia tăng mất collagen này không đáng kể. (Morgan et al 2006) Nhiều thử nghiệm sử dụng các vector adenovirut để làm tăng nồng độ xytokin trong khớp chỉ ra rằng sự biểu hiện quá mức OSM sẽ gây ra viêm, tạo dịch rỉ viêm khớp, phá hủy sụn và ăn mòn xương. (Langdon et al 2000). Toàn bộ tài liệu này gợi ý là OSM, cụ thể là khi được kết hợp với các xytokin

khác, cảm ứng các proteaza mà liên quan đến sự bẻ gãy proteoglycan và collagen dẫn đến sự thoái biến sụn và ăn mòn xương.

Thông tin từ tài liệu này gợi ý là phân tử OSM có thể có một số liên quan trong quá trình viêm đi kèm theo bệnh vẩy nến. Công trình của Boifati et al (1998) đã chỉ ra rằng sự giải phóng tự phát OSM được gia tăng trong môi trường nuôi cấy cơ quan của các tổn thương trong bệnh vẩy nến, so với da bị vẩy nến không có tổn thương và da bình thường. (Kunsfeild et al 2004)

Các tế bào sừng biểu hiện thụ thể cho phân tử này và đáp ứng với phối tử này, điều này gây ra sự di cư tế bào sừng và làm tăng độ dày của lớp biểu bì được khôi phục lại. Phân tích vi mảng so sánh các tác dụng điều hòa gen của OSM với 33 xytokin khác nhau chỉ ra rằng nó là chất hoạt hóa tế bào sừng hiệu quả và có thể tác dụng hiệp đồng với các xytokin tiền viêm trong việc cảm ứng các phân tử như S100A7 và sự biểu hiện β -defensin 2, đặc trưng của da bị vẩy nến. (Gazel et al 2006)

Vai trò của OSM trong bệnh viêm phổi như hen và xơ hóa phổi cũng được gợi ý từ tài liệu này. Các bệnh này được đặc trưng bởi sự tăng lắng đọng chất nền ngoại bào (extracellular matrix: ECM), kèm theo sự tăng sinh và hoạt hóa các nguyên bào sợi dưới biểu bì. OSM đã được phát hiện ra trong chất lỏng xúc rửa phế quản phế nang của bệnh nhân trong giai đoạn tổn thương phổi cấp tính, cụ thể là trong các trường hợp bị bệnh viêm phổi (Grenier et al 2001).

OSM đã được phát hiện trong não của các bệnh nhân MS, trong đó nó phân bố ở tiểu thần kinh đệm, tế bào hình sao và tế bào bạch cầu thâm nhập (Ruprecht et al 2001). Thêm vào đó, các PBMC được phân lập từ các bệnh nhân MS giải phóng tự phát nhiều xytokin hơn, bao gồm OSM, so với các tế bào của người đối chứng khỏe mạnh và các bệnh nhân MS thể hiện xu hướng [OSM] huyết thanh tăng (Ensoli et al 2002).

Ngoài việc thúc đẩy bệnh viêm ở não, OSM có thể trực tiếp góp phần vào sự thoái hóa thần kinh, đặc trưng của bệnh Alzheimer, MS và nhóm phụ

của bệnh nhân bị HIV. Các dịch nổi đơn bào của các bệnh nhân bị HIV gây ra sự ức chế sinh trưởng nguyên bào thần kinh rõ ràng và gây chết tế bào thần kinh. Các tác dụng này bị gây ra bởi Oncostatin M trong dịch nổi nuôi cấy (Ensoli et al 1999). Vì nhiều bệnh nhân bị HIV mắc bệnh teo não do mất tế bào thần kinh, nên OSM có thể là một chất trung gian của nguyên nhân gây bệnh này.

Công trình của Tamura et al gợi ý là OSM có thể liên quan đến sự phát triển và duy trì đau thần kinh (2003). Các nghiên cứu của họ chỉ ra rằng nhóm phụ của các neuron cảm thụ đau biểu hiện thụ thể thụ thể OSM β . Tất cả các neuron OSM β R +ve cũng biểu hiện các thụ thể VR1 và P2X3, mà đã được chỉ ra là quan trọng đối với sự phát triển của cả bệnh đau thần kinh và đau viêm (Jarvis et al 2002, Walker et al 2003). Cũng được chỉ ra là chuột OSM -/- thể hiện các đáp ứng độc giảm với đau hóa chất, đau do nhiệt, đau nội tạng và đau cơ học (Morikawa et al 2004). Đáng quan tâm là, các động vật này có sự thiếu hụt các neuron cỡ nhỏ VR1+, P2X3+, ngoài ra các động vật này có vẻ bình thường.

Vai trò hỗ trợ OSM trong việc điều hòa sinh học của các tế bào ung thư cũng được gợi ý từ tài liệu này. OSM đã được báo cáo là có cả tính chất kích thích sinh trưởng và ức chế sinh trưởng trong các thử nghiệm sử dụng các dòng tế bào u (Grant and Begly 1999). Nó là chất gây nguyên phân hiệu quả cho các tế bào có nguồn gốc xacom Kaposi (Miles et al 1992) và dòng tế bào u tủy (Zhang et al 1994). OSM làm giảm tốc độ sinh trưởng và làm tăng sự biệt hóa về số lượng dòng tế bào u, bao gồm vú (Douglas et al 1998), và phổi (McKormick et al 2000). Tuy nhiên, mặc dù OSM có thể ức chế sinh trưởng, nhưng ít nhất trong một số dòng tế bào ung thư biểu mô vú, nó làm tăng sự tách rời tế bào và thúc đẩy sự di căn tiềm tàng (Holzer et al 2004, Jorcyk et al 2006). OSM cũng điều hòa tăng sự biểu hiện và trạng thái hoạt động của thụ thể hyaluronan CD44, trong một số dòng tế bào u (Cichy et al 2000), thụ thể này liên quan đến sự sinh trưởng và di căn khối u (Yu et al 1997). Thêm vào

đó, các tính chất tạo mạch mới của OSM và khả năng cảm ứng các yếu tố tạo mạch khác của nó trong một số tế bào u (Repovic et al 2003), gợi ý là nó có thể góp phần vào sự tạo mạch khối u trong các khối u biểu hiện OSM. Tài liệu khoa học này gợi ý về sự liên quan của OSM trong sinh học khối u nhưng chỉ ra sự phức tạp. Sự trung hòa OSM có thể là có lợi cho việc điều trị một số khối u. Mặt khác, tương tự như việc trung hòa TNF và IL-6, nó có một số rủi ro tiềm tàng về các khía cạnh khác.

Bằng chứng từ tài liệu gợi ý vai trò tiềm năng của OSM trong bệnh tim mạch. OSM được phát hiện trong các đại thực bào mô trong tổn thương xơ vữa động mạch (Modur et al 1997) và như là yếu tố tạo mạch (Vasse et al 1999) có thể tăng cường tính chất tạo mạch mới của các mảng xơ vữa động mạch mà được cho là góp phần vào việc làm hỏng thành mạch máu. Tuy nhiên, OSM cũng cảm ứng sự biểu hiện các yếu tố tạo mạch khác trong tế bào màng trong; VEGF (Wijelahn et al 1997) và bFGF (Bernard et al 1999). Đáng quan tâm là, các tế bào màng trong của người có mật độ thụ thể OSM cao hơn từ 10 đến 20 lần so với các tế bào khác (Brown et al 1991).

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất liệu pháp để điều trị bệnh RA và các bệnh và rối loạn khác, cụ thể là các bệnh viêm mãn tính và các rối loạn như bệnh viêm xương khớp, bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh ung thư, bệnh hen, đau, bệnh tim mạch và bệnh vảy nến. Cụ thể là, đối tượng của sáng chế là đề xuất các globulin miễn dịch, đặc biệt là các kháng thể liên kết đặc hiệu với OSM (ví dụ, hOSM, cụ thể là vị trí II của nó) và điều hòa (nghĩa là, ức chế hoặc phong bế) tương tác giữa OSM và gp130 trong việc điều trị bệnh và rối loạn đáp ứng với việc điều hòa tương tác đó.

Trong WO99/48523, chúng tôi mô tả việc sử dụng các chất đối vận OSM trong việc điều trị các bệnh viêm và các rối loạn. Bản mô tả này sử dụng kháng thể kháng OSM chuột trong mô hình chuột bị viêm khớp. Ngoài ra, đơn sáng chế WO2005/095457 A2 bộc lộ kháng thể trị liệu mà liên kết

đặc hiệu với OSM, cụ thể là hOSM, và điều chỉnh sự tương tác giữa OSM và gp130.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên mà có khả năng liên kết với OSM, ví dụ, các kháng thể liên kết đặc hiệu với OSM và ngăn cản sự liên kết của OSM vào thụ thể gp130, nhưng không tương tác trực tiếp với các gốc vị trí II.

Các kháng thể OSM theo sáng chế có liên quan đến, hoặc thu được từ mAb 10G8 của chuột. Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng 10G8 chuột được đề xuất là SEQ ID NO. 26 và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ 10G8 của chuột được đề xuất là SEQ ID NO. 28.

Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo sáng chế có thể bao gồm các CDR sau đây hoặc các biến thể của các CDR này (như được định nghĩa bởi Kabat (Kabat et al; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987)):

CDRH1 của SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO 77

CDRH2 của SEQ ID NO. 2

CDRH3 của SEQ ID NO. 3

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo sáng chế có thể bao gồm các CDR sau đây hoặc các biến thể của các CDR này (như được định nghĩa bởi Kabat (Kabat et al; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987)):

CDRL1 của SEQ ID NO. 4

CDRL2 của SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO 78

CDRL3 của SEQ ID NO. 6

Sáng chế cũng đề xuất trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể bất kỳ được mô tả ở đây, và polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể bất kỳ được mô tả ở đây. Các polynucleotit này thể hiện trình tự mã hóa tương ứng với các trình tự polypeptit tương đương, tuy nhiên sẽ được

hiểu là các trình tự polynucleotit này có thể được tách dòng vào vector biểu hiện cùng với codon khởi đầu, trình tự tín hiệu thích hợp và codon dừng.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ được biến nạp tái tổ hợp hoặc được chuyển nhiễm chứa một hoặc nhiều polynucleotit mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của protein liên kết kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất protein liên kết kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở đây, quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa vector thứ nhất và thứ hai, vector thứ nhất này chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của protein liên kết kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở đây và vector thứ hai này chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của protein liên kết kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở đây, trong môi trường nuôi cấy thích hợp, ví dụ môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh.

Sáng chế đề xuất thêm được phẩm chứa kháng thể như được mô tả ở đây và chất mang được dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn đáp ứng với tác dụng điều hòa tương tác giữa hOSM và gp130, quy trình này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu điều trị của protein liên kết kháng nguyên như được mô tả ở đây.

Do đó, sáng chế đề cập đến liệu pháp để điều trị RA và các bệnh và rối loạn khác, cụ thể là bệnh viêm mãn tính và các rối loạn như bệnh viêm xương khớp, bệnh xơ hóa phổi tự phát, đau, bệnh viêm phổi, bệnh tim mạch và bệnh vẩy nến. Cụ thể là, mục đích của sáng chế là đề xuất các globulin miễn dịch, cụ thể là các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với OSM (ví dụ, hOSM, cụ thể là vị trí II của nó) và điều hòa (nghĩa là, ức chế hoặc phong bế) sự tương tác giữa OSM và gp130 trong việc điều trị bệnh hoặc rối loạn đáp ứng với tác dụng điều hòa tương tác đó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến quy trình điều trị cho bệnh nhân bị mắc bệnh viêm hoặc rối loạn, quy trình này bao gồm bước sử

dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình làm cho kháng thể tương thích với người, quy trình này bao gồm các bước: thu kháng thể không phải của người mà liên kết với kháng nguyên đích, đạt được cấu trúc tinh thể học của đồng tinh thể kháng thể-kháng nguyên, xác định đến khoảng 2-5Å từ cấu trúc tinh thể này các gốc của kháng thể không phải của người này liên quan trực tiếp đến sự liên kết với kháng nguyên, gây đột biến một hoặc nhiều gốc mà không liên quan đến sự liên kết thành gốc thu được từ trình tự của người và thu hồi kháng thể này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: ELISA gp130 người - Ưc chế sự liên kết OSM người vào gp130 người bằng 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào với mục đích so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện đại diện cho một trong bốn lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 2: thử nghiệm tế bào KB – Ưc chế OSM người bởi 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 3: thử nghiệm tế bào KB - Ưc chế OSM người khi có mặt huyết thanh AB người 25% bởi 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện đại diện cho một trong 2 lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 4: thử nghiệm gp130 người OSM nội sinh - Ưc chế sự liên kết OSM người nội sinh vào gp130 bởi các kháng thể 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (110) được bổ sung vào để so

sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong hai đối tượng cho.

Fig. 5: thử nghiệm tế bào KB- thiếu tác dụng ức chế LIF người bởi 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. mAb kháng LIF người thương mại (R&D Systems, MAB250) được sử dụng làm đối chứng dương. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm.

Fig. 6: thử nghiệm tế bào KB- Ức chế OSM Marmoset bởi 10G8, 9G2, 3E3 & 2B7. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong hai lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 7: so sánh trình tự VH của các thể lai 2B7, 3E3, 9G2 và 10G8. Các gốc được đóng khung nhỏ thể hiện sự khác biệt so với đa số. Các trình tự chạy ngang được đóng khung lớn thể hiện CDR'S.

Fig. 8: so sánh các trình tự VL của các thể lai 2B7, 3E3, 9G2 và 10G8. Các gốc được đóng khung nhỏ thể hiện sự khác biệt so với đa số. Các trình tự chạy ngang được đóng khung lớn thể hiện CDR'S.

Fig. 9: phân tích trình tự của chuỗi nhẹ biến đổi – của 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7 so với kháng thể mẹ 15E10 của chuột kháng OSM không cạnh tranh.

Fig. 10: phân tích trình tự của chuỗi nặng biến đổi – của 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7 so với kháng thể mẹ 15E10 của chuột kháng OSM không cạnh tranh.

Fig. 11: ELISA liên kết OSM người trực tiếp - So sánh sự liên kết OSM người của các thể khảm 10G8 và 9G2 với thể khảm 15E10 (15E10c).

Fig. 12: ELISA gp130 người - ức chế sự liên kết OSM người vào gp130 người bởi 10G8, thể khảm 10G8, 9G2 & thể khảm 9G2. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh.

Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 13: thử nghiệm tế bào KB- Ức chế OSM người bởi 10G8, thể khảm 10G8, 9G2 & thể khảm 9G2. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 14: thử nghiệm tế bào KB- Ức chế OSM người khi có mặt huyết thanh AB của người 25% bởi 10G8, thể khảm 10G8, 9G2 & thể khảm 9G2. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 15: thử nghiệm gp130 người Osm nội sinh - Ức chế sự liên kết OSM người nội sinh vào gp130 người bởi các kháng thể 10G8, kháng thể khảm 10G8, 9G2 & kháng thể khảm 9G2. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong hai đối tượng cho.

Fig. 16: thử nghiệm tế bào KB LIF của người- Không có tác dụng ức chế LIF người bởi 10G8, kháng thể khảm 10G8, 9G2 & kháng thể khảm 9G2. Kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh (15E10) được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể kháng LIF người (MAB250, R&D Systems) được sử dụng làm đối chứng dương. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 17: thử nghiệm tế bào KB- Ức chế OSM người bởi các biến thể 10G8 L1 được làm cho tương thích với người và L4. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 18: ELISA gp130 người- Ước chế sự liên kết OSM người vào gp130 người bởi biến thể 10G8 H0L1 được làm tương thích với người, H1L1 và H2L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong hai lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 19: phức hợp liên kết OSM người-10G8 mAb – liên kết OSM người với chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của 10G8 mAb. Các vị trí liên kết với thụ thể OSM được thể hiện (vị trí II và vị trí III). Các gốc axit amin quan trọng trong vùng liên kết thụ thể được liệt kê cho mỗi vị trí.

Fig. 20: Thử nghiệm tế bào KB- Ước chế OSM người bởi các kháng thể biến đổi 10G8 H0L1 CDRH1 được làm tương thích với người và CDRL2. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 21: ELISA gp130 người - Ước chế sự liên kết OSM người vào gp130 người bởi kháng thể mẹ 10G8 của chuột, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ 10G8 H0L1 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 22: Thử nghiệm tế bào KB- ước chế OSM người bởi kháng thể mẹ 10G8 của chuột, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ 10G8 H0L1 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm

Fig. 23: Thử nghiệm tế bào KB- ước chế OSM người khi có mặt huyết thanh AB người 25% bởi kháng thể mẹ 10G8 của chuột, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ 10G8 H0L1 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(H1)L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng

dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong hai lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 24: Thử nghiệm OSM nội sinh Gp130 người - Ức chế sự liên kết của OSM nội sinh của người vào Gp130 người bởi kháng thể mẹ 10G8 của chuột, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ 10G8 H0L1 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong bốn đối tượng cho.

Fig. 25: Thử nghiệm tế bào KB LIF người- Không có sự ức chế LIF người bởi kháng thể mẹ 10G8 của chuột, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ 10G8 H0L1 được làm tương thích với người (H0L1), H0(huCDRH1)L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể kháng LIF người (MAB250, R&D Systems) được sử dụng làm đối chứng dương. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 26: Thử nghiệm tế bào gan nguyên phát của người - Ức chế sự giải phóng amyloid A huyết thanh (Serum Amyloid A: SAA) bởi H0(huCDRH1)L1 từ các tế bào gan người được kích thích bằng OSM người (A) 3ng/ml và (B) 10ng/ml. 15E10 được làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong 3 đối tượng cho tế bào gan.

Fig. 27: Thử nghiệm tế bào gan nguyên phát của người - Ức chế sự giải phóng protein phản ứng C (C-Reactive Protein: CRP) bởi H0(huCDRH1)L1 từ các tế bào gan của người được kích thích bằng OSM người (A) 3ng/ml và (B) 10ng/ml. 15E10 được làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba đối tượng cho tế bào gan.

Fig. 28: thử nghiệm tương tự nguyên bào sợi RA của người - Ức chế giải phóng IL-6 bởi H0(huCDRH1)L1 từ tế bào hoạt dịch tương tự

nguyên bào sợi RA của người (HFLS-RA) đã được kích thích bằng OSM người (A) 0,3ng/ml và (B) 3ng/ml. 15E10 được làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba đối tượng cho HFLS-RA.

Fig. 29: thử nghiệm tương tự nguyên bào sợi RA người - Ức chế giải phóng MCP-1 bởi H0(huCDRH1)L1 từ tế bào hoạt dịch tương tự nguyên bào sợi RA của người (HFLS-RA) đã được kích thích bằng OSM người (A) 0,3ng/ml và (B) 3ng/ml. 15E10 đã làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba đối tượng cho HFLS-RA.

Fig. 30: thử nghiệm tế bào màng trong của tĩnh mạch rốn người - Ức chế sự giải phóng IL-6 bởi H0(huCDRH1)L1 từ tế bào màng trong của tĩnh mạch rốn người đã được kích thích bằng OSM người (A) 30ng/ml và (B) 100ng/ml. 15E10 được làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho một trong ba lần lặp lại thử nghiệm.

Fig. 31: thử nghiệm nguyên bào sợi phổi người - Ức chế sự giải phóng MCP-1 bởi H0(huCDRH1)L1 từ nguyên bào sợi phổi người được kích thích bằng OSM người. 15E10 được làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho (A) một đối tượng khỏe mạnh và (B) một đối tượng cho IPF.

Fig. 32: thử nghiệm nguyên bào sợi phổi người - Ức chế sự giải phóng IL-6 bởi H0(huCDRH1)L1 từ nguyên bào sợi phổi người đã được kích thích bằng OSM người. 15E10 được làm tương thích với người (được gắn nhãn kháng thể X) được bổ sung vào để so sánh. Số liệu được thể hiện là đại diện cho (A) một đối tượng khỏe mạnh và (B) một đối tượng cho IPF.

Fig. 33: số liệu liên kết biến thể CDRH3– Việc sàng lọc alanin được thực hiện trên các gốc đã phát hiện ra trong CDRH3. Số liệu được cung cấp chỉ ra ái lực liên kết bị ảnh hưởng bởi sự thay đổi gốc này như thế nào.

Fig. 34: Minh họa cho tương tác giữa hOSM và gp130, LIFR và OSMR.

Danh pháp của các kháng thể - để tránh nghi vấn, 15E10h và 15E10 được làm tương thích với người đề cập đến cùng một kháng thể và được đánh dấu kháng thể X trong một số fig. Tương tự 10G8/A9 và 10G8 đề cập đến cùng một kháng thể.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với OSM, ví dụ liên kết đặc hiệu với OSM người (hOSM) và ngăn cản sự liên kết của OSM với thụ thể gp130 nhưng không tương tác trực tiếp với các gốc vị trí II.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả protein liên kết kháng nguyên không liên kết trực tiếp với các gốc Q20, G120, Q16, N124.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả protein liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với OSM, ví dụ, liên kết đặc hiệu với OSM người (hOSM) và ngăn cản sự liên kết của OSM với thụ thể gp130 và tương tác với một hoặc nhiều gốc 82, 83, 84, 90, 94, 112, 115, 122, 123, 152 của hu OSM.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với OSM, ví dụ, liên kết đặc hiệu với OSM người (hOSM) và ngăn cản sự liên kết của OSM với thụ thể gp130 nhưng không tương tác trực tiếp với các gốc vị trí II và không cạnh tranh với kháng thể có chuỗi nặng của SEQ ID NO.79 và chuỗi nhẹ của SEQ ID NO. 80 trong thử nghiệm ELISA cạnh tranh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh với protein liên kết kháng nguyên như được mô tả ở đây để liên kết với OSM ví dụ, OSM người.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể này liên kết với OSM người với ái lực cao, ví dụ, khi được đo bằng Biacore protein liên kết kháng nguyên này

liên kết với OSM người với ái lực là 500pM hoặc nhỏ hơn hoặc ái lực là 400pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 300pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 250pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 200pM hoặc nhỏ hơn, hoặc ví dụ, 140pM hoặc nhỏ hơn. Theo một phương án nữa, protein liên kết kháng nguyên này liên kết với OSM người khi được đo bằng Biacore từ khoảng 100pM đến 500pM hoặc từ khoảng 100pM đến khoảng 300pM, hoặc từ khoảng 100pM đến 250pM, hoặc từ khoảng 100pM đến khoảng 200pM. Theo một phương án của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên liên kết với OSM với ái lực nhỏ hơn 250pm. Theo một phương án nữa của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên liên kết với OSM với ái lực nhỏ hơn 140pm.

Trong một phương án, ái lực này được đo bằng Biacore, ví dụ như được chỉ ra trong ví dụ 1.2.2.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể này liên kết với OSM người với ái lực cao, ví dụ khi được đo bằng quy trình Kinexa dựa trên dung dịch, protein liên kết kháng nguyên này liên kết với OSM người với ái lực là 200pM hoặc nhỏ hơn hoặc ái lực là 150pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 100pM hoặc nhỏ hơn, hoặc 50pM hoặc nhỏ hơn hoặc ví dụ, 40pM hoặc nhỏ hơn. Trong một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên này liên kết với OSM người khi được đo bằng Kinexa là từ 10pM đến khoảng 200pM hoặc từ khoảng 10pM đến khoảng 150pM, hoặc từ khoảng 10pM đến khoảng 100pM, hoặc từ khoảng 10pM đến khoảng 70pM hoặc từ khoảng 10pM đến khoảng 40pM. Trong một phương án theo sáng chế, protein liên kết kháng nguyên liên kết với OSM với ái lực thấp hơn 70pm. Trong một phương án khác của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên liên kết với OSM với ái lực nhỏ hơn 40pm.

Trong một phương án, ái lực này được đo bằng Kinexa, ví dụ, như được chỉ ra trong ví dụ 1.2.2.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế liên kết với OSM người và trung hòa OSM trong thử nghiệm trung hòa tế bào, trong đó protein liên kết kháng nguyên này có IC50 từ khoảng 10pM đến khoảng 200pM,

hoặc từ khoảng 10pM đến khoảng 150pM, hoặc từ khoảng 10pM đến 100pM, hoặc từ khoảng 20pM đến khoảng 100pM, hoặc từ khoảng 20pM đến khoảng 100pM. Trong một phương án nữa của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên này liên kết với OSM và trung hòa OSM trong thử nghiệm trung hòa tế bào, trong đó protein liên kết kháng nguyên này có IC50 là khoảng 20pM với ái lực nhỏ hơn 140pm.

Trong một phương án, trị số này được đo bằng thử nghiệm trung hòa tế bào, ví dụ, như được chỉ ra trong ví dụ 2, phần 2.2.1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thêm là protein liên kết kháng nguyên này chứa CDRH3 của SEQ ID NO. 3 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 3, trong đó CDRH3 được thế bằng các axit amin thay thế được chỉ ra dưới đây ở một hoặc nhiều vị trí sau đây (sử dụng cách đánh số Kabat):

Vị trí 95 được thay thế bằng Ala, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Gln, Ser, Thr, hoặc Val

Vị trí 96 được thay thế bằng Ala, Cys, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Ser, Thr, Trp hoặc Tyr

Vị trí 97 được thay thế bằng Ala, Cys, Phe, Met hoặc Ser

Vị trí 98 được thay thế bằng Ala, Asp, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln hoặc Trp

Vị trí 99 được thay thế bằng Ala, Cys, Pro, Ser, Val hoặc Tyr

Vị trí 100B được thay thế bằng Glu

Vị trí 100C được thay thế bằng Ala, Glu, Phe, Gly, Val hoặc Trp

Vị trí 100D được thay thế bằng Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, Thr, Val, Trp hoặc Tyr

Vị trí 101 được thay thế bằng Glu, Gly, Ser, Thr hoặc Val

Vị trí 102 được thay thế bằng Ala, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser Tyr, His, Ile, Asp hoặc Trp

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này chứa:

i) CDRH3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 3 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 3, trong đó Val 102 được thay thế bằng Tyr, His, Ile, Ser, Asp hoặc Gly

ii) CDRH2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 2 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 2, trong đó Thr50 được thay thế bằng Gly, Tyr, Phe, Ile, Glu hoặc Val và/hoặc Ile51 được thay thế bằng Leu, Val, Thr, Ser hoặc Asn và/hoặc Ser52 được thay thế bằng Phe, Trp hoặc His và/hoặc Gly53 được thay thế bằng Asp, Ser hoặc Asn và/hoặc Gly54 được thay thế bằng Ser và/hoặc Phe56 được thay thế bằng Ser, Tyr, Thr, Asn, Asp or Arg và/hoặc Tyr58 được thay thế bằng Gly, His, Phe, Asp hoặc Asn.

iii) CDRL1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 4 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 4, trong đó Ser27A được thay thế bằng Asn, Asp, Thr hoặc Glu và/hoặc Ser 27C được thay thế bằng Asp, Leu, Tyr, Val, Ile, Asn, Phe, His, Gly hoặc Thr và/hoặc Asn 31 được thay thế bằng Ser, Thr, Lys hoặc Gly và/hoặc Phe32 được thay thế bằng Tyr, Asn, Ala, His, Ser hoặc Arg và/hoặc Met 33 được thay thế bằng Leu, Val, Ile hoặc Phe.

iv) CDRL3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 6 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 6 trong đó Leu89 được thay thế bằng Gln, Ser, Gly hoặc Phe và/hoặc His90 được thay thế bằng Gln hoặc Asn, Ser 91 được thay thế bằng Asn, Phe, Gly, Arg, Asp, His, Thr, Tyr hoặc Val và/hoặc Arg92 được thay thế bằng Asn, Tyr, Trp, Thr, Ser, Gln, His, ala hoặc Asp và/hoặc Glu93 được thay thế bằng Asn, Gly, His, Thr, Ser, Ar hoặc Ala và/hoặc Phe96 được thay thế bằng Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile, hoặc Trp.

Vẫn theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này chứa thêm:

v) CDRL2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 78

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này chứa thêm:

vi) CDRH1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 77 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 77, trong đó Tyr 32 được thay thế bằng Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu hoặc Asp và/hoặc Ala 33 được thay thế bằng Tyr, Trp, Gly, Thr, Leu hoặc Val và/hoặc Met 34 được thay thế bằng

Ile, Val hoặc Trp và/hoặc Ser 35 được thay thế bằng His, Glu, Asn, Gln, Tyr hoặc Thr.

Các trình tự CDR biến đổi cho L1, L2, L3, H1 và H2 của CDR được xác định bằng cách sử dụng công nghệ gây đột biến và/hoặc công nghệ chuẩn. Các vùng quyết định bổ sung (complementarity determining region: CDR) L1, L2, L3, H1 và H2 có xu hướng thể hiện về mặt cấu trúc một cấu hình mạch chính trong một số lượng có hạn các cấu hình mạch chính. Lớp cấu trúc kinh điển cụ thể của CDR được xác định bằng cả chiều dài của CDR và việc đóng vòng, được xác định bởi các gốc nằm ở các vị trí quan trọng trong cả CDR và vùng khung (các gốc quyết định cấu trúc hoặc SDR). Martin và Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815) đã tạo ra phương pháp tự động để xác định các khuôn kinh điển “gốc quan trọng”. Phân tích nhóm được sử dụng để xác định các lớp kinh điển cho các tập hợp CDR, và sau đó các khuôn kinh điển được nhận diện bằng cách phân tích các gốc liên kết hydro, kỵ nước bị che đi, và các glyxin và prolin được bảo tồn. Các CDR của các trình tự kháng thể có thể được chỉ định cho các lớp kinh điển bằng cách so sánh các trình tự này với các khuôn gốc quan trọng và tính điểm mỗi khuôn bằng cách sử dụng ma trận tương tự hoặc ma trận tương đồng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể chứa CDR H3 của SEQ. ID. NO: 3: CDRH2: SEQ. ID. NO: 2: CDRL1: SEQ. ID. NO: 4 và CDRL3: SEQ. ID. NO: 6 và có thể chứa thêm CDR H1 của SEQ. ID. NO: 1 hoặc SEQ ID NO 77 và CDRL2: SEQ. ID. NO: 5 hoặc SEQ ID NO. 78

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên chứa CDR H3 của SEQ. ID. NO: 3: CDRH2: SEQ. ID. NO: 2: CDRL1: SEQ. ID. NO: 4: CDRL2: SEQ. ID. NO: 5 và CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

Vẫn theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này chứa CDR H3 của SEQ. ID. NO: 3: CDRH2: SEQ. ID. NO: 2: CDR H1 của SEQ. ID. NO: 1: CDRL1: SEQ. ID. NO: 4: CDRL2: SEQ. ID. NO: 5 và CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

Vẫn theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này chứa CDR H3 của SEQ. ID. NO: 3: CDRH2: SEQ. ID. NO: 2: CDR H1 của SEQ. ID. NO: 1: CDRL1: SEQ. ID. NO: 4: CDRL2: SEQ. ID. NO: 78 và CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này chứa CDR H3 của SEQ. ID. NO: 3: CDRH2: SEQ. ID. NO: 2: CDR H1 của SEQ. ID. NO: 77: CDRL1: SEQ. ID. NO: 4: CDRL2: SEQ. ID. NO: 5 và CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

Vẫn theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này chứa CDR H3 của SEQ. ID. NO: 3: CDRH2: SEQ. ID. NO: 2: CDR H1 của SEQ. ID. NO: 77: CDRL1: SEQ. ID. NO: 4: CDRL2: SEQ. ID. NO: 78 và CDRL3: SEQ. ID. NO: 6.

Theo một khía cạnh của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên này không tương tác trực tiếp qua CDR H1 với OSM.

Theo một khía cạnh, protein liên kết kháng nguyên này không tương tác trực tiếp qua CDR H1 hoặc CDR L2 với OSM.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo sáng chế mà có thể được định dạng thành cấu trúc của kháng thể tự nhiên hoặc một đoạn chức năng hoặc tương tự của nó. Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế do đó có thể chứa các vùng VH theo sáng chế được định dạng thành kháng thể có chiều dài đầy đủ, đoạn (Fab')₂, đoạn Fab, hoặc dạng tương tự của nó (như scFV, bi-tri- hoặc tetra-bodies, Tandabs v.v...), khi được tạo cặp với chuỗi nhẹ thích hợp. Kháng thể này có thể là IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4; hoặc IgM; IgA, IgE hoặc IgD hoặc biến thể được cải biến của nó. Vùng chức năng hằng định của chuỗi nặng kháng thể có thể được lựa chọn. Vùng chức năng hằng định chuỗi nhẹ có thể là vùng chức năng hằng định kappa hoặc lambda. Ngoài ra, protein liên kết kháng nguyên này có thể chứa các biến đổi của tất cả các lớp, ví dụ, dime IgG, các đột biến Fc mà không còn liên kết với thụ thể Fc hoặc

gây ra sự liên kết với C1q. Protein liên kết kháng nguyên này cũng có thể là kháng thể khảm thuộc typ đã được mô tả trong WO86/01533 chứa vùng liên kết kháng nguyên và vùng không phải globulin miễn dịch.

Vùng hằng định được lựa chọn theo chức năng bất kỳ được yêu cầu. IgG1 có thể thể hiện chức năng phân hủy thông qua việc liên kết với bổ thể và/hoặc sẽ gây ra ADCC (gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể). IgG4 có thể được sử dụng nếu kháng thể phong bế không gây độc tế bào được yêu cầu. Tuy nhiên, các kháng thể IgG4 có thể thể hiện tính không ổn định khi được sản xuất và do đó giải pháp thay thế là cải biến IgG1 ổn định hơn thông thường. Các biến đổi gợi ý được mô tả trong EP0307434, ví dụ, các đột biến ở vị trí 235 và 237. Do đó, sáng chế đề xuất dạng phân hủy hoặc không phân hủy của protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, kháng thể theo sáng chế.

Ở một số dạng, kháng thể theo sáng chế là kháng thể IgG1 phân hủy hoặc không phân hủy có chiều dài đầy đủ (ví dụ, tetrame H2L2) có bất kỳ trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng được mô tả ở đây.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế thu được từ kháng thể chuột có các vùng biến đổi như được mô tả trong SEQ ID NO:26 và SEQ ID NO:28 hoặc dạng tương đương không phải của chuột của chúng, như các biến thể của chuột cống, người, khảm hoặc được làm tương thích với người của chúng, ví dụ, chúng có nguồn gốc từ kháng thể được làm tương thích với người có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được mô tả trong SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:62.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên chứa vùng chức năng biến đổi chuỗi nặng được phân lập được chọn từ bất kỳ trong số sau đây: SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO.58 hoặc SEQ ID NO: 74.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên chứa vùng chức năng biến đổi chuỗi nhẹ được phân lập được chọn từ

bất kỳ trong số: SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 64, SEQ ID NO.66 hoặc SEQ ID NO.68.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên chứa vùng chức năng biến đổi chuỗi nặng được phân lập được chọn từ bất kỳ trong số: SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO.58 hoặc SEQ ID NO: 74 và vùng chức năng biến đổi chuỗi nhẹ được phân lập được chọn từ bất kỳ trong số: SEQ ID NO 62, SEQ ID NO 64, SEQ ID NO.66 hoặc SEQ ID NO.68.

Trong một phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên chứa vùng chức năng biến đổi chuỗi nặng được phân lập của SEQ ID NO 54 và vùng chức năng biến đổi chuỗi nhẹ được phân lập của SEQ ID NO 62. Trong một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ. ID. NO:74 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ. ID. NO:62.

Theo một khía cạnh, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế chứa a vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi SEQ. ID. NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi SEQ. ID. NO:61

Theo một khía cạnh, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi SEQ. ID. NO:73 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi SEQ. ID. NO:61.

Theo một khía cạnh, được đề xuất là polynucleotit mã hóa chuỗi nặng biến đổi được phân lập, polynucleotit này chứa SEQ. ID. NO. 53, hoặc SEQ. ID. NO. 55, hoặc SEQ. ID. NO. 57, hoặc SEQ. ID. NO. 73.

Theo một khía cạnh, được đề xuất là polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ biến đổi đã phân lập, polynucleotit này chứa SEQ. ID. NO. 61, hoặc SEQ. ID. NO. 63, hoặc SEQ. ID. NO. 65, hoặc SEQ. ID. NO. 67.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa an chuỗi nặng biến đổi đã phân lập, polynucleotit này chứa SEQ. ID. NO. 53, hoặc SEQ. ID. NO. 73 và polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ biến đổi đã phân

lập, polynucleotit này chứa SEQ. ID. NO. 61, hoặc SEQ. ID. NO. 63, hoặc SEQ. ID. NO. 65, hoặc SEQ. ID. NO. 67. Theo một khía cạnh khác, được đề xuất là polynucleotit mã hóa chuỗi nặng biến đổi đã phân lập polynucleotit này chứa SEQ. ID. NO. 53 hoặc SEQ. ID. NO. 73 và polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ biến đổi đã phân lập, polynucleotit này chứa SEQ. ID. NO. 61.

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này có thể chứa bất kỳ một trong nhiều chuỗi nặng biến đổi như được mô tả ở đây kết hợp với bất kỳ một trong số nhiều chuỗi nhẹ như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR theo sáng chế được mô tả ở đây, hoặc một hoặc cả hai vùng chức năng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc nặng theo sáng chế được mô tả ở đây. Trong một phương án, kháng thể này liên kết với OSM linh trường. Trong một phương án, kháng thể này liên kết thêm với OSM của động vật linh trường không phải người, ví dụ, OSM khỉ cynomolgus macaque. Trong một phương án khác, kháng thể này liên kết với OSM khỉ đuôi sóc.

Theo một khía cạnh, được đề xuất là kháng thể liên kết với cả OSM người và OSM khỉ đuôi sóc với ái lực mạnh hơn 1nM khi được đo bằng Biacore hoặc Kinexa.

Khả năng trung hòa OSM khỉ đuôi sóc của các kháng thể này cung cấp cách thức duy nhất để đánh giá vai trò của OSM trong các mô hình bệnh ở khỉ đuôi sóc, như mô hình EAE của MS, đối với các chỉ định bổ sung.

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, kháng thể kép, kháng thể bộ ba, kháng thể bộ bốn, kháng thể nhỏ, và thể nhỏ.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, protein liên kết kháng nguyên này được làm tương thích với người hoặc kháng thể khảm, theo một khía cạnh khác, kháng thể này được làm tương thích với người.

Theo một khía cạnh, kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

Theo một khía cạnh, kháng thể liên kết đặc hiệu với Oncostatin M (OSM) và ngăn cản sự liên kết của OSM với thụ thể gp130 mà không tương tác trực tiếp với các gốc của vị trí II và trong đó kháng thể này chứa CDRH3 của SEQ ID NO.3 hoặc biến thể của SEQ ID NO.3 trong đó Vị trí 98 được thế bằng Leu, và trong đó kháng thể này chứa:

- i) CDRH2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 2
- ii) CDRL1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 4 và
- iii) CDRL3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 6:

và trong đó kháng thể này liên kết với cả OSM của khỉ Marmoset và OSM người với ái lực mạnh hơn 1nM khi được đo bằng Biacore hoặc kinexa.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thêm protein liên kết kháng nguyên chứa:

- i) CDRH3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 3 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 3, trong đó CDRH3 được thế bằng axit amin thay thế được chỉ ra dưới đây ở một hoặc nhiều vị trí sau đây (sử dụng cách đánh số Kabat):

Vị trí 95 được thay thế bằng Ala, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Gln, Ser, Thr, hoặc Val

Vị trí 96 được thay thế bằng Ala, Cys, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Ser, Thr, Trp hoặc Tyr

Vị trí 97 được thay thế bằng Ala, Cys, Phe, Met hoặc Ser

Vị trí 98 được thay thế bằng Ala, Asp, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln hoặc Trp

Vị trí 99 được thay thế bằng Ala, Cys, Pro, Ser, Val hoặc Tyr

Vị trí 100B được thay thế bằng Glu

Vị trí 100C được thay thế bằng Ala, Glu, Phe, Gly, Val hoặc Trp

Vị trí 100D được thay thế bằng Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, Thr, Val, Trp hoặc Tyr

Vị trí 101 được thay thế bằng Glu, Gly, Ser, Thr hoặc Val

Vị trí 102 được thay thế bằng Ala, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser Tyr, His, Ile, Asp hoặc Trp

ii) CDRH1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 77 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 77, trong đó Tyr 32 được thay thế bằng Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu hoặc Asp và/hoặc Ala 33 được thay thế bằng Tyr, Trp, Gly, Thr, Leu hoặc Val và/hoặc Met 34 được thay thế bằng Ile, Val hoặc Trp và/hoặc Ser 35 được thay thế bằng His, Glu, Asn, Gln, Tyr hoặc Thr.

iii) CDRH2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 2 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 2, trong đó Thr50 được thay thế bằng Gly, Tyr, Phe, Ile, Glu hoặc Val và/hoặc Ile51 được thay thế bằng Leu, Val, Thr, Ser hoặc Asn và/hoặc Ser52 được thay thế bằng Phe, Trp hoặc His và/hoặc Gly53 được thay thế bằng Asp, Ser hoặc Asn và/hoặc Gly54 được thay thế bằng Ser và/hoặc Phe56 được thay thế bằng Ser, Tyr, Thr, Asn, Asp hoặc Arg và/hoặc Tyr58 được thay thế bằng Gly, His, Phe, Asp hoặc Asn.

iv) CDRL1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 4 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 4 trong đó Ser27A được thay thế bằng Asn, Asp, Thr hoặc Glu và/hoặc Ser 27C được thay thế bằng Asp, Leu, Tyr, Val, Ile, Asn, Phe, His, Gly hoặc Thr và/hoặc Asn 31 được thay thế bằng Ser, Thr, Lys hoặc Gly và/hoặc Phe32 được thay thế bằng Tyr, Asn, Ala, His, Ser hoặc Arg và/hoặc Met 33 được thay thế bằng Leu, Val, Ile hoặc Phe.

v) CDRL2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 78

vi) CDRL3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 6 hoặc biến thể của SEQ ID NO. 6, trong đó Leu89 được thay thế bằng Gln, Ser, Gly hoặc Phe và/hoặc His90 được thay thế bằng Gln hoặc Asn, Ser 91 được thay thế bằng Asn, Phe, Gly, Arg, Asp, His, Thr, Tyr hoặc Val và/hoặc Arg92 được thay thế bằng Asn, Tyr, Trp, Thr, Ser, Gln, His, ala hoặc Asp và/hoặc Glu93 được thay thế bằng Asn, Gly, His, Thr, Ser, Ar hoặc Ala và/hoặc Phe96 được thay thế bằng Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile, hoặc Trp.

vii) khung chuỗi nặng chứa các gốc sau đây:

Vị trí 2 Val, Ile hoặc Gly,

Vị trí 4 Leu hoặc Val

Vị trí 20 Leu, Ile, Met hoặc Val

Vị trí 22 Cys

Vị trí 24 Thr, Ala, Val, Gly hoặc Ser

Vị trí 26 Gly

Vị trí 29 Ile, Phe, Leu hoặc Ser

Vị trí 36 Trp

Vị trí 47 Trp

Vị trí 48 Ile, met, Val hoặc Leu

Vị trí 69 Ile, Leu, Phe, Met hoặc Val

Vị trí 71 Arg

Vị trí 78 Ala, Leu, Val, Tyr hoặc Phe

Vị trí 80 Leu, Met,

Vị trí 90 Tyr hoặc Phe

Vị trí 92 Cys

Vị trí 94 Arg, Lys, Gly, Ser, His hoặc Asn

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thêm protein liên kết kháng nguyên chứa:

- i) CDRH3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 3
- ii) CDRH1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 77
- iii) CDRH2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 2
- iv) CDRL1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 4
- v) CDRL2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 78
- vi) CDRL3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 6
- vii) khung chuỗi nặng chứa các gốc sau đây:

Vị trí 2 Val, Ile hoặc Gly,

Vị trí 4 Leu hoặc Val

Vị trí 20 Leu, Ile, Met hoặc Val

Vị trí 22 Cys

Vị trí 24 Thr, Ala, Val, Gly hoặc Ser

Vị trí 26 Gly

Vị trí 29 Ile, Phe, Leu hoặc Ser

Vị trí 36 Trp

Vị trí 47 Trp

Vị trí 48 Ile, met, Val hoặc Leu

Vị trí 69 Ile, Leu, Phe, Met hoặc Val

Vị trí 71 Arg

Vị trí 78 Ala, Leu, Val, Tyr hoặc Phe

Vị trí 80 Leu, Met,

Vị trí 90 Tyr hoặc Phe

Vị trí 92 Cys

Vị trí 94 Arg, Lys, Gly, Ser, His hoặc Asn

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thêm protein liên kết kháng nguyên chứa:

- i) CDRH3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 3
- ii) CDRH1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 77
- iii) CDRH2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 2
- iv) CDRL1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 4
- v) CDRL2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 78
- vi) CDRL3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 6
- vii) khung chuỗi nặng chứa các gốc sau đây:

Vị trí 2 Val

Vị trí 4 Leu

Vị trí 20 Leu

Vị trí 22 Cys

Vị trí 24 Ala

Vị trí 26 Gly

Vị trí 29 Phe

Vị trí 36 Trp

Vị trí 47 Trp

Vị trí 48 Val

Vị trí 69 Ile

Vị trí 71 Arg

Vị trí 78 Leu

Vị trí 80 Leu

Vị trí 90 Tyr

Vị trí 92 Cys

Vị trí 94 Arg

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thêm protein liên kết kháng nguyên chứa:

- i) CDRH3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 3
- ii) CDRH1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 77
- iii) CDRH2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 2
- iv) CDRL1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 4
- v) CDRL2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 78
- vi) CDRL3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 6
- vii) khung chuỗi nặng chứa các gốc sau đây:

Vị trí 2 Val

Vị trí 4 Leu

Vị trí 20 Leu

Vị trí 22 Cys

Vị trí 24 Ala

Vị trí 26 Gly

Vị trí 29 Phe

Vị trí 36 Trp

Vị trí 47 Trp

Vị trí 48 Leu

Vị trí 69 Ile, Leu, Phe, Met hoặc Val

Vị trí 71 Arg

Vị trí 78 Ala

Vị trí 80 Leu, Met,

Vị trí 90 Tyr hoặc Phe

Vị trí 92 Cys

Vị trí 94 Arg, Lys, Gly, Ser, His hoặc Asn

Các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách chuyển nhiễm tế bào chủ bằng vector biểu hiện chứa trình tự mã hóa protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Vector biểu hiện hoặc plasmid tái tổ hợp được sản xuất bằng cách đặt các trình tự mã hóa protein liên kết kháng nguyên này trong môi trường hoạt động với các trình tự kiểm soát điều hòa thông thường có khả năng kiểm soát sự sao chép và biểu hiện, và/hoặc sự tiết từ, tế bào chủ. Các trình tự điều hòa bao gồm các trình tự khởi động, ví dụ, trình tự khởi động CMV, và các trình tự tín hiệu mà có thể thu được từ các kháng thể đã biết khác. Tương tự, vector biểu hiện thứ hai có thể được tạo ra có trình tự ADN mã hóa chuỗi nhẹ hoặc nặng của protein liên kết kháng nguyên bổ sung. Trong một số phương án, vector biểu hiện thứ hai này là giống như vector thứ nhất trừ khi các trình tự mã hóa và các gen đánh dấu lựa chọn được được quan tâm, nhờ đó đảm bảo hết mức có thể là mỗi mạch polypeptit được biểu hiện về mặt chức năng. Ngoài ra, trình tự mã hóa chuỗi nặng và nhẹ cho protein liên kết kháng nguyên có thể nằm trong một vector duy nhất.

Tế bào chủ đã chọn được đồng chuyển nhiễm bằng các kháng thể thông thường với vector thứ nhất và thứ hai (hoặc được chuyển nhiễm đơn giản bằng một vector duy nhất) để tạo ra tế bào chủ được chuyển nhiễm theo sáng chế chứa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tổng hợp hoặc tái tổ hợp. Sau đó, tế bào đã chuyển nhiễm này được nuôi cấy bằng các kỹ thuật thông thường để tạo ra kháng thể được thao tác di truyền theo sáng chế. Kháng thể mà bao gồm sự

kết hợp của cả chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ tái tổ hợp được sàng lọc từ môi trường nuôi cấy bằng thử nghiệm thích hợp, như ELISA hoặc RIA. Các kháng thể thông thường tương tự có thể được sử dụng để tạo ra các protein liên kết kháng nguyên khác.

Các vector thích hợp cho bước tách dòng và tách dòng phụ được sử dụng trong các quy trình và cấu trúc của các thành phần theo sáng chế có thể được lựa chọn bởi chuyên gia trong lĩnh vực này. Ví dụ, chuỗi pUC thông thường của các vector tách dòng có thể được sử dụng. Một vector, pUC19, đã có trên thị trường từ các nhà cung cấp, như Amersham (Buckinghamshire, United Kingdom) hoặc Pharmacia (Uppsala, Sweden). Thêm vào đó, vector bất kỳ mà có khả năng sao chép dễ dàng, có nhiều vị trí tách dòng và gen lựa chọn được (ví dụ, kháng kháng sinh), và được thao tác di truyền dễ dàng có thể được sử dụng để tách dòng. Vì vậy, việc lựa chọn vector tách dòng này không phải là yếu tố giới hạn trong sáng chế này.

Các vector biểu hiện này cũng có thể được đặc trưng bởi các gen thích hợp để khuếch đại sự biểu hiện của các trình tự ADN khác loại, ví dụ, gen dihydrofolat reductaza của động vật có vú (DHFR). Các trình tự vector khác bao gồm trình tự tín hiệu poly A, như từ hormon tăng trưởng của bò (bovine growth hormone: BGH) và trình tự khởi động betaglobin (betaglobin). Vector biểu hiện hữu ích ở đây có thể được tổng hợp bằng các kháng thể đã được biết rõ bởi các chuyên gia trong lĩnh vực này.

Các thành phần của các vector này, ví dụ, replicon, gen lựa chọn, yếu tố tăng cường, trình tự khởi động, trình tự tín hiệu và các thành phần tương tự, có thể thu được từ các nguồn tự nhiên hoặc thương mại hoặc được tổng hợp bằng các quy trình đã biết để sử dụng trong việc điều khiển sự biểu hiện và/hoặc sự tiết của sản phẩm chứa ADN tổ hợp trong vật chủ đã chọn. Các vector biểu hiện thích hợp khác mà nhiều typ của chúng đã được biết trong lĩnh vực này để biểu hiện ở động vật có vú, vi khuẩn, côn trùng, nấm men, và nấm cũng có thể được lựa chọn cho mục đích này.

Sáng chế cũng bao gồm dòng tế bào được chuyển nhiễm với plasmid tái tổ hợp chứa các trình tự mã hóa của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Các tế bào chủ hữu ích để tách dòng và các thao tác di truyền khác của các vector tách dòng này cũng là thông thường. Tuy nhiên, các tế bào từ nhiều chủng khác nhau của *E. coli* có thể được sử dụng để sao chép các vector tách dòng và cho các bước khác trong việc cấu trúc các kháng thể theo sáng chế.

Các tế bào hoặc dòng tế bào chủ thích hợp cho sự biểu hiện protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các tế bào động vật có vú như NS0, Sp2/0, CHO (ví dụ, DG44), COS, HEK, tế bào nguyên bào sợi (ví dụ, 3T3), và tế bào u tủy, ví dụ, nó có thể được biểu hiện trong tế bào CHO hoặc tế bào u tủy. Các tế bào của người có thể được sử dụng, nhờ đó làm cho phân tử này có thể được cải biến với mô hình glycosyl hóa người. Ngoài ra, các dòng tế bào nhân chuẩn khác có thể được sử dụng. Việc lựa chọn tế bào chủ động vật có vú thích hợp và các phương pháp để biến nạp, nuôi cấy, khuếch đại, sàng lọc và sản xuất và tinh chế sản phẩm là đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Sambrook et al., được trích dẫn trên đây.

Các tế bào vi khuẩn có thể là hữu ích để làm tế bào chủ thích hợp cho sự biểu hiện Fab tái tổ hợp hoặc các phương án khác theo sáng chế (xem, ví dụ, Plücker, A., *Immunol. Rev.*, 130:151-188 (1992)). Tuy nhiên, do xu hướng là các protein được biểu hiện trong tế bào vi khuẩn là ở dạng không cuộn hoặc dạng được cuộn không thích hợp hoặc ở dạng không được glycosyl hóa, Fab tái tổ hợp bất kỳ được tạo ra trong tế bào vi khuẩn phải được sàng lọc để giữ lại khả năng liên kết với kháng nguyên. Nếu phân tử được biểu hiện bởi tế bào vi khuẩn này được tạo ra ở dạng được gấp thích hợp, tế bào vi khuẩn đó sẽ là vật chủ mong muốn, hoặc trong các phương án khác phân tử này có thể biểu hiện trong vật chủ vi khuẩn và sau đó được gấp lại tiếp. Ví dụ, nhiều chủng khác nhau của *E. coli* được sử dụng để biểu hiện đã được biết rõ là các tế bào chủ trong lĩnh vực công nghệ sinh học. Nhiều chủng khác nhau

của *B. subtilis*, *Streptomyces*, các bacillus khác và các chủng tương tự cũng có thể được sử dụng trong phương pháp này.

Nếu muốn, các chủng của tế bào nấm men đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực này cũng sẵn có để làm tế bào chủ, cũng như các tế bào côn trùng, ví dụ *Drosophila* và *Lepidoptera* và hệ thống biểu hiện virus. Xem, ví dụ, Miller et al., *Genetic Engineering*, 8:277-298, Plenum Press (1986) và các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở đây.

Các phương pháp chung mà nhờ đó các vector này có thể được cấu trúc, các phương pháp chuyển nhiễm cần thiết để tạo ra các tế bào chủ theo sáng chế, và các phương pháp nuôi cấy cần thiết để tạo ra kháng thể theo sáng chế từ tế bào chủ này có thể là các kỹ thuật thông thường. Thông thường, phương pháp nuôi cấy theo sáng chế là phương pháp nuôi cấy không có huyết thanh, thường bằng cách nuôi cấy tế bào không có huyết thanh trong huyền phù. Tương tự, khi được tạo ra, kháng thể theo sáng chế có thể được tinh chế từ các thành phần của môi trường nuôi cấy tế bào theo các quy trình chuẩn trong lĩnh vực này, bao gồm kết tủa amoni sulfat, cột ái lực, sắc ký cột, điện di gel và tương tự. Các kháng thể này nằm trong chuyên môn của lĩnh vực này và không làm hạn chế sáng chế này. Ví dụ, các quy trình bào chế các kháng thể biến đổi được mô tả trong WO 99/58679 và WO 96/16990.

Phương pháp khác để biểu hiện kháng thể có thể sử dụng sự biểu hiện ở động vật chuyển gen, như được mô tả trong patent Mỹ số 4,873,316. Tài liệu này liên quan đến hệ biểu hiện sử dụng trình tự khởi động casein của động vật mà khi được kết hợp chuyển gen vào động vật có vú cho phép động vật cái tạo ra protein tái tổ hợp mong muốn trong sữa của nó.

Trong một phương án theo sáng chế, được đề xuất là phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm bằng vector mã hóa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế và thu hồi kháng thể được sản xuất ra này.

Theo sáng chế này, được đề xuất là phương pháp sản xuất kháng thể kháng OSM theo sáng chế mà liên kết vào hoặc trung hòa hoạt tính OSM người, phương pháp này bao gồm các bước;

- (a) tạo ra vector thứ nhất mã hóa chuỗi nặng của kháng thể này;
- (b) tạo ra vector thứ hai mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể này;
- (c) biến nạp tế bào chủ động vật có vú (ví dụ, CHO) với vector thứ nhất và vector thứ hai này;
- (d) nuôi cấy tế bào chủ của bước (c) trong các điều kiện có lợi để tiết kháng thể từ tế bào chủ này vào môi trường nuôi cấy;
- (e) thu hồi kháng thể đã tiết ra ở bước (d).

Khi được biểu hiện bằng phương pháp mong muốn, kháng thể này sau đó được kiểm tra về hoạt tính in vitro bằng cách sử dụng thử nghiệm thích hợp. Các kiểu thử nghiệm ELISA thông thường hiện nay được sử dụng để đánh giá chất lượng và số lượng liên kết của kháng thể vào OSM. Thêm vào đó, các thử nghiệm in vitro khác cũng có thể được sử dụng để kiểm tra tác dụng trung hòa trước khi thử nghiệm lâm sàng trên người tiếp theo được thực hiện để đánh giá sự tồn tại của kháng thể trong cơ thể bất chấp các cơ chế thanh thải thông thường.

Liều và thời gian điều trị đề cập tới thời gian tương đối mà các phân tử theo sáng chế có trong hệ tuần hoàn của người, và có thể được điều chỉnh bởi một chuyên gia trong lĩnh vực này tùy theo tình trạng được điều trị và sức khỏe chung của bệnh nhân. Dự kiến là việc sử dụng liều lặp lại (ví dụ, một lần mỗi tuần hoặc một lần mỗi hai tuần) trong một khoảng thời gian kéo dài (ví dụ, 4 đến 6 tháng) có thể là cần thiết để đạt được hiệu quả điều trị tối đa.

Trong một phương án theo sáng chế, được đề xuất là tế bào chủ tái tổ hợp, được biến nạp, chuyển nhiễm, hoặc được tải nạp chứa ít nhất một caset biểu hiện, ví dụ, trong đó caset biểu hiện này chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được mô tả ở đây và chứa thêm polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của protein liên kết kháng

nguyên theo sáng chế được mô tả ở đây hoặc trong đó có hai caset biểu hiện và caset thứ nhất mã hóa chuỗi nhẹ và caset thứ hai mã hóa chuỗi nặng. Ví dụ, trong một phương án, caset biểu hiện thứ nhất chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, đoạn này được liên kết với vùng hằng định theo sáng chế được mô tả ở đây và chứa thêm caset thứ hai chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà được liên kết với vùng hằng định theo sáng chế được mô tả ở đây, ví dụ, caset biểu hiện thứ nhất chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng được chọn từ SEQ. ID. NO: 70, hoặc SEQ. ID. NO: 76 và caset biểu hiện thứ hai chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ. ID. NO: 72.

Được hiểu là các trình tự được mô tả ở đây (SEQ ID NO.25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 83) bao gồm các trình tự gần như là tương đồng, ví dụ, các trình tự mà tương đồng ít nhất 90%, ví dụ, tương đồng ít nhất 91% hoặc ít nhất 92%, hoặc ít nhất 93%, hoặc ít nhất 94% hoặc ít nhất 95%, hoặc ít nhất 96%, hoặc ít nhất 97% hoặc ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với các trình tự được mô tả ở đây.

Với các axit nucleic, thuật ngữ “gần như tương đồng” chỉ ra là hai axit nucleic, hoặc hai trình tự được chỉ định của nó, khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu và được so sánh, là tương đồng, với các gắn xen nucleotit hoặc các khuyết đoạn thích hợp, trong ít nhất là khoảng 80% số nucleotit, ít nhất khoảng 90% đến khoảng 95%, hoặc ít nhất khoảng 98% đến khoảng 99,5% các nucleotit. Ngoài ra, thuật ngữ gần như tương đồng tồn tại khi các đoạn này sẽ lai trong các điều kiện chọn lọc, với bộ thể của chuỗi này.

Với các trình tự nucleotit và axit amin, thuật ngữ “tương đồng” chỉ ra mức độ tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu và được so sánh với các gắn xen hoặc khuyết đoạn

thích hợp. Ngoài ra, gần như tương đồng tồn tại khi các đoạn ADN sẽ lai trong các điều kiện lai chọn lọc, với bộ thể của chuỗi này.

Trong một phương án khác theo sáng chế, được đề xuất là tế bào chủ được biến nạp ổn định chứa vector bao gồm một hoặc nhiều caset biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể chứa vùng hằng định hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, đoạn này liên kết với vùng hằng định như được mô tả ở đây. Ví dụ, tế bào chủ này có thể chứa vector thứ nhất mã hóa chuỗi nhẹ và vector thứ hai mã hóa chuỗi nặng, ví dụ, vector thứ nhất mã hóa chuỗi nặng được chọn từ SEQ. ID. NO: 70, hoặc SEQ. ID. NO: 76 và vector thứ hai mã hóa chuỗi nhẹ ví dụ, chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 72.

Trong một phương án khác theo sáng chế, được đề xuất là tế bào chủ, trong đó tế bào này là tế bào nhân chuẩn, ví dụ, trong đó tế bào này là của động vật có vú. Ví dụ về các dòng tế bào này bao gồm CHO hoặc NS0.

Sáng chế đề xuất là phương pháp sản xuất kháng thể chứa vùng hằng định hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, đoạn này liên kết với vùng hằng định được mô tả ở đây, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ trong môi trường nuôi cấy, ví dụ, môi trường nuôi cấy không có huyết thanh.

Sáng chế đề xuất là phương pháp, trong đó kháng thể này được tinh chế thêm đến ít nhất 95% hoặc nhiều hơn (ví dụ, 98% hoặc nhiều hơn) đối với môi trường nuôi cấy không có huyết thanh chứa kháng thể.

Trong một phương án khác, được đề xuất là dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên và chất mang dược dụng.

Sáng chế đề xuất là kit gồm nhiều thành phần chứa dược phẩm theo sáng chế được mô tả ở đây được mô tả cùng với hướng dẫn sử dụng.

Đường sử dụng của dược chất theo sáng chế có thể là đường thích hợp bất kỳ mà phân phối hoạt chất đến sinh vật chủ. Kháng thể, và các dược phẩm theo sáng chế là đặc biệt hữu ích để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, nghĩa là,

dưới da (subcutaneously: s.c.), nội tủy mạc, trong màng bụng, trong cơ (intramuscularly: i.m.) hoặc trong tĩnh mạch (intravenously: i.v.).

Các hoạt chất theo sáng chế có thể được điều chế thành dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế làm thành phần hoạt chất trong chất mang dược dụng. Trong một phương án, chất phòng bệnh theo sáng chế là huyền phù chứa nước hoặc dung dịch chứa kháng thể ở dạng sẵn sàng để tiêm. Trong một phương án, huyền phù hoặc dung dịch này được đệm ở độ pH sinh lý. Trong một phương án, các dược phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa sẽ bao gồm dung dịch chứa kháng thể theo sáng chế hoặc hỗn hợp của nó được hòa tan trong chất mang dược dụng. Trong một phương án, chất mang này là chất mang chứa nước. Nhiều chất mang chứa nước khác nhau có thể được sử dụng, ví dụ, nước muối 0,9%, glyxin 0,3% và các chất mang tương tự. Các dung dịch này có thể được điều chế vô trùng và thường không chứa vật chất dạng hạt. Các dung dịch này có thể được vô trùng bằng các kỹ thuật tiệt trùng thông thường đã được biết rõ (ví dụ, lọc). Các dược phẩm này có thể chứa các chất phụ gia dược dụng, nếu được yêu cầu, để đạt được các điều kiện gần như sinh lý, như các chất điều chỉnh độ pH và các chất đệm v.v.... Nồng độ của kháng thể theo sáng chế trong dược phẩm này có thể thay đổi nhiều, nghĩa là, từ nhỏ hơn khoảng 0,5%, thường là ở hoặc ít nhất là khoảng 1% đến khoảng 15 hoặc 20% theo khối lượng và sẽ được lựa chọn chủ yếu dựa vào thể tích chất lỏng, độ nhớt, v.v... theo đường sử dụng cụ thể được lựa chọn.

Vì vậy dược phẩm theo sáng chế để tiêm trong cơ có thể được bào chế để chứa khoảng 1ml nước được đệm vô trùng, và khoảng từ 1ng đến 100mg, ví dụ, khoảng từ 50ng đến khoảng 30mg hoặc khoảng 5mg đến khoảng 25mg, protein liên kết kháng nguyên, ví dụ kháng thể theo sáng chế. Tương tự, dược phẩm theo sáng chế để truyền tĩnh mạch có thể được bào chế để chứa khoảng 250ml dung dịch Ringer vô trùng, đến khoảng 1 đến 30 hoặc 5mg đến 25mg kháng thể theo sáng chế trong mỗi ml dung dịch Ringer. Các phương pháp

hiện nay để bào chế chế phẩm có thể sử dụng ngoài đường tiêu hóa đã được biết rõ hoặc là rõ ràng với các chuyên gia trong lĩnh vực này và được mô tả chi tiết hơn trong, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania. Để bào chế các chế phẩm kháng thể để sử dụng trong tĩnh mạch theo sáng chế xem Lasmar U and Parkins D "The formulation of Biopharmaceutical products", Pharma. Sci.Tech.today, page 129-137, Vol.3 (3rd April 2000); Wang, W "Instability, stabilisation and formulation of liquid protein pharmaceuticals", Int. J. Pharm 185 (1999) 129-188; Stability of Protein Pharmaceuticals Part A and B ed Ahern T.J., Manning M.C., New York, NY: Plenum Press (1992); Akers,M.J. "Excipient-Drug interactions in Parenteral Formulations", J.Pharm Sci 91 (2002) 2283-2300; Imamura, K et al "Effects of types of sugar on stabilization of Protein in the dried state", J Pharm Sci 92 (2003) 266-274; Izutsu, Kkojima, S. "Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying", J Pharm. Pharmacol, 54 (2002) 1033-1039; Johnson, R, "Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization", J. Pharm. Sci, 91 (2002) 914-922; and Ha,E Wang W, Wang Y.j. "Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability", J. Pharm Sci, 91, 2252-2264,(2002).

Trong một phương án, hoạt chất theo sáng chế, khi có mặt trong dược phẩm, là ở dạng liều đơn vị. Liều hữu hiệu điều trị thích hợp sẽ được xác định dễ dàng bởi các chuyên gia trong lĩnh vực này. Các liều thích hợp có thể được tính toán cho bệnh nhân theo thể trọng của họ, ví dụ, các liều thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20mg/kg, ví dụ, khoảng 1 đến 20mg/kg, ví dụ khoảng 10 đến 20mg/kg hoặc ví dụ, khoảng 1 đến 15mg/kg, ví dụ, khoảng 10 đến 15mg/kg. Để điều trị hữu hiệu các tình trạng như hen hoặc IPF ở người, các liều thích hợp có thể nằm trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 1000mg, ví dụ, khoảng 0,1 đến khoảng 500mg, ví dụ, khoảng 500mg, ví dụ, khoảng 0,1 đến khoảng 100mg, hoặc khoảng 0,1 đến khoảng 80mg, hoặc khoảng 0,1 đến

khoảng 60mg, hoặc khoảng 0,1 đến khoảng 40mg, hoặc ví dụ, khoảng 1 đến khoảng 100mg, hoặc khoảng 1 đến khoảng 50mg, protein kháng thể theo sáng chế, mà có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong cơ. Liều này có thể, nếu cần, được lặp lại sau các khoảng thời gian thích hợp được lựa chọn một cách thích hợp bởi bác sĩ.

Kháng thể được mô tả ở đây có thể được làm đông khô để bảo quản và được hoàn nguyên lại trong chất mang thích hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã được chỉ ra là hữu hiệu với các globulin miễn dịch thông thường và các kháng thể đông khô và hoàn nguyên lại đã được biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng.

Theo một khía cạnh khác theo sáng chế, được mô tả là phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc bệnh viêm khớp, như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp ở thiếu niên, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vảy nến và bệnh viêm cột sống dính khớp, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân này lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác theo sáng chế, được mô tả là phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ bệnh tiểu đường typ 1, bệnh vảy nến, bệnh viêm ruột (bệnh viêm ruột: IBD) bao gồm bệnh Crohn và bệnh viêm loét đại tràng (UC), bệnh luput ban đỏ hệ thống (bệnh luput ban đỏ hệ thống: SLE, Lupus), bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính: COPD), bệnh viêm phổi, bệnh viêm thực quản ưa eosin, bệnh xơ cứng hệ thống (Bệnh xơ cứng toàn thân: SS) hoặc bệnh xơ hóa phổi tự phát (Bệnh xơ hóa phổi tự phát: IPF), hội chứng Sjögren, bệnh xơ cứng bì, các bệnh viêm mạch (bao gồm bệnh viêm động mạch Takayasu, bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ (thái dương), bệnh viêm đa động mạch nút, bệnh u hạt Wegener, bệnh Kawasaki, bệnh viêm mạch CNS phân lập, bệnh viêm động mạch Churg-Strauss, bệnh viêm đa mạch/bệnh viêm nhiều mạch hiển vi, bệnh

viêm đa mạch quá mẫn (bệnh viêm đa mạch dị ứng), bệnh ban xuất huyết Henoch-Schonlein, và bệnh viêm đa mạch crioglobulin huyết thiết yếu), bệnh khớp cột sống không biệt hóa (undifferentiated spondyloarthropathy: USpA), bệnh viêm cột sống dính khớp (bệnh viêm cột sống dính khớp: AS), bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép (bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép: GVHD), bệnh xơ ống mật nguyên phát (bệnh xơ ống mật nguyên phát: PBC), bệnh viêm xơ chai đường mật nguyên phát (bệnh viêm xơ chai đường mật nguyên phát: PSC), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát: ITP), bệnh đa xơ cứng (bệnh đa xơ cứng: MS), và bệnh hen, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Bất kỳ một hoặc nhiều bệnh được đề cập trên đây có thể là đối tượng của phương pháp điều trị theo sáng chế.

Theo một khía cạnh cụ thể, bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm xương khớp (OA), bệnh vảy nến, bệnh xơ hóa phổi tự phát (IPF), bệnh đa xơ cứng (hội chứng SS Sjögren's, bệnh cứng da, hoặc bệnh đa xơ cứng (MS).

Theo một khía cạnh theo sáng chế, bệnh tự miễn này là bệnh viêm xương khớp.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, bệnh tự miễn này là bệnh vảy nến.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, bệnh hoặc rối loạn tự miễn này là bệnh hoặc rối loạn xơ hóa.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, bệnh tự miễn này là bệnh xơ hóa phổi tự phát (IPF).

Theo một khía cạnh theo sáng chế, bệnh tự miễn này là bệnh xơ cứng toàn thân (SS).

Theo một khía cạnh theo sáng chế, bệnh tự miễn này là hội chứng Sjögren.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, bệnh tự miễn này là bệnh xơ cứng bì.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là phương pháp làm giảm hoặc ngăn ngừa sự thoái hóa sụn ở bệnh nhân là người bị mắc (hoặc dễ bị mắc) bệnh thoái hóa này, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể cho bệnh nhân như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được đề xuất là phương pháp làm giảm sự sản xuất TNF alpha ở bệnh nhân bị mắc bệnh hoặc rối loạn đáp ứng với sự giảm TNF alpha, phương pháp này bao gồm sử dụng cho bệnh nhân này lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là phương pháp điều trị các biểu hiện khớp bên ngoài của bệnh hoặc rối loạn viêm khớp, ví dụ hội chứng Feltys và/hoặc xử lý sự hình thành mảng xơ vữa, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây cho bệnh nhân là người bị mắc các biểu hiện khớp bên ngoài của bệnh hoặc rối loạn viêm khớp.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc bệnh có nguồn gốc tế bào nội mô, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân này lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc bệnh hoặc rối loạn xơ hóa như bệnh xơ hóa phổi tự phát, bệnh xơ cứng toàn thân tiến triển (xơ cứng bì), bệnh xơ gan, bệnh u hạt gan, bệnh sán máng, và bệnh leishmania, phương pháp này bao gồm các bước sử dụng cho bệnh nhân này lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc bệnh hoặc rối loạn hệ thần kinh trung

ương như bệnh đa xơ cứng (MS), bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh mất trí khác và ngoài ra còn liên quan đến việc sử dụng để điều trị đau, cụ thể là đau thần kinh và/hoặc đau do viêm, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân này lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Việc sử dụng kháng thể như được mô tả ở đây để sản xuất thuốc điều trị bệnh và rối loạn như được mô tả ở đây cũng được mô tả.

Ví dụ, theo một khía cạnh của sáng chế, được mô tả là việc sử dụng kháng thể như được mô tả ở đây để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh hoặc rối loạn đáp ứng với việc điều hòa tương tác giữa hOSM và gp130.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là việc sử dụng kháng thể như được mô tả ở đây để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh viêm khớp như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp ở thiếu niên, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vảy nến và bệnh viêm cột sống dính khớp.

Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là việc sử dụng kháng thể như được mô tả ở đây để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn được chọn từ bệnh tiểu đường typ 1, bệnh vảy nến, bệnh viêm ruột (IBD) bao gồm bệnh Crohn và bệnh viêm loét tá tràng (UC), bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE, Lupus), bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh viêm phổi, bệnh viêm thực quản ưa eosin, bệnh xơ cứng toàn thân (SS) hoặc Bệnh xơ hóa phổi tự phát (IPF), hội chứng Sjögren, bệnh xơ cứng bì, các bệnh viêm mạch (bao gồm bệnh viêm động mạch Takayasu, bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ (thái dương), viêm nút động mạch, bệnh u hạt Wegener, bệnh, bệnh viêm động mạch Churg-Strauss, bệnh viêm đa mạch/viêm nhiều mạch hiển vi, bệnh viêm mạch quá mẫn (các bệnh viêm mạch dị ứng), bệnh ban xuất huyết Henoch-Schonlein, và bệnh viêm mạch cryoglobulin nguyên phát), bệnh viêm cột sống dính khớp chưa biệt hóa (USpA), bệnh viêm cột sống dính khớp (AS), bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép (GVHD), bệnh xơ ống mật nguyên phát

(PBC), bệnh viêm xơ chai đường mật nguyên phát (PSC), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh đa xơ cứng (MS), và bệnh hen trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân này lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể như được mô tả ở đây.

Ví dụ, theo một khía cạnh cụ thể, việc sử dụng kháng thể để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh viêm xương khớp (OA), bệnh vảy nến, bệnh xơ hóa phổi tự phát (IPF) hoặc bệnh đa xơ cứng (MS) được mô tả.

Các khía cạnh khác và các ưu điểm khác của sáng chế được mô tả trong bản mô tả chi tiết và các phương án của nó.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế và chất mang được dùng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn viêm ví dụ, bệnh viêm khớp như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp tuổi thiếu niên, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vảy nến và bệnh viêm cột sống dính khớp hoặc được chọn từ bệnh tiểu đường typ 1, bệnh vảy nến, bệnh viêm ruột (IBD) bao gồm bệnh Crohn và bệnh viêm loét tá tràng (UC), bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE, Lupus), bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh viêm phổi, bệnh viêm thực quản ưa eosin, bệnh xơ cứng toàn thân (SS) hoặc bệnh xơ hóa phổi tự phát (IPF), hội chứng Sjögren, bệnh xơ cứng bì, các bệnh viêm mạch (bao gồm bệnh viêm động mạch Takayasu , bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ (thái dương), viêm nút động mạch, bệnh u hạt Wegener, bệnh Kawasaki , bệnh viêm mạch CNS phân lập, bệnh viêm động mạch Churg-Strauss, bệnh viêm nhiều mạch/viêm đa mạch hiển vi, bệnh viêm mạch quá mẫn (bệnh viêm mạch dị ứng), bệnh ban xuất huyết Henoch-Schonlein, and essential cryoglobulinemic vasculitis), undifferentiated spondyloarthropathy (USpA), bệnh viêm cột sống dính khớp (AS), bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép (GVHD), bệnh xơ ống mật nguyên phát (PBC), bệnh viêm xơ chai đường mật nguyên phát (PSC), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh đa xơ cứng (MS), và bệnh hen.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc rối loạn hoặc bệnh viêm, phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể, ví dụ được mô tả là phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc rối loạn hoặc bệnh viêm, phương pháp này bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa kháng thể kết hợp với chất mang được dụng. Trong một phương án khác, được mô tả là phương pháp điều trị cho bệnh nhân là người bị mắc rối loạn hoặc bệnh viêm được chọn từ, ví dụ, bệnh viêm khớp, như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp tuổi thiếu niên, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vảy nến và bệnh viêm cột sống dính khớp hoặc được chọn từ bệnh tiểu đường typ 1, bệnh vảy nến, bệnh viêm ruột (IBD) bao gồm bệnh Crohn và bệnh viêm loét tá tràng (UC), bệnh luput ban đỏ hệ thống (SLE, Lupus), bệnh viêm da cơ địa, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh viêm phổi, bệnh viêm thực quản ưa eosin, bệnh xơ cứng toàn thân (SS) hoặc bệnh xơ hóa phổi tự phát (IPF), hội chứng Sjögren, bệnh xơ cứng bì, các bệnh viêm mạch (bao gồm bệnh viêm động mạch Takayasu, bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ (thái dương), viêm nút động mạch, bệnh u hạt Wegener, bệnh Kawasaki, bệnh viêm mạch CNS phân lập, bệnh viêm động mạch Churg-Strauss, bệnh viêm nhiều mạch/bệnh viêm đa mạch hiển vi, bệnh viêm mạch quá mẫn (bệnh viêm mạch dị ứng), ban xuất huyết Henoch-Schonlein, và bệnh viêm mạch cryoglobulin nguyên phát), bệnh viêm cột sống dính khớp không biệt hóa (USpA), bệnh viêm cột sống dính khớp (AS), bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép (GVHD), bệnh xơ ống mật nguyên phát (PBC), bệnh viêm xơ chai đường mật nguyên phát (PSC), bệnh ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát (ITP), bệnh đa xơ cứng (MS), và bệnh hen.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, được mô tả là phương pháp làm cho kháng thể không phải là người hoặc đoạn kháng thể của nó tương thích với người, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) kết hợp một hoặc nhiều CDR không phải của người lên khung nhận của người để tạo ra kháng thể khảm hoặc kháng thể tương thích với người
- b) liên kết kháng thể khảm hoặc được làm tương thích với người với kháng nguyên của nó
- c) xác định các gốc của kháng thể trực tiếp liên quan đến sự liên kết với kháng nguyên
- d) gây đột biến một hoặc nhiều gốc không được bao gồm trong bước (c) với trình tự dòng sinh dục của người;
- e) thu hồi kháng thể này.

Theo khía cạnh khác, các gốc của kháng thể liên quan đến sự liên kết với kháng nguyên có thể được xác định bằng phương pháp tinh thể học, mô hình hóa tương đồng, neo protein, gây đột biến hoặc lập bản đồ peptit tuyến tính.

Ví dụ, theo một khía cạnh của sáng chế, như được mô tả ở đây, cấu trúc tinh thể học của đồng tinh thể kháng nguyên-kháng thể là đạt được và các gốc liên quan đến sự liên kết được xác định là nằm trong khoảng từ 2 đến 5 Å

Thuật ngữ “không phải của người” bao gồm kháng thể bất kỳ mà có thể được gây đột biến hoặc được thay thế theo một số cách để làm cho nó giống với trình tự dòng sinh dục của người hơn. Theo cách này, làm giảm khả năng gây miễn dịch.

Theo một khía cạnh, ít nhất một CDR được trở lại dòng sinh dục. Theo một khía cạnh khác, ít nhất hai CDR được trở lại dòng sinh dục. Theo một khía cạnh khác, ít nhất 5 gốc được trở lại dòng sinh dục, ví dụ, ít nhất 7 hoặc ít nhất 8 hoặc ít nhất 9 hoặc ít nhất 10 gốc được trở lại dòng sinh dục.

Việc chuyển các kháng thể đơn dòng không phải của người hoặc các đoạn của chúng lên kháng thể nhận của người thường phụ thuộc thêm vào việc đưa vào các thay đổi trong khung để thiết lập lại các tương tác CDR-vùng-kháng nguyên thích hợp, các tương tác này thường được gọi là các đột biến ngược. Trong một phương án theo sáng chế, các đột biến ngược này

được yêu cầu để thiết lập lại các tương tác CDR-vùng-kháng nguyên thích hợp.

Khung nhận của người có thể được đưa lên kháng thể với một hoặc nhiều CDR không phải của người để tạo ra kháng thể khả. Trong một phương án khác, trình tự này có thể được tạo ra bằng quy trình tổng hợp oilgo.

CDR (hoặc các gốc vùng siêu biến) của kháng thể không phải của người được đưa vào các khung nhận của người VL và/hoặc VH. Ví dụ, một chuyên gia có thể đưa vào các gốc tương ứng với các gốc CDR Kabat, các gốc vòng siêu biến Chothia, các gốc Abm, và/hoặc các gốc tương tác.

Trong một phương án, được mô tả là phương pháp để làm cho kháng thể tương thích với người, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu được kháng thể không phải của người liên kết với kháng nguyên đích
- b) thu được cấu trúc tinh thể học của đồng tinh thể kháng thể-kháng nguyên
- c) xác định đến khoảng 2-5Å từ cấu trúc tinh thể các gốc của kháng thể không phải của người liên quan trực tiếp đến sự liên kết với kháng nguyên
- e) gây đột biến một hoặc nhiều gốc không được bao gồm trong bước (c) thành gốc có nguồn gốc từ trình tự của người;
- f) thu hồi kháng thể này.

Trong một phương án khác của các phương pháp được mô tả ở đây, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng thể vẫn liên kết với kháng nguyên của nó. Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng thể vẫn liên kết với kháng nguyên của nó so với kháng thể không phải của người. Ví dụ, kháng thể của bước f) có ái lực liên kết (KD) nằm trong khoảng hoặc cao hơn 10 lần so với kháng thể không phải của người của bước a), ví dụ, kháng thể của bước f) có ái lực liên kết (KD) nằm trong khoảng hoặc cao hơn 3 đến 5 lần so với kháng thể không phải của người của bước a).

Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng thể vẫn liên kết với kháng nguyên của nó trong khoảng 1000nM kháng thể không phải của người khi

được đo bằng Biacore, hoặc trong khoảng 500nM của kháng thể không phải của người khi được đo bằng Biacore, hoặc trong khoảng 100nM của kháng thể không phải của người khi được đo bằng Biacore. Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng thể vẫn liên kết với kháng nguyên của nó trong khoảng 500pM của kháng thể không phải của người khi được đo bằng Biacore, hoặc trong khoảng 300pM của kháng thể không phải của người khi được đo bằng Biacore, hoặc trong khoảng 100pM của kháng thể không phải của người khi được đo bằng Biacore. Ví dụ, kháng thể của bước f) liên kết với kháng nguyên của nó với ái lực (KD) bằng hoặc nhỏ hơn 400pM hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 300pM, hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 200pM hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 140pM.

Trong một phương án khác của các phương pháp được mô tả ở đây, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng thể vẫn giữ cấu trúc chuẩn giống như kháng thể hoặc đoạn kháng thể không phải của người.

Trong một phương án khác được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể không phải của người hoặc đoạn kháng thể của nó là của động vật không phải của người, ví dụ, chuột, chuột cống, thỏ, lạc đà hoặc cá mập.

Trong một phương án khác được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể không phải của người hoặc đoạn kháng thể của nó là của chuột.

Trong một phương án khác được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể không phải của người hoặc đoạn kháng thể của nó là kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đa đặc hiệu hoặc có thể là vùng chức năng biến đổi đơn của globulin miễn dịch, ví dụ, vùng chức năng biến đổi đơn globulin miễn dịch của lạc đà hoặc cá mập hoặc nó có thể là vùng chức năng mà là dẫn xuất của giàn giáo protein không phải kháng thể không phải của người.

Trong một phương án khác được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể không phải của người là kháng thể đơn dòng.

Trong một phương án của các phương pháp được mô tả ở đây, ít nhất 2 CDR không phải của người được đưa vào trình tự nhận của người, hoặc ít nhất 3 CDR hoặc ít nhất 4 CDR hoặc ít nhất 5' CDR hoặc cả 6 CDR đều được đưa vào trình tự nhận của người.

Trong một phương án khác của các phương pháp được mô tả ở đây, các gốc để gây đột biến thành gốc có nguồn gốc từ trình tự của người mà không liên quan trực tiếp đến sự liên kết kháng nguyên và không còn là của người, có thể là các gốc trong CDR hoặc trong các vùng khung hoặc cả hai. Trong một phương án khác, ít nhất 1 CDR được gây đột biến thành trình tự dòng sinh dục của người, hoặc ít nhất 2 CDR được gây đột biến hoặc ít nhất 3 CDR được gây đột biến, hoặc ít nhất 4 CDR được gây đột biến.

Trong một phương án khác, ít nhất 5 gốc được gây đột biến thành trình tự dòng sinh dục của người, hoặc ít nhất 7 gốc, hoặc ít nhất 10 gốc hoặc ít nhất 15 gốc hoặc ít nhất 20 gốc hoặc ít nhất 40 gốc hoặc ít nhất 60 gốc được gây đột biến thành trình tự dòng sinh dục của người.

Trong một phương án khác của các phương pháp được mô tả ở đây, các gốc của kháng thể mà liên quan trực tiếp đến sự liên kết với kháng nguyên được xác định là nằm trong khoảng 2-5Å, hoặc từ khoảng 3-5Å hoặc từ khoảng 3-4Å hoặc ở khoảng 3,5Å.

Trong một phương án khác của các phương pháp được mô tả ở đây, được đề xuất là kháng thể có thể thu được bằng phương pháp này.

Định nghĩa

Thuật ngữ “protein liên kết kháng nguyên” như được sử dụng ở đây chỉ các kháng thể, đoạn kháng thể và các cấu trúc protein khác có thể liên kết với hoặc trung hòa OSM người.

Thuật ngữ Fv, Fc, Fd, Fab, hoặc F(ab)₂ được sử dụng với nghĩa chuẩn của chúng (xem, ví dụ, Harlow et al., Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)).

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng ở đây theo nghĩa rộng nhất và bao gồm một cách cụ thể các kháng thể đơn dòng (bao gồm các kháng thể đơn dòng có chiều dài hoàn chỉnh), kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép)

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” như được sử dụng ở đây chỉ kháng thể thu được từ quần thể kháng thể gần như đồng nhất, nghĩa là các kháng thể đơn lẻ được bao gồm trong quần thể này là tương đồng ngoại trừ các đột biến tự nhiên tiềm tàng mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng là đặc hiệu cao hướng đến vị trí liên kết kháng nguyên duy nhất. Ngoài ra, ngược lại với các chế phẩm kháng thể đa dòng mà bao gồm nhiều kháng thể khác nhau gắn vào các quyết định kháng nguyên khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng gắn vào quyết định kháng nguyên duy nhất trên kháng nguyên này.

“Kháng thể khảm” chỉ typ kháng thể được thao tác di truyền, trong đó tỉ lệ chuỗi nặng và/hoặc nhẹ là giống như hoặc tương tự với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ lớp hoặc lớp con kháng thể cho cụ thể, trong khi đó phần còn lại của (các) mạch này là giống với hoặc tương tự các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ các loài khác hoặc thuộc lớp hoặc lớp con kháng thể khác, cũng như các đoạn của các kháng thể này, miễn là chúng biểu hiện hoạt tính sinh học mong muốn (*patent Mỹ số 4, 816,567 and Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)*).

“Kháng thể được làm tương thích với người” chỉ typ kháng thể được thao tác di truyền có các CDR có nguồn gốc từ globulin miễn dịch nhận không phải của người, các phần thu được từ globulin miễn dịch còn lại của phân tử này thu được từ một (hoặc nhiều) globulin miễn dịch của người. Thêm vào đó, các gốc hỗ trợ khung có thể được biến đổi để bảo tồn ái lực liên kết (xem, ví dụ, Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)). Kháng thể nhận của

người thích hợp có thể là kháng thể được chọn từ cơ sở dữ liệu thông thường, ví dụ, cơ sở dữ liệu KABAT®, cơ sở dữ liệu Los Alamos, và cơ sở dữ liệu Swiss Protein, bởi sự tương đồng với các trình tự nucleotit và axit amin của kháng thể cho. Kháng thể người được đặc trưng bởi sự tương đồng với các vùng khung của kháng thể cho (trên cơ sở axit amin) có thể là thích hợp để cung cấp vùng hằng định chuỗi nặng và/hoặc vùng khung biến đổi chuỗi nặng cho sự gắn xen của các CDR cho. Kháng thể nhận thích hợp có thể cho các vùng hằng định chuỗi nhẹ hoặc vùng khung biến đổi có thể được chọn theo cách tương tự. Nên chú ý rằng các chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể nhận không được yêu cầu phải có nguồn gốc từ cùng một kháng thể nhận. Lĩnh vực kháng thể trước mô tả một số cách tạo ra các kháng thể được làm tương thích với người này – xem, ví dụ, EP-A-0239400 và EP-A-054951.

“Tương đồng” nghĩa là, đối với các polynucleotit và polypeptit, như trường hợp này, phép so sánh được tính toán bằng cách sử dụng thuật toán được cung cấp trong (1) và (2) dưới đây:

(1) Sự tương đồng đối với các polynucleotit được tính toán bằng cách nhân tổng số nucleotit trong trình tự đã cho với số nguyên xác định tỉ lệ phần trăm tương đồng chia cho 100 và sau đó lấy tổng số nucleotit trong trình tự này trừ đi kết quả tính đã tính được này, hoặc:

$$nn \leq xn - (xn \bullet y),$$

trong đó nn là số lượng biến đổi nucleotit, xn là tổng số nucleotit trong trình tự đã cho, y là 0,95 đối với 95%, 0,97 đối với 97% hoặc 1,00 đối với 100%, và $\bullet$ là ký hiệu của phép nhân, và trong đó kết quả không phải số nguyên bất kỳ của xn và y được làm tròn xuống số nguyên gần nhất trước khi lấy xn trừ đi nó. Các biến đổi của trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có thể tạo ra các đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa hoặc đột biến xê dịch khung trong trình tự mã hóa này và do đó làm biến đổi polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit sau các biến đổi này.

(2) Sự tương đồng đối với polypeptit được tính bằng cách nhân tổng số axit amin với số nguyên xác định tỉ lệ phần trăm tương đồng chia cho 100 và sau đó lấy tổng số axit amin này trừ đi kết quả đã thu được này, hoặc:

$$na \leq xa - (xa \bullet y),$$

trong đó na là số lượng biến đổi axit amin, xa là tổng số axit amin trong trình tự này, y là 0,95 đối với 95%, 0,97 đối với 97% hoặc 1,00 đối với 100%, và $\bullet$ là ký hiệu của phép nhân, và trong đó kết quả không phải số nguyên bất kỳ của xa và y được làm tròn xuống số nguyên gần nhất trước khi lấy xa trừ đi nó.

"Được phân lập" nghĩa là được biến đổi "bằng thao tác của con người" từ trạng thái tự nhiên của nó, được làm thay đổi hoặc được lấy ra từ môi trường ban đầu của nó, hoặc cả hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có mặt tự nhiên trong sinh vật sống là không "được phân lập", nhưng cùng polynucleotit hoặc polypeptit này được tách ra khỏi các nguyên liệu cùng tồn tại ở trạng thái tự nhiên của nó là "được phân lập", bao gồm nhưng không giới hạn ở khi polynucleotit hoặc polypeptit này được đưa trở lại vào tế bào, ngay cả khi tế bào này thuộc cùng một loài hoặc cùng một typ với tế bào mà từ đó polynucleotit hoặc polypeptit này được tách ra.

Trong toàn bộ bản mô tả này và điểm các yêu cầu bảo hộ kèm theo, thuật ngữ "bao gồm" bao hàm cả "chứa". Nghĩa là các từ này được dự định thể hiện sự bao gồm có thể các yếu tố hoặc các số nguyên khác mà không được trích dẫn cụ thể, khi ngữ cảnh cho phép.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" như được sử dụng trong bản mô tả liên quan đến kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có nghĩa là protein liên kết kháng nguyên này liên kết với OSM người (hOSM) mà không hoặc liên kết không đáng kể với các protein người khác. Tuy nhiên, thuật ngữ này không loại trừ thực tế là các kháng thể theo sáng chế đó cũng có thể phản ứng chéo với các dạng khác của OSM, ví dụ OSM của linh trưởng.

Thuật ngữ “tương tác trực tiếp” như được sử dụng trong bản mô tả liên quan đến kháng thể theo sáng chế có nghĩa là khi protein liên kết kháng nguyên này được liên kết với OSM người (hOSM), các gốc đặc hiệu trên protein liên kết kháng nguyên này nằm trong khoảng 3,5Å các gốc đặc hiệu trên hOSM.

Thuật ngữ “ức chế” như được sử dụng trong bản mô tả liên quan đến các kháng thể theo sáng chế có nghĩa là hoạt tính sinh học của OSM khi có mặt kháng thể bị giảm so với hoạt tính của OSM khi vắng mặt các kháng thể này. Tác dụng ức chế có thể là do nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều cơ chế: phong bế sự liên kết phối tử, ngăn cản phối tử hoạt hóa thụ thể, điều hòa giảm OSM hoặc tác động liên chức năng của cơ quan phản ứng. Các kháng thể theo sáng chế có thể trung hòa OSM. Mức độ trung hòa có thể được đo bằng một số cách, ví dụ, bằng cách sử dụng các thử nghiệm như được chỉ ra trong các ví dụ dưới đây, ví dụ trong 2.2.1 trong thử nghiệm trung hòa tế bào KB. OSM có thể cảm ứng sự giải phóng Interleukin 6 từ tế bào KB bằng cách truyền tín hiệu qua phức hợp Gp130/OSMR. Tác dụng trung hòa OSM trong thử nghiệm này được đo bằng cách đánh giá khả năng ức chế sản xuất IL6 của các kháng thể đơn dòng kháng OSM.

Nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có khả năng trung hòa thì điều này có nghĩa là ức chế sự tương tác giữa OSM người và thụ thể gp130 của nó. Các kháng thể mà được xem là có hoạt tính trung hòa OSM người sẽ có IC50 nhỏ hơn 10 microgram/ml, hoặc nhỏ hơn 5 microgram/ml, hoặc nhỏ hơn 2 microgram/ml, hoặc nhỏ hơn 1 microgram/ml hoặc nhỏ hơn 0,1 microgram/ml trong thử nghiệm trung hòa tế bào KB như được chỉ ra trong ví dụ 2.2.1

"CDR" được xác định là trình tự axit amin vùng quyết định bổ sung của kháng thể mà là vùng chức năng siêu biến của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Có 3 CDR chuỗi nặng và 3 CDR chuỗi nhẹ (hoặc các vùng CDR) trong phần biến đổi của các globulin miễn dịch. Vì vậy, "các

CDR" như được sử dụng ở đây có thể chỉ cả 3 CDR chuỗi nặng, hoặc cả 3 CDR chuỗi nhẹ (hoặc tất cả các CDR chuỗi nặng và CDR chuỗi nhẹ, nếu thích hợp).

Các CDR cung cấp phần lớn các gốc tiếp xúc cho sự liên kết của kháng thể vào kháng nguyên hoặc epitop. Các CDR cần quan tâm trong sáng chế này thu được từ các trình tự chuỗi nhẹ và nặng biến đổi của kháng thể cho, và bao gồm các trình tự tương tự của các CDR có trong tự nhiên, các trình tự tương tự này cũng có chung hoặc vẫn có cùng tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên và/hoặc khả năng trung hòa như kháng thể cho mà chúng thu được từ đó.

Các trình tự CDR của kháng thể có thể được xác định bằng hệ đánh số Kabat (Kabat et al; (Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987), ngoài ra, chúng có thể được xác định bằng cách sử dụng hệ đánh số Chothia (Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948), phương pháp xác định tiếp xúc (MacCallum R.M., and Martin A.C.R. and Thornton J.M, (1996), Journal of Molecular Biology, 262 (5), 732-745) hoặc phương pháp đã có bất kỳ khác để đánh số các gốc trong kháng thể và các CDR quyết định đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Các quy ước đánh số khác cho trình tự CDR có sẵn với chuyên gia bao gồm phương pháp "AbM" (University of Bath) và "tiếp xúc" (University College London). Vùng chồng lấp tối thiểu sử dụng ít nhất hai phương pháp trong số các phương pháp Kabat, Chothia, AbM và phương pháp tiếp xúc có thể được xác định để cung cấp "đơn vị liên kết tối thiểu". Đơn vị liên kết tối thiểu có thể là phần phụ của CDR.

Bảng 1 dưới đây thể hiện một định nghĩa sử dụng mỗi quy ước đánh số cho mỗi CDR hoặc đơn vị liên kết. Sơ đồ đánh số Kabat được sử dụng trong bảng 1 để đánh số trình tự axit amin vùng chức năng biến đổi. Nên chú ý là một số định nghĩa trong số các định nghĩa CDR có thể thay đổi phụ thuộc vào từng công bố được sử dụng.

	Kabat CDR	Chothia CDR	AbM CDR	CDR tiếp xúc	Đơn vị liên kết tối thiểu
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

Trong bản mô tả này, các gốc axit amin trong trình tự kháng thể được đánh số theo sơ đồ Kabat. Tương tự, các thuật ngữ "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" theo sau hệ thống đánh số kabat như được chỉ ra trong Kabat et al; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987.

Các thuật ngữ “VH” và “VL” được sử dụng ở đây lần lượt chỉ vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng chức năng” chỉ cấu trúc protein gấp nếp mà có cấu trúc bậc ba độc lập với phần còn lại của protein này. Nói chung, các vùng chức năng chịu trách nhiệm về các đặc điểm chức năng riêng biệt của protein và trong nhiều trường hợp có thể được bổ sung vào, loại bỏ hoặc chuyển sang các protein khác mà không làm mất chức năng của phần còn lại của protein này và/hoặc vùng chức năng này. “Vùng chức năng biến đổi đơn của kháng thể” là vùng chức năng polypeptit gấp nếp chứa các trình tự đặc trưng cho các vùng chức năng biến đổi của kháng thể. Do đó nó bao gồm các vùng chức năng biến đổi kháng thể đầy đủ và các vùng chức năng biến đổi được cải biến, ví dụ, trong đó một hoặc nhiều vòng được thay thế bằng các trình tự mà không đặc trưng cho các vùng chức năng biến đổi của kháng thể, hoặc các vùng chức năng biến đổi của kháng thể mà bị cắt hoặc bao gồm các đột biến kéo dài đầu N hoặc C, cũng như các đoạn gấp của

các vùng chức năng biến đổi, các đoạn này vẫn giữ được ít nhất là hoạt tính liên kết và tính đặc hiệu của vùng chức năng có chiều dài đầy đủ.

Mệnh đề “vùng chức năng biến đổi đơn của globulin miễn dịch” chỉ vùng chức năng biến đổi của kháng thể (VH, VHH, VL) mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc epitop độc lập với vùng V hoặc vùng chức năng khác. Vùng chức năng biến đổi đơn của globulin miễn dịch có thể có mặt ở một dạng (ví dụ, đa phân tử cùng loại hoặc khác loại) cùng với nhiều vùng biến đổi hoặc vùng chức năng biến đổi khác nhau khác, trong đó các vùng hoặc vùng chức năng khác này không được yêu cầu cho sự liên kết với kháng nguyên bởi vùng chức năng biến đổi globulin miễn dịch đơn này (nghĩa là, trong đó vùng chức năng biến đổi đơn globulin miễn dịch này liên kết với kháng nguyên độc lập với các vùng chức năng biến đổi cộng thêm). “Kháng thể vùng chức năng” hoặc “dAb” là giống như “vùng chức năng biến đổi đơn globulin miễn dịch”, vùng này có khả năng liên kết với kháng nguyên như thuật ngữ này được sử dụng ở đây. Vùng chức năng biến đổi đơn globulin miễn dịch có thể là vùng chức năng biến đổi của kháng thể người, nhưng cũng bao gồm các vùng chức năng biến đổi kháng thể đơn từ các loài khác như loài gặm nhấm (ví dụ, như được mô tả trong WO 00/29004), cá nhám và VHH dAb lạc đà. VHH lạc đà là các polypeptit vùng chức năng biến đổi đơn globulin miễn dịch mà thu được từ các loài bao gồm lạc đà, llama, alpaca, dromedary, và guanaco, các polypeptit này tạo ra các kháng thể chuỗi nặng vốn không có chuỗi nhẹ. Các vùng chức năng VHH có thể được làm tương thích với người theo các kỹ thuật chuẩn sẵn có trong lĩnh vực này, và các vùng chức năng này vẫn được xem là “kháng thể vùng chức năng” theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây “VH bao gồm các vùng chức năng VHH lạc đà. NARV là typ khác của vùng chức năng biến đổi đơn globulin miễn dịch mà được nhận ra trong cá sụn bao gồm cá nhám. Các vùng chức năng này còn được biết là vùng biến đổi thụ thể kháng nguyên mới (thường được viết tắt là

V(NAR) hoặc NARV). Chi tiết hơn xem trong Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006) và US20050043519A.

Thuật ngữ “vùng chức năng liên kết epitop” chỉ vùng chức năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc epitop độc lập với vùng V hoặc vùng chức năng khác, vùng này có thể là kháng thể vùng chức năng (dAb), ví dụ, vùng chức năng biến đổi đơn globulin miễn dịch của lạc đà hoặc cá mập hoặc nó có thể là vùng chức năng là dẫn xuất của giàn được chọn từ nhóm bao gồm CTLA-4 (Evibody); lipocalin; các phân tử là dẫn xuất của protein A như vùng chức năng Z của protein A (Affibody, SpA), vùng chức năng A (Avimer/Maxibody); protein sốc nhiệt như GroEl và GroES; transferrin (trans-body); ankyrin repeat protein (DARPin); peptid aptamer; vùng chức năng lectin typ C (Tetranectin); γ -crystallin người và ubiquitin người (affilins); các vùng chức năng PDZ; các vùng chức năng typ toxinkunitz bộ cặp của các chất ức chế proteaza người; và fibronectin (adnectin); mà được thao tác protein để đạt được sự liên kết với phối tử hơn là phối tử tự nhiên.

CTLA-4 (kháng nguyên liên hợp tế bào lympho T gây độc tế bào 4) là thụ thể họ CD28 được biểu hiện chủ yếu trên các tế bào CD4⁺ T. Vùng chức năng ngoại bào của nó có vùng chức năng biến đổi – tương tự nếp gấp Ig. Các vòng tương ứng với CDR của kháng thể có thể được thay thế bằng trình tự khác loại để tạo ra các đặc điểm liên kết khác nhau. Các phân tử CTLA-4 được thao tác di truyền để có tính đặc hiệu liên kết khác nhau còn được biết là Evibodies. Chi tiết hơn xem trong Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)

Lipocalin là họ các protein ngoại bào vận chuyển các phân tử kỵ nước nhỏ như steroid, bilin, retinoit và lipit. Chúng có cấu trúc bậc hai phiên β cứng với số lượng vòng ở đầu mở của cấu trúc hình nón mà có thể được thao tác di truyền để liên kết với các kháng nguyên đích khác nhau. Anticalin có kích thước khoảng từ 160 đến 180 axit amin, và thu được từ lipocalin. Chi

tiết hơn xem trong Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 và US20070224633

Affibody là giàn thu được từ protein A của *Staphylococcus aureus* mà có thể được thao tác di truyền để liên kết với kháng nguyên. Vùng chức năng này bao gồm bó 3 dải xoắn ốc chứa xấp xỉ 58 axit amin. Các thư viện được tạo ra bằng cách ngẫu nhiên hóa các gốc bề mặt. Chi tiết hơn, xem trong Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) và EP1641818A1

Avimer là các protein nhiều vùng chức năng thu được từ họ giàn khung vùng chức năng A. Các vùng chức năng tự nhiên chứa xấp xỉ 35 axit amin nhận cấu trúc liên kết disulfit được xác định. Sự đa dạng được tạo ra bằng cách trộn biến đổi tự nhiên được biểu hiện bởi họ vùng chức năng A. Chi tiết hơn xem trong Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) và Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)

Transferrin là glycoprotein vận chuyển huyết thanh đơn phân tử. Các transferrin có thể được thao tác di truyền để liên kết với các kháng nguyên đích khác nhau bằng cách gắn xen các trình tự peptit vào vòng bề mặt cho phép. Ví dụ về các giàn khung transferrin được thao tác di truyền bao gồm Trans-body. Chi tiết hơn xem trong J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999).

Các Ankyrin Repeat Protein được thiết kế (DARPin) là thu được từ Ankyrin là họ protein gây ra sự gắn của protein màng nguyên vẹn vào khung tế bào. Một ankyrin repeat là motif 33 gốc chứa 2 chuỗi xoắn α và chiều quay β . Chúng có thể được thao tác di truyền để liên kết vào nhiều kháng nguyên đích khác nhau bằng cách ngẫu nhiên hóa các gốc trong chuỗi xoắn α thứ nhất và chiều quay β của mỗi lần lặp. Bề mặt chung của mỗi liên kết của chúng có thể gia tăng bằng cách làm tăng số lượng phân tử (phương pháp trưởng thành ái lực). Chi tiết hơn xem trong J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) và J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) and US20040132028A1.

Fibronectin là giàn khung mà có thể được thao tác di truyền để liên kết với kháng nguyên. Adnectin bao gồm bộ khung chứa trình tự axit amin tự nhiên của vùng chức năng thứ 10 của 15 đơn vị lặp lại của fibronectin người typ III (FN3). Ba vòng ở một đầu của β -sandwich có thể được thao tác di truyền để cho phép Adnectin nhận biết đặc hiệu đích điều trị cần quan tâm. Chi tiết hơn xem trong Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), US20080139791, WO2005056764 và US6818418B1.

Peptit aptamer là các phân tử nhận biết tổ hợp chứa protein giàn khung cố định, thường là thioredoxin (TrxA) chứa vòng peptit biến đổi bắt buộc được gắn xen vào vị trí hoạt động. Chi tiết hơn xem trong Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Các vi thể thu được từ các microprotein tự nhiên có chiều dài 25 đến 50 axit amin chứa 3-4 cầu nối xystein – ví dụ về các microprotein bao gồm KalataB1 và conotoxin và knottins. Các microprotein có vòng mà có thể được thao tác di truyền để bao gồm tối đa 25 axit amin mà không ảnh hưởng đến sự gấp nếp chung của microprotein này. Chi tiết hơn về các vùng chức năng knottin được thao tác di truyền, xem WO2008098796.

Các vùng chức năng liên kết epitop khác bao gồm các protein mà được sử dụng làm giàn khung để tạo ra các đặc điểm liên kết kháng nguyên đích khác nhau bao gồm γ -crystallin người và ubiquitin người (affilins), các vùng chức năng typ kunitz của chất ức chế proteaza người, các vùng chức năng PDZ của protein liên kết Ras AF-6, các độc tố của bọ cạp (charybdotoxin), vùng chức năng lectin typ C (tetranectin) được xem xét trong chương 7 – Non-Antibody Scaffolds của Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, edited by Stefan Dubel) and Protein Science 15:14-27 (2006). Các vùng chức năng liên kết epitop theo sáng chế có thể thu được từ bất kỳ trong số các vùng chức năng protein thay thế này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vị trí liên kết kháng nguyên” chỉ vị trí trên protein có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên, vị trí này

có thể là vùng chức năng đơn, ví dụ, vùng chức năng liên kết epitop, hoặc nó có thể là các vùng chức năng VH/VL được tạo cặp như có thể tìm thấy trên kháng thể chuẩn. Trong một số phương án của sáng chế, các vùng chức năng Fv (ScFv) chuỗi đơn có thể tạo ra các vị trí liên kết kháng nguyên.

Các thuật ngữ “mAbdAb” và dAbmAb” được sử dụng ở đây để chỉ các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Hai thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và được dự định có cùng một ý nghĩa như được sử dụng ở đây.

Thuật ngữ “protein liên kết kháng nguyên” như được sử dụng ở đây chỉ các kháng thể, các đoạn kháng thể ví dụ, kháng thể vùng chức năng (dAb), ScFv, FAb, FAb2, và các cấu trúc protein khác. Các phân tử liên kết kháng nguyên có thể chứa ít nhất một vùng chức năng biến đổi Ig, ví dụ, kháng thể, kháng thể vùng chức năng (dAbs), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv, kháng thể kép, mAbdAbs, affibodies, kháng thể liên hợp khác loại hoặc các kháng thể đặc hiệu kép. Trong một phương án, phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể. Trong một phương án khác, phân tử liên kết kháng nguyên là dAb, nghĩa là vùng chức năng đơn globulin miễn dịch như VH, VHH hoặc VL liên kết đặc hiệu với kháng nguyên hoặc epitop độc lập với vùng V hoặc vùng chức năng khác. Các phân tử liên kết kháng nguyên có thể có khả năng liên kết với hai đích, nghĩa là, chúng có thể là các protein gắn 2 đích. Các phân tử liên kết kháng nguyên có thể là tổ hợp của các kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên như ví dụ, một hoặc nhiều kháng thể vùng chức năng và/hoặc một hoặc nhiều ScFvs liên kết với kháng thể đơn dòng. Các phân tử liên kết kháng nguyên cũng có thể chứa vùng chức năng không phải Ig, ví dụ, vùng chức năng là dẫn xuất của giàn khung được chọn từ nhóm bao gồm CTLA-4 (Evibody); lipocalin; các phân tử thu được từ protein A như vùng chức năng Z của protein A (Affibody, SpA), vùng chức năng A (Avimer/Maxibody); các protein sốc nhiệt như GroEl và GroES; transferrin (trans-body); ankyrin repeat protein (DARPin); peptid aptamer; vùng chức năng lectin typ C

(Tetranectin); γ -crystallin người và ubiquitin người (affilins); các vùng chức năng PDZ; các vùng chức năng typ toxinkunitz bộ cặp của chất ức chế proteaza người; và fibronectin (adnectin); vùng này được thao tác di truyền protein để đạt được sự liên kết với OSM. Như được sử dụng ở đây “protein liên kết kháng nguyên” sẽ có khả năng đối kháng và/hoặc trung hòa OSM người. Thêm vào đó, protein liên kết kháng nguyên có thể ức chế và/hoặc phong bế hoạt tính OSM bằng cách liên kết với OSM và ngăn cản phối tử tự nhiên liên kết và/hoặc hoạt hóa thụ thể gp130.

Thuật ngữ “chức năng effector” như được sử dụng ở đây có nghĩa là một hoặc nhiều trong số hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependant cell mediated cytotoxic activity: ADCC), các đáp ứng gây ra bởi hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (Complement-dependant cytotoxic activity: CDC), thực bào qua trung gian Fc và phục hồi kháng thể qua thụ thể FcRn. Đối với các kháng thể IgG, các chức năng effector bao gồm ADCC và ADCP được gây ra bởi tương tác của vùng hằng định chuỗi nặng với họ thụ thể Fc γ có mặt trên bề mặt của các tế bào miễn dịch. Ở người, chúng bao gồm Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) và Fc γ RIII (CD16). Sự tương tác giữa protein liên kết kháng nguyên được liên kết với kháng nguyên và sự tạo thành phức hợp Fc/ Fc γ gây ra một loạt tác dụng bao gồm gây độc tế bào, hoạt hóa tế bào miễn dịch, thực bào và giải phóng các cytokin viêm.

Tương tác giữa vùng hằng định của protein liên kết kháng nguyên và nhiều thụ thể Fc khác nhau (FcR) được cho là gây ra các chức năng effector của protein liên kết kháng nguyên. Các tác dụng sinh học đáng kể có thể là hệ quả của chức năng đáp ứng lại kích thích, cụ thể là, tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), cố định bổ thể (tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể hoặc CDC), và thời gian bán thải/sự thanh thải của protein liên kết kháng nguyên. Thông thường, khả năng gây ra chức năng effector đòi hỏi sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên vào kháng

nguyên và không phải tất cả các protein liên kết kháng nguyên sẽ gây ra mọi chức năng đáp ứng lại kích thích.

Chức năng đáp ứng lại kích thích có thể được đo bằng nhiều cách bao gồm, ví dụ, bằng cách liên kết Fc γ RIII với tế bào diệt tự nhiên hoặc thông qua sự liên kết của Fc γ RI vào tế bào bạch cầu đơn nhân/đại thực bào để đo chức năng đáp ứng lại kích thích ADCC. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được đánh giá về chức năng đáp ứng lại kích thích ADCC trong thử nghiệm tế bào diệt tự nhiên. Ví dụ về các thử nghiệm này có thể được tìm thấy trong Shields et al, 2001 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, p6591-6604; Chappel et al, 1993 *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 268, p25124-25131; Lazar et al, 2006 *PNAS*, 103; 4005-4010.

Ví dụ về các thử nghiệm để xác định chức năng CDC bao gồm các thử nghiệm được mô tả trong 1995 *J Imm Meth* 184:29-38.

Một số isotyp của vùng hằng định của người, cụ thể là các isotyp IgG4 và IgG2, gần như thiếu các chức năng a) hoạt hóa bổ thể bằng con đường cổ điển; và b) gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Nhiều biến đổi khác nhau đối với vùng hằng định chuỗi nặng của các protein liên kết kháng nguyên có thể được thực hiện phụ thuộc vào đặc điểm của đáp ứng lại kích thích được mong muốn. Các vùng hằng định IgG1 chứa các đột biến đặc hiệu đã được mô tả riêng là làm giảm sự liên kết với thụ thể Fc và do đó làm giảm ADCC và CDC (Duncan et al. *Nature* 1988, 332; 563-564; Lund et al. *J. Immunol.* 1991, 147; 2657-2662; Chappel et al. *PNAS* 1991, 88; 9036-9040; Burton and Woof, *Adv. Immunol.* 1992, 51;1-84; Morgan et al., *Immunology* 1995, 86; 319-324; Hezareh et al., *J. Virol.* 2001, 75 (24); 12161-12168).

Trong một phương án theo sáng chế, được đề xuất là protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định sao cho protein liên kết kháng nguyên này có ADCC và/hoặc tác dụng hoạt hóa bổ thể hoặc chức năng đáp ứng lại kích thích giảm. Theo một phương án, vùng hằng định chuỗi nặng có thể bao

gồm vùng hằng định bị bất hoạt tự nhiên của isotyp IgG2 hoặc IgG4 hoặc vùng hằng định IgG1 đột biến. Ví dụ về các biến đổi thích hợp được mô tả trong EP0307434. Một ví dụ bao gồm các đột biến thể của các gốc alanin ở vị trí 235 và 237 (đánh số theo chỉ số EU).

Các vùng hằng định IgG1 của người chứa các đột biến đặc hiệu hoặc sự glycosyl hóa biến đổi trên gốc Asn297 cũng được mô tả là làm tăng sự liên kết với thụ thể Fc. Trong một số trường hợp, các đột biến này cũng được chỉ ra là làm tăng ADCC và CDC (Lazar et al. PNAS 2006, 103; 4005-4010; Shields et al. J Biol Chem 2001, 276; 6591-6604; Nechansky et al. Mol Immunol, 2007, 44; 1815-1817).

Các đột biến này nằm ở một hoặc nhiều vị trí được chọn từ 239, 332 và 330 (IgG1), hoặc các vị trí tương đương trong các isotyp IgG khác. Ví dụ về các đột biến thích hợp là S239D và I332E và A330L. Trong một tài liệu, protein liên kết kháng nguyên được gây đột biến ở vị trí 239 và 332, ví dụ S239D và I332E hoặc trong một phương án khác, nó được gây đột biến ở 3 hoặc nhiều vị trí được chọn từ 239 và 332 và 330, ví dụ S239D và I332E và A330L. (đánh số theo chỉ số EU).

Được bộc lộ là protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng có profin glycosyl hóa biến đổi sao cho protein liên kết kháng nguyên này có chức năng đáp ứng lại kích thích được tăng cường. Ví dụ, trong đó protein liên kết kháng nguyên có ADCC tăng cường hoặc CDC tăng cường hoặc trong đó nó có cả chức năng đáp ứng lại kích thích ADCC và CDC được tăng cường. Ví dụ về các hệ phương pháp thích hợp để tổng hợp ra các protein liên kết kháng nguyên có profin glycosyl hóa biến đổi được mô tả trong WO2003011878, WO2006014679 và EP1229125, tất cả các tài liệu này có thể được áp dụng cho protein liên kết kháng nguyên được bộc lộ.

Sáng chế cũng bộc lộ phương pháp tổng hợp protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập như được mô tả ở đây, trong đó gen FUT8 mã hóa alpha-1,6-fucosyltransferaza bị bất hoạt trong tế bào chủ tái tổ hợp này; và
- b) thu hồi protein liên kết kháng nguyên.

Các phương pháp để tổng hợp protein liên kết kháng nguyên này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng hệ thống công nghệ POTELLIGENT™ có sẵn từ BioWa, Inc. (Princeton, NJ), trong đó các tế bào CHOK1SV thiếu bản sao chức năng của gen FUT8 tổng hợp ra các kháng thể đơn dòng có hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) tăng cường, hoạt tính này được gia tăng so với kháng thể đơn dòng giống như vậy được tạo ra trong tế bào có gen FUT8 chức năng. Các bộ phận của hệ thống công nghệ POTELLIGENT™ được mô tả trong US7214775, US6946292, WO0061739 và WO0231240. Người có kỹ năng thông thường trong lĩnh vực này cũng sẽ nhận ra được các hệ thống thích hợp khác.

Theo sáng chế, được đề xuất là protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng khảm, ví dụ protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng khảm có ít nhất một vùng chức năng CH2 từ IgG3, sao cho protein liên kết kháng nguyên có chức năng đáp ứng lại kích thích được tăng cường, ví dụ, trong đó nó có ADCC tăng cường hoặc CDC tăng cường, hoặc chức năng ADCC và CDC tăng cường. Trong một phương án, protein liên kết kháng nguyên có thể chứa một vùng chức năng CH2 từ IgG3 hoặc cả hai vùng chức năng CH2 có thể là từ IgG3.

Cũng được đề xuất là phương pháp tổng hợp protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập như được mô tả ở đây, trong đó vector biểu hiện này chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng chức năng Fc có các gốc axit amin của cả vùng chức năng Fc IgG1 và IgG3; và

b) thu hồi protein liên kết kháng nguyên.

Các phương pháp để tổng hợp protein liên kết kháng nguyên này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng hệ thống công nghệ COMPLEGENT™ có sẵn từ BioWa, Inc. (Princeton, NJ) và Kyowa Hakko Kogyo (now, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) Co., Ltd., trong đó tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện trong đó trình tự axit nucleic mã hóa vùng chức năng Fc khảm có các gốc axit amin của cả vùng chức năng Fc IgG1 và IgG3 được biểu hiện để tạo ra protein liên kết kháng nguyên có hoạt tính CDC tăng cường, hoạt tính này được gia tăng so với protein liên kết kháng nguyên giống như vậy nhưng thiếu vùng chức năng Fc khảm này. Các bộ phận của hệ thống công nghệ COMPLEGENT™ được mô tả trong WO2007011041 và US20070148165. Trong một phương án khác, hoạt tính CDC có thể được gia tăng bằng cách đưa các đột biến đặc hiệu trình tự vào vùng Fc của chuỗi IgG. Người có kỹ năng thông thường trong lĩnh vực này cũng sẽ nhận biết được các hệ thống thích hợp khác.

Rõ ràng với các chuyên gia trong lĩnh vực này là các biến đổi này không chỉ được sử dụng một mình mà còn có thể được sử dụng kết hợp với nhau để làm tăng thêm chức năng đáp ứng lại kích thích.

Trong một phương án theo sáng chế, được đề xuất là protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng, vùng này chứa vùng hằng định chuỗi nặng khảm và được gây đột biến, ví dụ, trong đó protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất một vùng chức năng CH2 từ IgG3 và một vùng chức năng CH2 từ IgG1, trong đó vùng chức năng IgG1 CH2 có một hoặc nhiều đột biến ở các vị trí được chọn từ 239 và 332 và 330 (ví dụ, các đột biến có thể được chọn từ S239D và I332E và A330L), sao cho protein liên kết kháng nguyên này có chức năng đáp ứng lại kích thích tăng, ví dụ trong đó nó có một hoặc nhiều chức năng sau đây, ADCC tăng cường hoặc CDC tăng cường, ví dụ, trong đó nó có ADCC tăng cường và CDC tăng cường. Trong một phương án, vùng chức năng IgG1 CH2 có các đột biến S239D và I332E.

Trong một phương án khác theo sáng chế, được đề xuất là protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng khảm và vùng này có profin glycosyl hóa biến đổi. Trong phương án này, vùng hằng định chuỗi nặng này chứa ít nhất một vùng chức năng CH2 từ IgG3 và một vùng chức năng CH2 từ IgG1 và có profin glycosyl hóa biến đổi sao cho tỉ lệ fucose so với manose là 0,8:3 hoặc nhỏ hơn, ví dụ trong đó protein liên kết kháng nguyên được loại fucose, nhờ đó protein liên kết kháng nguyên này có chức năng đáp ứng lại kích thích tăng so với protein liên kết kháng nguyên tương đương có vùng hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch thiếu các đột biến này và profin glycosyl hóa biến đổi, ví dụ trong đó nó có một hoặc nhiều chức năng sau đây, ADCC tăng cường hoặc CDC tăng cường, ví dụ trong đó nó có ADCC tăng cường và CDC tăng cường.

Trong một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có ít nhất một vùng chức năng IgG3 CH2 và ít nhất một vùng chức năng hằng định chuỗi nặng từ IgG1, trong đó cả hai vùng chức năng IgG CH2 đều được gây đột biến phù hợp các giới hạn được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh của sáng chế, được đề xuất là phương pháp tổng hợp protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được mô tả ở đây bao gồm các bước:

- a) nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector biểu hiện chứa axit nucleic được phân lập như được mô tả ở đây, vector biểu hiện này chứa thêm trình tự axit nucleic Fc mã hóa vùng chức năng Fc khảm có các gốc axit amin của cả vùng chức năng Fc IgG1 và IgG3, và trong đó gen FUT8 mã hóa alpha-1,6-fucosyltransferaza được làm bất hoạt trong tế bào chủ tái tổ hợp này; và
- b) thu hồi protein liên kết kháng nguyên.

Các phương pháp tổng hợp protein liên kết kháng nguyên này có thể được thực hiện, ví dụ bằng cách sử dụng hệ thống công nghệ ACCRETAMAB™ có sẵn ở BioWa, Inc. (Princeton, NJ), hệ thống này kết hợp hệ thống công nghệ POTELLIGENT™ và COMPLEGENT™ để tạo ra

protein liên kết kháng nguyên có cả hoạt tính ADCC và CDC được tăng cường, hoạt tính này được làm tăng so với kháng thể đơn dòng giống như vậy nhưng thiếu vùng chức năng Fc khảm và có fucoza trên oligosacarit

Theo sáng chế, được đề xuất là protein liên kết kháng nguyên chứa vùng hằng định chuỗi nặng khảm và được gây đột biến, trong đó protein liên kết kháng nguyên này có profin glycosyl hóa biến đổi, sao cho protein liên kết kháng nguyên này có chức năng đáp ứng lại kích thích tăng cường, ví dụ, trong đó nó có một hoặc nhiều chức năng sau đây, ADCC tăng cường hoặc CDC tăng cường. Trong một phương án, các đột biến này được chọn từ các vị trí 239 và 332 và 330, ví dụ các đột biến được chọn từ S239D và I332E và A330L. Trong một phương án khác, vùng hằng định chuỗi nặng chứa ít nhất một vùng chức năng CH2 từ IgG3 và một vùng chức năng Ch2 từ IgG1. Trong một phương án, vùng hằng định chuỗi nặng này có profin glycosyl hóa biến đổi sao cho tỉ lệ fucoza so với manosa là 0,8:3 hoặc nhỏ hơn ví dụ, protein liên kết kháng nguyên này được loại fucoza, nhờ đó protein liên kết kháng nguyên này có chức năng đáp ứng lại kích thích tăng so với protein liên kết kháng nguyên không khảm tương đương hoặc có vùng hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch thiếu các đột biến này và profin glycosyl hóa biến đổi.

Các phương pháp biến đổi protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm làm tăng thời gian bán thải in vivo của các protein này bằng cách biến đổi vùng chức năng hằng định globulin miễn dịch hoặc vùng chức năng liên kết FcRn (Fc receptor neonate: thụ thể Fc mới sinh).

Ở động vật có vú trưởng thành, FcRn, còn được biết là thụ thể Fc mới sinh, đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì các mức nồng độ kháng thể trong huyết thanh bằng cách hoạt động như thụ thể bảo vệ liên kết và phục hồi các kháng thể thuộc isotyp IgG khỏi bị thoái biến. Các phân tử IgG được nuốt bởi các tế bào nội mô, và nếu chúng liên kết với FcRn, được tái sinh vào hệ tuần hoàn. Ngược lại, các phân tử IgG mà không liên kết với FcRn đi vào

các tế bào này và được hướng đến con đường lysosom, nơi mà chúng bị thoái biến.

Thụ thể FcRn mới sinh được cho là có liên quan đến cả sự thanh thải kháng thể và sự xuyên bào qua các mô (xem Junghans R.P (1997) *Immunol.Res* 16. 29-57 and Ghetie et al (2000) *Annu.Rev.Immunol.* 18, 739-766). Các gốc IgG1 người quyết định tương tác trực tiếp với FcRn người bao gồm Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 và His435. Sự thay đổi ở vị trí bất kỳ trong các vị trí được mô tả trong vùng này có thể làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh và/hoặc làm biến đổi các tính chất của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể có các biến đổi axit amin làm tăng ái lực của vùng hằng định hoặc đoạn của nó đối với FcRn. Việc làm tăng thời gian bán thải của IgG điều trị và chẩn đoán và các phân tử có hoạt tính sinh học khác có nhiều lợi ích bao gồm làm giảm lượng và/hoặc tần số sử dụng liều chứa các phân tử này. Trong một phương án, được đề xuất là protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế hoặc protein dung hợp chứa tất cả hoặc một phần (phần liên kết FcRn) của vùng chức năng hằng định IgG có một hoặc nhiều biến đổi axit amin này và protein không phải IgG hoặc phân tử không phải protein liên hợp với vùng chức năng hằng định IgG biến đổi này, trong đó sự có mặt của vùng chức năng hằng định IgG biến đổi làm tăng thời gian bán thải in vivo của protein liên kết kháng nguyên.

Công bố PCT WO 00/42072 mô tả polypeptit chứa vùng Fc biến đổi có ái lực liên kết FcRn biến đổi, polypeptit này chứa biến đổi axit amin ở bất kỳ một hoặc nhiều vị trí axit amin 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439, và 447 của vùng Fc, trong đó việc đánh số các gốc trong vùng Fc là theo chỉ số EU (Kabat et al).

Công bố PCT WO 02/060919 A2 mô tả IgG biến đổi chứa vùng hằng định IgG chứa một hoặc nhiều biến đổi axit amin so với vùng chức năng hằng định IgG kiểu hoang, trong đó IgG biến đổi này có thời gian bán thải tăng so với thời gian bán thải của IgG mà có vùng chức năng hằng định IgG kiểu hoang, và trong đó một hoặc nhiều biến đổi axit amin là ở một hoặc nhiều vị trí 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389, và 428-435.

Shields et al. (2001, J Biol Chem ; 276:6591-604) sử dụng phương pháp gây đột biến sàng lọc alanin để biến đổi các gốc trong vùng Fc của kháng thể IgG1 của người và sau đó đánh giá sự liên kết vào FcRn người. Các vị trí mà triệt tiêu hiệu quả sự liên kết với FcRn khi được chuyển thành alanin bao gồm I253, S254, H435, và Y436. Các vị trí khác thể hiện sự giảm liên kết ít rõ rệt hơn như sau: E233-G236, R255, K288, L309, S415, và H433. Một số vị trí axit amin thể hiện sự cải thiện về liên kết với FcRn khi được chuyển thành alanin; đáng chú ý là P238, T256, E272, V305, T307, Q311, D312, K317, D376, E380, E382, S424, và N434. Nhiều vị trí axit amin khác thể hiện sự cải thiện ít (D265, N286, V303, K360, Q362, và A378) hoặc không thay đổi (S239, K246, K248, D249, M252, E258, T260, S267, H268, S269, D270, K274, N276, Y278, D280, V282, E283, H285, T289, K290, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, R301, N315, E318, K320, K322, S324, K326, A327, P329, P331, E333, K334, T335, S337, K338, K340, Q342, R344, E345, Q345, Q347, R356, M358, T359, K360, N361, Y373, S375, S383, N384, Q386, E388, N389, N390, K392, L398, S400, D401, K414, R416, Q418, Q419, N421, V422, E430, T437, K439, S440, S442, S444, và K447) về liên kết FcRn.

Tác dụng rõ rệt nhất được phát hiện ra cho các biến thể hỗn hợp có sự liên kết với FcRn cải thiện. Ở độ pH=6,0, biến thể E380A/N434A thể hiện sự liên kết với FcRn tốt hơn 8 lần so với IgG1 tự nhiên, so với 2 lần đối với E380A và 3,5 lần đối với N434A. Việc bổ sung T307A vào gây ra sự cải thiện khả năng liên kết 12 lần so với IgG1 tự nhiên. Trong một phương án,

protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế chứa các đột biến E380A/N434A và có khả năng liên kết với FcRn tăng.

Dall'Acqua et al. (2002, *J Immunol.*;169:5171-80) mô tả kỹ thuật gây đột biến ngẫu nhiên và sàng lọc các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn đoạn Fc vùng khớp IgG1 người trên FcRn chuột. Chúng mô tả kỹ thuật gây đột biến ngẫu nhiên các vị trí 251, 252, 254-256, 308, 309, 311, 312, 314, 385-387, 389, 428, 433, 434, và 436. Các cải thiện chính về độ ổn định phức hợp IgG1- FcRn người xảy ra ở các gốc thay thế nằm trong dải vắt qua bề mặt chung Fc-FcRn (M252, S254, T256, H433, N434, và Y436) và ở mức độ thấp hơn là ở các gốc thay thế ở ngoại biên như V308, L309, Q311, G385, Q386, P387, và N389. Biến thể có ái lực cao nhất với FcRn người được thu gom bằng cách kết hợp đột biến M252Y/S254T/T256E với H433K/N434F/Y436H và thể hiện sự tăng ái lực 57 lần so với IgG1 kiểu hoang. Hoạt động in vivo của IgG1 người đột biến này thể hiện sự tăng gần 4 lần thời gian bán thải trong huyết thanh ở khỉ cynomolgus so với IgG1 kiểu hoang.

Do đó, sáng chế đề xuất biến thể của protein liên kết kháng nguyên có khả năng liên kết với FcRn được tối ưu hóa. Trong một phương án được ưu tiên, biến thể của protein liên kết kháng nguyên này chứa ít nhất một biến đổi axit amin trong vùng Fc của protein liên kết kháng nguyên này, trong đó biến đổi này được chọn từ nhóm bao gồm 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 và 447 của vùng Fc so với polypeptit mẹ này, trong đó cách đánh số axit amin trong vùng Fc là theo chỉ số EU trong Kabat.,

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, các biến đổi này là M252Y/S254T/T256E.

Thêm vào đó, nhiều công bố khác nhau mô tả các phương pháp để thu được các phân tử có tác dụng sinh lý mà có thời gian bán thải được cải biến bằng cách đưa polypeptit liên kết FcRn vào các phân tử này (WO 97/43316; Patent Mỹ 5,869,046; patent Mỹ 5,747,035; WO 96/32478; WO 91/14438) hoặc bằng cách dung hợp các phân tử này với các kháng thể có ái lực liên kết FcRn được bảo tồn nhưng ái lực với các thụ thể Fc khác bị giảm mạnh (WO 99/43713) hoặc dung hợp với các vùng chức năng liên kết FcRn của các kháng thể (WO 00/09560; Patent Mỹ 4,703,039).

Thêm vào đó, các phương pháp tổng hợp protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán thải sinh học giảm cũng được đề xuất. Biến thể IgG, trong đó His435 được gây đột biến thành alanin gây ra sự mất khả năng liên kết FcRn chọn lọc và thời gian bán thải trong huyết thanh giảm đáng kể (Firan et al. 2001, International immunology 13:993). U.S. Pat. No. 6,165,745 mô tả phương pháp tổng hợp protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán thải sinh học giảm bằng cách đưa đột biến vào đoạn ADN mã hóa protein liên kết kháng nguyên. Đột biến này bao gồm thay thế axit amin ở vị trí 253, 310, 311, 433, hoặc 434 của vùng chức năng khớp nối của Fc.

Thuật ngữ “kháng thể không phải của người hoặc đoạn kháng thể của chúng” như được sử dụng ở đây để chỉ kháng thể hoặc các đoạn của nó mà thu được từ các loài bất kỳ không phải người, trong đó kháng thể người bao gồm các kháng thể khảm.

Thuật ngữ “kháng thể cho” chỉ kháng thể (đơn dòng và/hoặc tái tổ hợp) mà đóng góp các trình tự axit amin của các vùng chức năng biến đổi của nó, các CDR, hoặc các đoạn chức năng hoặc các thành phần tương tự của nó cho đối tác globulin miễn dịch thứ nhất, nhờ đó tạo ra vùng mã hóa globulin miễn dịch biến đổi và kháng thể biến đổi được biểu hiện ra có tính đặc hiệu kháng nguyên và hoạt tính trung hòa đặc trưng cho kháng thể cho này.

Thuật ngữ “kháng thể nhận” chỉ kháng thể (đơn dòng và/hoặc tái tổ hợp) khác loại với kháng thể cho, mà đóng góp toàn bộ (hoặc phần bất kỳ, nhưng tốt hơn nếu là toàn bộ) các trình tự axit amin mã hóa vùng khung chuỗi nặng và/hoặc nhẹ của nó và/hoặc các vùng hằng định chuỗi nhẹ và/hoặc nặng cho đối tác globulin miễn dịch thứ nhất. Kháng thể người này là kháng thể nhận.

Thuật ngữ “trình tự nhận của người” như được sử dụng ở đây chỉ khung của kháng thể hoặc đoạn kháng thể của nó chứa trình tự axit amin của khung VH hoặc VL thu được từ kháng thể người hoặc đoạn kháng thể của nó hoặc khung trình tự bảo thủ của người mà các CDR của các loài không phải người có thể được kết hợp vào trong đó.

Thuật ngữ “kết hợp” các vùng siêu biến hoặc CDR như được sử dụng ở đây bao gồm ý nghĩa bất kỳ mà nhờ đó các CDR không phải của người được đặt ở vị trí cùng với khung nhận của người. Rõ ràng là việc này có thể đạt được bằng nhiều cách khác nhau, ví dụ, các axit nucleic mã hóa trình tự axit amin mong muốn có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến axit nucleic mã hóa trình tự vùng chức năng biến đổi không phải của người, nhờ đó các gốc khung của nó được chuyển thành các gốc khung nhận của người, hoặc bằng cách gây đột biến axit nucleic mã hóa trình tự vùng chức năng biến đổi của người nhờ đó các CDR này được chuyển thành các gốc không phải của người, hoặc bằng cách tổng hợp các axit nucleic mã hóa trình tự mong muốn. Trong một phương án, trình tự cuối cùng được tạo ra trong silico.

Sau đây sáng chế được mô tả bằng cách lấy ví dụ. Các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo có thể bao gồm sự khái quát một hoặc nhiều ví dụ sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: tạo ra kháng thể đơn dòng và chọn lọc

1.1 Kỹ thuật gây miễn dịch

mAb kháng OSM người S168110G08(1)1A09 (“10G8”) được xác định từ thể lai thu được từ chuột được chủng ngừa bằng OSM người được glycosyl hóa tái tổ hợp (K598). Chuột SJL cái (n=2, Harlan, UK, HOST SP06-06031) được chủng ngừa thông thường bằng cách sử dụng tổng lượng 10µg protein trong màng bụng với tá dược tương tự AS02. Các lần gây miễn dịch tăng cường là bằng 5µg protein. Máu xét nghiệm được lấy sau mỗi lần gây miễn dịch tăng cường và chuột có đáp ứng tốt nhất (168#4) được chọn để dung hợp lai (R16092/177-198). Lá lách được cắt bỏ, phá vỡ và sự dung hợp tế bào soma được cảm ứng bằng PEG1500 được thực hiện với tế bào tủy chuột X63 AG8 653.GFP.Bcl-2.11 (BioCat 112754; R17209/58). Thể dung hợp này được rải vào đĩa 10x96 lỗ và 5 Nunc Omnitray trong môi trường bán rắn chứa methylxenluloza. Các khuẩn lạc được lấy ra khỏi môi trường bán rắn vào các đĩa 5 x 96 lỗ.

1.2 Kỹ thuật sàng lọc

1.2.1 Sàng lọc sơ cấp

Sàng lọc sơ cấp các kháng thể back up kháng OSM dựa vào việc chọn lọc nguyên liệu lai có khả năng liên kết với OSM người và, để lựa chọn các phân tử kháng vị trí II, ức chế cả OSM người và khi cynomolgus gắn vào thụ thể gp130. Các dịch nổi chứa nguyên liệu lai dương tính từ bước sàng lọc này được phân tích bằng động học phân ly BIACore để lựa chọn thể lai liên kết cao nhất.

Trong lượng dư của 3000 dòng được thu hồi từ bước dung hợp, 86 trong số này thể hiện sự liên kết đáng kể với OSM người bằng ELISA liên kết. Phân tích về hoạt tính kháng vị trí II được thực hiện trên thể lai dương tính bằng gp130 ELISA với Osm người và khi cynomolgus. Các dòng lai mà ức chế cả OSM người và OSM khi cynomolgus liên kết với gp13 người được

đưa vào phân tích động học phân ly BIACore. Bốn thể lai liên kết với OSM người mạnh nhất bằng phân tích off-rate, 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7, được monocloned và sàng lọc lại. Không có khác biệt nào về hoạt tính liên kết BIACore và ELISA hoặc tác dụng ức chế gp130 giữa các dòng đơn từ mỗi thể lai. Các dòng đơn con: 10G8.A9, 9G2.C1, 2B7.A6 và 3E3.A1 được bảo quản lạnh và được sử dụng để khuếch đại không huyết thanh và tinh chế. Các dòng này được đưa vào bước sàng lọc thứ cấp.

1.2.2 Sàng lọc thứ cấp

Sàng lọc thứ cấp để phân loại 4 dòng con 10G8/A9, 9G2/C1, 2B7/A6 và 3E3/A1, bao gồm phân tích động học BIACore trên OSM người/khỉ cynomolgus; ELISA Gp130 người với OSM người/khỉ cynomolgus; thử nghiệm trung hòa tế bào KB với OSM người/khỉ cynomolgus. Ngoài ra, khả năng trung hòa OSM người nội sinh, thu được từ bạch cầu trung tính, việc giữ được khả năng trung hòa trong huyết thanh AB người 25% và khả năng phản ứng lại LIF người được đánh giá.

Phân tích BIACore:

Phân tích BIACore chứng minh là 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7 có ái lực với OSM người cao hơn so với kháng thể chuột kháng OSM không cạnh tranh khác (15E10) (**bảng 1**). 10G8 thể hiện ái lực cao nhất đối với cả OSM người (~550pM) và OSM của khỉ cynomolgus (~310pM). So với 15E10, 10G8 có ái lực tăng 8 lần/0,9 log với OSM người và ái lực tăng 11 lần/1 log đối với OSM khỉ cynomolgus. Cả 10G8 và 9G2 đều thể hiện ái lực với OSM khỉ cynomolgus tăng so với OSM người.

Bảng 1: Động học BIACore – Bốn kháng thể back-up lead kháng OSM 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7 được so sánh với 15E10.

mAb	OSM	ka (hằng số tốc độ liên kết)	kd (hằng số tốc độ phân ly)	KD nM
10G8	Người	1,12E+05	6,14E-05	0,55
	Cyno	9,69E+04	2,99E-05	0,308
9G2	Người	7,52E+04	1,21E-04	1,60
	Cyno	6,14E+04	4,76E-05	0,75
3E3	Người	1,95E+05	2,53E-04	1,30
	Cyno	1,71E+05	5,60E-04	3,28
2B7	Người	1,21E+05	2,54E-04	2,09
	Cyno	1,00E+05	9,33E-04	9,31
15E10	Người	1,94E+05	8,69E-04	4,48
	Cyno	1,77E+05	5,97E-04	3,37

ELISA gp130 người:

ELISA gp130 người sử dụng các mức nồng độ OSM tương đối cao (25ng/ml), làm giảm khả năng tách các kháng thể ái lực cao ra khỏi kháng thể có ái lực thấp vì phối tử này ở lượng dư. Sau 4 lần lặp lại thử nghiệm này, 10G8 được chỉ ra là kháng thể hiệu quả nhất trong việc ức chế cả OSM người và OSM khỉ cynomolgus liên kết với thụ thể gp130 trong thử nghiệm này (**Fig. 1; Bảng 2**).

Bảng 2: ELISA gp130 người – Tóm tắt 4 lần lặp lại ELISA người gp130 để xếp loại hoạt tính kháng OSM người và khỉ cynomolgus của 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7. Kháng thể chuột không cạnh tranh 15E10 và kháng thể công cụ đối chứng âm được bổ sung vào với các mục đích so sánh.

Xếp loại OSM người	Kháng thể	IC50 trung bình của OSM người $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	IC50 trung bình của khỉ cynomolgus $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (xếp loại OSM của khỉ Cyno)
1	10G8	0,06 $\pm$ 0,01 (400pM)	0,01 $\pm$ 0,00 (1) (40pM)
2	2B7	0,08 $\pm$ 0,02 (533pM)	0,14 $\pm$ 0,04 (6) (993pM)
3	9G2	0,16 $\pm$ 0,04 (1,1nM)	0,03 $\pm$ 0,04 (4) (200pM)
4	15E10	0,19 $\pm$ 0,07 (1,3nM)	0,03 $\pm$ 0,05 (3) (200pM)
5	3E3	0,19 $\pm$ 0,04 (1,3nM)	0,06 $\pm$ 0,07 (5) (400pM)

Thử nghiệm gp130 người được lặp lại khi có mặt huyết thanh AB người 25%. Hai lần lặp lại thử nghiệm này chỉ ra rằng cả 4 kháng thể dẫn đầu 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7, cùng với 15E10, vẫn giữ được khả năng ức chế OSM người và khỉ cynomolgus liên kết với gp130 (số liệu không được thể hiện).

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB:

OSM cảm ứng sự giải phóng IL-6 từ tế bào KB (tế bào biểu mô người biểu hiện mRNA cho gp130 và các thụ thể OSM). Nói ngắn gọn, các tế bào KB được kích thích bằng OSM 1ng/ml +/- nồng độ kháng thể khác nhau trong 16-18 giờ ở 37°C và sự giải phóng IL6 được theo dõi bằng ELISA. Thử nghiệm trung hòa tế bào KB sử dụng lượng OSM giảm so với thử nghiệm gp130 (1ng/ml so với 25ng/ml). Nhờ đó, nó trở thành thử nghiệm có khả năng phân biệt tốt hơn để tách các chất trung hòa ái lực cao ra khỏi các chất trung hòa ái lực thấp. So với kháng thể 15E10, 10G8 có hiệu lực kháng

lại OSM người cao hơn 15 lần/ 1,2 log trong thử nghiệm trung hòa tế bào KB. Từ 3 lần lặp lại thử nghiệm này, 10G8 được xếp loại thứ nhất trong tất cả các lần lặp lại, cho trị số IC50 trung bình là 8ng/ml đối với OSM người và 6ng/ml đối với khỉ cynomolgus (**Fig. 2; bảng 3**). 9G2 được xếp hạng thứ hai trong thử nghiệm này với IC50 là 18ng/ml và 15ng/ml lần lượt đối với OSM người và OSM khỉ cynomolgus.

Bảng 3: thử nghiệm trung hòa tế bào KB – tóm tắt về 3 lần lặp lại thử nghiệm trung hòa tế bào KB để xếp hạng hoạt tính kháng OSM người và khỉ cynomolgus của 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7. Kháng thể 15E10 được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm.

Xếp hạng OSM người	Kháng thể	IC50 trung bình của OSM người $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	IC50 trung bình của khỉ Cynomolgus $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (Xếp hạng OSM khỉ cyno)
1	10G8	0,008 $\pm$ 0,003 (53pM)	0,006 $\pm$ 0,002 (1) (40pM)
2	9G2	0,018 $\pm$ 0,008 (120pM)	0,015 $\pm$ 0,006 (2) (100pM)
3	2B7	0,049 $\pm$ 0,003 (327pM)	0,344 $\pm$ 0,186 (6) (2,3nM)
4	3E3	0,054 $\pm$ 0,034 (360pM)	0,150 $\pm$ 0,013 (5) (1nM)
6	15E10	0,279 $\pm$ 0,161 (1,9nM)	0,035 $\pm$ 0,013 (4) (233pM)

Khi có mặt huyết thanh AB người 25%, 10G8, 9G2 và 3E3 vẫn giữ được khả năng trung hòa cả OSM của người và khỉ cynomolgus (**Fig. 3**). 15E10 và 2B7 không thể tạo ra các đường cong thực nghiệm có chất lượng đủ để tính toán các trị số IC50. Như với thử nghiệm tế bào KB huyết thanh không phải của người, kháng thể hiệu lực nhất là 10G8 với 9G2 xếp thứ hai.

Một số sự giảm sút rõ rệt về hoạt tính được thấy khi có mặt huyết thanh AB 25%. Ở mức độ nào đó, điều này có thể là do huyết thanh AB gây nhiễu kết quả của thử nghiệm này. Các mức nền của IL-6 được quan sát thấy trong thử nghiệm này cao hơn so với trong huyết thanh không phải của người.

OSM người nội sinh (thử nghiệm gp130):

Tất cả 4 kháng thể dẫn đầu, 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7, cũng như kháng thể 15E10, ức chế OSM người nội sinh từ 4 kháng thể cho riêng biệt (**Fig. 4**). OSM tự nhiên này được tạo ra bằng cách kích thích GM-CSF bạch cầu trung tính của người khỏe mạnh.

Hoạt tính phản ứng LIF người (thử nghiệm trung hòa tế bào KB):

LIF người là thành viên của họ IL-6 có quan hệ gần nhất với OSM người. Các thử nghiệm ban đầu chỉ ra rằng không có hoạt tính phản ứng giữa 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7 và LIF người, điều này cho thấy các kháng thể này là đặc hiệu OSM (**Fig. 5**).

Hoạt tính phản ứng OSM khi đuôi sóc (thử nghiệm trung hòa tế bào KB):

Tất cả 4 phân tử dẫn đầu 10G8, 9G2, 3E3 và 2B7 được chỉ ra là trung hòa OSM khi đuôi sóc trong thử nghiệm trung hòa tế bào KB (**Fig. 6**). 15E10 và panel chứa 3 kháng thể kháng OSM người bổ sung, 10D3DLE, OM4.11.17 và OM4.11.31, cũng không thể trung hòa OSM khi đuôi sóc.

Từ hai lần lặp lại thử nghiệm, 10G8 là chất trung hòa OSM khi đuôi sóc hiệu quả nhất, với 9G2 được xếp thứ hai.

1.2.3 Các kháng thể đơn dòng được chọn để tiến hành

Từ 4 kháng thể này, 10G8 được chọn làm kháng thể đứng đầu để khám trên cơ sở nó đứng đầu tất cả các thử nghiệm được liệt kê trên đây. 9G2 cũng được chọn để khám như một phân tử back-up trong trường hợp khó làm tương thích với người.

1.3 Thao tác di truyền kháng thể và lựa chọn chuỗi kháng thể dẫn đầu

1.3.2 Các trình tự biến đổi

Các gen biến đổi cho 4 kháng thể đơn dòng đã chọn, 2B7, 3E3, 9G2 và 10G8 được phân lập và được giải trình tự song song để cho phép tạo ra các kháng thể khả năng tương ứng. Toàn bộ ARN được chiết từ các pelet tế bào lai. Trình tự mã hóa gen V chuỗi nặng và nhẹ được khuếch đại bằng RT-PCR hoặc 5'RACE và sau đó được tách dòng TA để phân tích trình tự. Khuếch đại gen V được thực hiện hai lần với mỗi kháng thể để có thể kiểm tra tiếp trình tự chính xác từ hai phản ứng độc lập. Trình tự của chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi được thu lại đối với cả 4 dòng lai. Việc sắp xếp trình tự protein chỉ ra rằng các kháng thể có mức độ tương đồng trình tự cao trong cả vùng chuỗi nặng và nhẹ biến đổi (**Fig. 7 & 8**). Các trình tự của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của các kháng thể này được chỉ ra trong SEQ ID NO. 26-48. Xem bảng A.

So sánh trình tự giữa 4 kháng thể đơn dòng đứng đầu này và kháng thể 15E10 chỉ thể hiện sự tương đồng 50-60% với chuỗi nhẹ (**Fig. 9**) hoặc chuỗi nặng (**Fig. 10**). Điều này chỉ ra rằng các kháng thể này liên kết vào các epitop khác với các epitop được nhận biết bởi kháng thể 15E10.

1.3.3 Tách dòng kháng thể

1.3.3.1 Cấu trúc khảm

Cả 10G8 và 9G2 được tạo ra dưới dạng các kháng thể khảm bằng cách ghép các vùng VH và VL chuột đã mô tả trên đây lên vùng kiểu hoang Fc gamma 1 của người được tối ưu hóa codon và vùng hằng định kappa tương ứng. Các kháng thể khảm được sử dụng để xác nhận chức năng của các vùng V của chuột đã tách dòng và được tinh chế và sử dụng làm kháng thể tham chiếu khi kiểm tra các cấu trúc được làm tương thích với người. Các đoạn môi PCR được thiết kế dựa trên các trình tự ADN 5' và 3' được xác định để bao gồm các vị trí giới hạn cần thiết cho việc tách dòng vào các vectơ biểu hiện của động vật có vú Rlx và pTT5. Các đoạn môi cũng được

thiết kế để thay thế trình tự tín hiệu tự nhiên bằng trình tự tín hiệu Campath. Các vị trí Hind III và Spe I được thiết kế để tạo khung vùng chức năng V_H và cho phép tách dòng vào Rld biến đổi hoặc vector pTT5 chứa vùng $\gamma 1$ C của người. Việc đưa vị trí Spe I vào trình tự 4 khung gây ra sự thay đổi axit amin duy nhất ở FR4 ở vị trí 108. Đối với vùng 9G2 V_H , vị trí SpeI bên trong có mặt ở đầu 5' của trình tự ADN, đoạn mồi PCR đối với kháng thể khảm 9G2 được thiết kế để loại bỏ vị trí SpeI bên trong này. Các vị trí Hind III và BsiWI được thiết kế để tạo khung vùng chức năng V_L và cho phép tách dòng vào vector Rln hoặc pTT5 biến đổi chứa vùng κ C người.

Các dòng có trình tự V_H và V_L chính xác được xác định và các plasmit được tạo ra để biểu hiện trong tế bào CHO hoặc HEK.

1.3.3.2 Biểu hiện kháng thể khảm

Các plasmit Rld và Rln mã hóa lần lượt các vùng chức năng V_H và V_L 10G8 và 9G2 khác được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào CHOEA bằng cách điện di và được biểu hiện trong môi trường nuôi cấy tế bào đa dòng. Các plasmit pTT mã hóa các vùng chức năng V_H và V_L 10G8 và 9G2 được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293 sử dụng hệ phương pháp chuyển nhiễm lipid để cho phép biểu hiện episome tạm thời, chuyển nhiễm vào hệ thống biểu hiện episome có thể tạo ra một lượng lớn kháng thể. Các kháng thể khảm (10G8c và 9G2c) tạo ra được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy tế bào bằng sắc ký ái lực trên Protein A Sepharose. Các kháng thể đã tinh chế được QC bằng phân tích SDS-PAGE và sắc ký loại cỡ.

1.3.3.2 Số liệu thử nghiệm liên kết

ELISA liên kết OSM người:

Cả kháng thể khảm 10G8 và 9G2 đều liên kết hiệu quả với OSM người, ở mức độ mạnh hơn so với kháng thể khảm 15E10 (15E10c) (**Fig. 11**). Đây là ELISA trực tiếp, trong đó OSM người được bao ở nồng độ 1 μ g/ml và các kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG người.

Phân tích BIA:

Phân tích BIAcore chỉ ra là rất ít hoặc không có sự mất liên kết với OSM người hoặc khỉ cynomolgus ở các phân tử 10G8 và 9G2 khảm so với các kháng thể mẹ của chuột (**bảng 4**). Kháng thể khảm 10G8 xếp thứ nhất (654pM), đứng trước kháng thể khảm 9G2 (1,33nM). Tất cả các kháng thể đều thể hiện ái lực đối với OSM khỉ cynomolgus cao hơn so với OSM người.

Bảng 4: động học BIAcore – động học liên kết của kháng thể khảm 10G8, 10G8, kháng thể 9G2 & kháng thể khảm 9G2.

	OSM khỉ cyno			OSM người		
	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)
Kháng thể khảm 10G8	2,37E+5	1,14E-4	0,480	2,33E+5	1,52E-4	0,654
10G8 chuột	9,69e+4	2,99e-5	0,308	1,12e+5	6,14e-5	0,549
Kháng thể khảm 9G2	1,27E+5	9,99E-5	0,787	1,26E+5	1,68E-4	1,333
9G2 chuột	6,14e+4	4,76e-5	0,775	7,52e+4	1,21e-4	1,60

1.3.3.4 Số liệu thử nghiệm chức năng

ELISA Gp130 người:

ELISA gp130 người sử dụng mức nồng độ OSM tương đối cao (25ng/ml), làm giảm khả năng tách kháng thể ái lực cao khỏi kháng thể ái lực thấp vì thừa phối tử. Sau 3 lần lặp lại thử nghiệm này, kháng thể khảm 10G8 là kháng thể hữu hiệu nhất trong việc ức chế cả OSM người và khỉ cynomolgus liên kết với thụ thể gp130. Các trị số đối với kháng thể mẹ của chuột 10G8 và kháng thể khảm 10G8 là rất giống nhau trong thử nghiệm này (**Fig. 12; bảng 5**). Không có sự khác biệt đáng kể giữa 9G2 và thể khảm của nó.

Bảng 5: ELISA gp130 người – tóm tắt ba lần lặp lại ELISA gp130 người để xếp loại hoạt tính 10G8, kháng thể khảm 10G8, 9G2 & kháng thể khảm 9G2 kháng OSM người và khỉ cynomolgus. Kháng thể 15E10 được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm.

Xếp loại OSM người	Kháng thể	IC50 trung bình của OSM người $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	IC50 trung bình của OSM khỉ Cynomolgus OSM $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (xếp loại OSM khỉ Cyno)
1	Thể khảm 10G8	0,037 $\pm$ 0,035 (247pM)	0,016 $\pm$ 0,015 (1) (107pM)
2	9G2	0,038 $\pm$ 0,004 (253pM)	0,049 $\pm$ 0,059 (5) (327pM)
3	10G8	0,044 $\pm$ 0,034 (293pM)	0,017 $\pm$ 0,013 (2) (113pM)
4	Thể khảm 9G2	0,078 $\pm$ 0,102 (520pM)	0,028 $\pm$ 0,033 (3) (187pM)
5	15E10	0,250 $\pm$ 0,403 (1,7nM)	0,071 $\pm$ 0,096 (6) (473pM)

Thử nghiệm gp130 người được lặp lại khi có mặt huyết thanh AB người cho cả OSM của người và khỉ cynomolgus. Tất cả các phân tử đều giữ được hoạt tính của chúng trong huyết thanh 25%. Kháng lại OSM của người và khỉ cynomolgus, thể khảm 10G8 và kháng thể mẹ của chuột 10G8 lần lượt xếp thứ nhất và thứ hai. Các trị số IC50 đối với hai kháng thể này là giống nhau. Không có khác biệt nào đáng kể được quan sát thấy giữa kháng thể khảm 9G2, xếp thứ ba, và kháng thể mẹ của chuột của nó (số liệu không thể hiện).

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB:

Kháng thể mẹ của chuột 10G8 hoạt động tương tự như thể khảm (**Fig. 13; bảng 6**). Kháng thể mẹ của chuột 9G2 và thể khảm lần lượt xếp thứ ba và thứ tư trong thử nghiệm này.

Bảng 6: thử nghiệm trung hòa tế bào KB- Tóm tắt ba lần lặp lại thử nghiệm trung hòa tế bào KB để xếp loại hoạt tính 10G8, thể khảm 10G8, 9G2 & kháng thể khảm 9G2 kháng lại OSM người và khỉ cynomolgus. Kháng thể 15E10 được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm.

Xếp loại OSM người	Kháng thể	IC50 trung bình với OSM người $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	IC50 trung bình với OSM khỉ Cynomolgus $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (xếp loại OSM khỉ cyno)
1	10G8Ch	0,021 $\pm$ 0,008 (140pM)	0,008 $\pm$ 0,007 (1) (53pM)
2	10G8	0,054 $\pm$ 0,066 (360pM)	0,034 $\pm$ 0,047 (3) (227pM)
3	9G2	0,163 $\pm$ 0,197 (1,1nM)	0,046 $\pm$ 0,025 (4) (307pM)
4	9G2Ch	0,231 $\pm$ 0,287 (1,5nM)	0,031 $\pm$ 0,008 (2) (207pM)
5	15E10	Ngoài khoảng	0,057 $\pm$ 0,036 (5) (380pM)

Khi có mặt huyết thanh AB người 25%, 10G8, thể khảm 10G8, 9G2 & kháng thể khảm 9G2 đều giữ được khả năng trung hòa OSM người và khỉ cynomolgus (**Fig. 14**). Sự giảm mạnh hoạt tính được quan sát thấy khi có mặt huyết thanh AB 25%. Trong khi trị số IC50 không thể tính được với nồng độ khởi đầu của kháng thể là 1 $\mu\text{g/ml}$, tác dụng trung hòa chuẩn độ trong được thấy với tất cả các kháng thể ngoại trừ đối chứng âm không liên quan. Sự

giảm mạnh hoạt tính này có thể, đến mức nào đó, là do huyết thanh AB gây nhiễu kết quả hiển thị của thử nghiệm này. Các mức nền IL-6 được quan sát thấy trong thử nghiệm này là cao hơn so với trong huyết thanh không phải của người.

OSM người nội sinh (thử nghiệm gp130):

10G8, thể khảm 10G8, 9G2 & kháng thể khảm 9G2, ức chế OSM người nội sinh từ hai kháng thể cho riêng biệt (**Fig. 15**). Với hai kháng thể cho này, 10G8 và thể khảm 10G8 cùng xếp thứ nhất, trong khi đó 9G2 và thể khảm của nó lần lượt xếp thứ ba và thứ tư (**bảng 7**). OSM tự nhiên này được tạo ra từ việc kích thích GM-CSF bạch cầu trung tính của người khỏe mạnh.

Bảng 7: Thử nghiệm gp130 OSM nội sinh – tóm tắt hai thể cho bạch cầu trung tính trong ELISA gp130 để đánh giá hoạt tính 10G8, thể khảm 10G8, 9G2 & kháng thể khảm 9G2 kháng lại OSM người nội sinh. Kháng thể công cụ được sử dụng làm đối chứng âm.

Xếp loại	mAb	IC50 $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$
1=	10G8	0,009 $\pm$ 0,001 (60pM)
1=	10G8Ch	0,009 $\pm$ 0,000 (60pM)
3	9G2Ch	0,017 $\pm$ 0,001 (113pM)
4	9G2	0,020 $\pm$ 0,004 (133pM)

Hoạt tính phản ứng với LIF người (thử nghiệm trung hòa tế bào KB):

LIF người là thành viên của họ IL6 có liên quan gần nhất với OSM người. Ba lần lặp lại thử nghiệm tế bào KB LIF người chỉ ra rằng 10G8, thể khảm 10G8, 9G2, và kháng thể khảm 9G2 không trung hòa LIF người. Kháng thể kháng LIF người đã có trên thị trường trung hòa LIF trong thử nghiệm này (**Fig. 16**). Điều này chứng minh là các kháng thể này đặc hiệu với OSM.

Ví dụ 2: Làm tương thích với người

2.1.1 Kỹ thuật làm cho chuỗi nặng tương thích với người

Sau khi phân tích BLAST các số liệu dòng tinh gen V của người, dòng tinh của người IGHV3_7) mà có sự tương đồng 74% (bao gồm các CDR) với trình tự chuỗi nặng biến đổi 10G8 chuột được lựa chọn làm khung nhận được ưu tiên để làm tương thích với người. Vùng V dòng tinh được kết hợp bằng cách sử dụng máy tính với FR4 thích hợp, trong trường hợp này, minigen JH2 (Kabat Vol.II) dựa trên sự tương đồng trình tự. 6 gốc đầu tiên của các gốc minigen JH2 rơi vào vùng CDR3 mà được thay thế bằng CDR mới đưa vào từ kháng thể cho. 3 biến thể chuỗi nặng được làm tương thích với người được tạo ra trên cơ sở so sánh trình tự và có thể ảnh hưởng đến chức năng của kháng thể. Cấu trúc H0 là sự ghép thẳng các CDR chuột từ 10G8 (sử dụng định nghĩa Kabat) vào khung nhận của người được chọn trên đây. Các cấu trúc H1 và H2 là dựa trên H0, cả hai đều kết hợp một đột biến khung bổ sung mà khác biệt trong mỗi cấu trúc; lần lượt ở vị trí 2 và 105.

2.1.2 Làm cho chuỗi nhẹ tương thích với người

Sau khi phân tích BLAST số liệu dòng tinh gen V của người, dòng tinh của người IGKV4_1) mà có sự tương đồng 64% (bao gồm CDR) với trình tự chuỗi nhẹ biến đổi 10G8 của chuột được chọn làm khung nhận được ưu tiên để làm tương thích với người. Vùng V dòng tinh được kết hợp bằng máy tính với FR4 thích hợp, trong trường hợp này minigen kappa 4 vùng J (Kabat Vol.II) dựa trên sự tương đồng trình tự. Hai gốc đầu tiên trong các gốc minigen JK-4 nằm trong vùng CDR3 và giống với hai gốc cuối cùng trong CDR3 chuỗi nhẹ 10G8 của chuột. 5 biến thể chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra trên cơ sở so sánh trình tự và có thể ảnh hưởng đến chức năng của kháng thể. Cấu trúc L0 là sự ghép thẳng các CDR chuột từ 10G8 (sử dụng định nghĩa Kabat) vào khung nhận của người đã chọn trên đây. Các cấu trúc L1, L2 và L3 là dựa trên L0, mỗi cấu trúc này kết hợp một đột biến khung bổ sung mà là khác nhau trong mỗi cấu trúc; lần lượt ở các vị trí 46, 84 và 103. Cấu trúc L4 kết hợp cả ba đột biến ngược trên đây.

2.1.3 Cấu trúc các vector được làm tương thích với người

Các trình tự ADN của vùng biến đổi được làm tương thích với người được tối ưu hóa trình tự bằng cách sử dụng phần mềm LETO 1.0 (Entelechon GmbH) và được tổng hợp *de novo* bằng cách thiết kế oligonucleotit chồng lắp và khuếch đại PCR. Các đoạn mỗi bao gồm các vị trí giới hạn để tách dòng vào các vector biểu hiện của động vật có vú và các trình tự tín hiệu globulin miễn dịch người cho sự tiết. Vùng nặng biến đổi được làm tương thích với người H0-H2 được tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú chứa vùng hằng định gamma 1 người sử dụng HindIII và SpeI. Song song, các vùng nhẹ biến đổi được làm tương thích với người L0-L4 được tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú chứa vùng hằng định kappa người sử dụng HindIII và BsiWI.

2.1.4 Sàng lọc ban đầu panel chứa các biến thể được làm tương thích với người

Để sàng lọc và thu hẹp panel chứa các biến thể được làm tương thích với người (3 chuỗi nặng x 5 chuỗi nhẹ = 15), các kháng thể này được biểu hiện trong tế bào HEK và được đánh giá bằng BIAcore, ELISA và các thử nghiệm chức năng.

2.2 Các thử nghiệm sinh học về kháng thể 10G8 được làm tương thích với người: mAb khảm thành mAb được làm tương thích với người

2.2.1 Sàng lọc thứ cấp

Việc sàng lọc thứ cấp để xếp loại các kháng thể 10G8 được làm tương thích với người, được liệt kê trong bảng 9, bao gồm phân tích động học BIAcore kháng OSM người; ELISA gp130 người với OSM người/ khỉ cynomolgus; thử nghiệm trung hòa tế bào KB với OSM người/khỉ cynomolgus. Ngoài ra, khả năng phong bế sự liên kết gp130 trong huyết thanh AB người 25% được đánh giá.

Phân tích BIAcore:

Phân tích BIACore ban đầu các dịch nổi chuyên nhiễm chứng minh rằng các biến thể được làm tương thích với người L1 và L4 có ái lực với OSM người cao hơn so với các biến thể được làm tương thích với người L0, L2 và L3 (**bảng 8**). Các đột biến chuỗi nhẹ này cải thiện ái lực so với một mình kháng thể ghép thẳng (H0L0) và thể khảm 10G8. Các biến thể chuỗi nặng, H1 và H2, có ảnh hưởng lên ái lực của các kháng thể này ít hơn so với thể ghép thẳng, H0.

Phân tích trên các biến thể L1 và L4 được tinh chế khuếch đại chỉ ra rằng có rất ít sự khác biệt giữa ái lực của các mAb này với cả OSM người và khỉ cyno (**bảng 9**).

Bảng 8: Động học BIACore – Động học liên kết OSM người của dịch nổi chuyên nhiễm chứa 15 kháng thể 10G8 được làm tương thích với người back-up kháng OSM so với thể khảm 10G8.

	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)
H0L0	3,69E+5	1,60E-4	0,435
H0L1	3,98E+5	9,95E-5	0,250
H0L2	3,65E+5	1,37E-4	0,375
H0L3	3,74E+5	1,45E-4	0,388
H0L4	4,13E+5	1,11E-4	0,268
H1L0	3,81E+5	1,62E-4	0,425
H1L1	4,00E+5	9,99E-5	0,250
H1L2	3,65E+5	1,63E-4	0,445
H1L3	3,71E+5	1,27E-4	0,344
H1L4	3,77E+5	1,30E-4	0,344
H2L0	3,63E+5	1,45E-4	0,398
H2L1	3,94E+5	1,13E-4	0,286
H2L2	3,68E+5	1,42E-4	0,387
H2L3	3,76E+5	1,50E-4	0,398

H2L4	4,48E+5	1,01E-4	0,226
Dịch nổi chứa thể khảm 10G8	2,52E+5	1,03E-4	0,407
Thể khảm đã tinh chế 10G8	2,57E+5	1,05E-4	0,407

Bảng 9: Động học BIAcore – Động học liên kết OSM người và khỉ Cynomolgus của các mẻ đã tinh chế chứa kháng thể biến đổi L1 và L4 10G8 được làm tương thích với người kháng OSM so với thể khảm 10G8

	OSM khỉ Cyno			OSM người		
	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)
H0L1	4,26E+5	1,07E-4	0,251	3,87E+5	1,37E-4	0,355
H1L1	4,28E+5	1,10E-4	0,258	3,75E+5	1,66E-4	0,443
H2L1	4,14E+5	1,24E-4	0,299	3,83E+5	1,40E-4	0,365
H0L4	4,18E+5	1,01E-4	0,242	3,74E+5	1,40E-4	0,374
H1L4	4,21E+5	1,11E-4	0,264	3,65E+5	1,35E-4	0,370
H2L4	4,41E+5	9,01E-5	0,205	3,80E+5	1,35E-4	0,356
Thể khảm 10G8	2,53E+5	9,95E-5	0,394	2,41E+5	1,25E-4	0,518
15E10h	5,26E+5	3,10E-4	0,590	4,29E+5	6,15E-4	1,43

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB:

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB sử dụng lượng OSM giảm so với thử nghiệm gp130 (1ng/ml so với 25ng/ml). Điều này khiến cho nó trở thành thử nghiệm phân tách tốt hơn để tách các chất trung hòa ái lực cao khỏi chất trung

hòa ái lực thấp. Sàng lọc bằng thử nghiệm tế bào KB các cấu trúc biến đổi H0, H1, H2, L0, L1, L2, L3 và L4 ban đầu chỉ ra các cấu trúc L1 là tốt hơn. (số liệu không thể hiện). Các cấu trúc này, cùng với các biến thể L4 hoạt động tốt trong phân tích BIAcore, được tạo ra trong các mẻ lớn hơn cho các thử nghiệm khác. Từ 3 lần lặp lại thử nghiệm này, các biến thể 10G8 L1 được làm tương thích với người xếp thứ nhất, cho trị số IC₅₀ trung bình là 14ng/ml kháng OSM người và 10ng/ml kháng OSM khi cynomolgus (**Fig. 17; bảng 10**).

Bảng 10: thử nghiệm trung hòa tế bào KB – tóm tắt 3 lần lặp lại thử nghiệm trung hòa tế bào KB để xếp loại hoạt tính kháng OSM người và khi cynomolgus của biến thể L1 và L4 10G8 được làm tương thích với người.

Xếp loại OSM người	Kháng thể	Trị số IC₅₀ trung bình đối với OSM người $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	Trị số IC₅₀ trung bình đối với OSM khi Cynomolgus IC₅₀ $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (xếp loại OSM khi Cyno)
1	H1L1	0,013 $\pm$ 0,001 (83pM)	0,010 $\pm$ 0,002 (3) (67pM)
2	H2L1	0,014 $\pm$ 0,007 (93pM)	0,013 $\pm$ 0,003 (6) (14pM)
3	H0L1	0,015 $\pm$ 0,009 (102pM)	0,007 $\pm$ 0,002 (1) (21pM)
4	H1L4	0,016 $\pm$ 0,015 (107pM)	0,011 $\pm$ 0,007 (4) (10pM)
5	H0L4	0,018 $\pm$ 0,012 (118pM)	0,012 $\pm$ 0,009 (5) (49pM)
6	H2L4	0,022 $\pm$ 0,015 (147pM)	0,016 $\pm$ 0,015 (7) (58pM)
7	Thế khảm 10G8	0,022 $\pm$ 0,022 (144pM)	0,008 $\pm$ 0,005 (2) (100pM)

Các biến thể L1 10G8 được làm tương thích với người được chọn để thử nghiệm thêm vì chúng thể hiện hoạt tính sinh học mạnh hơn trong thử nghiệm tế bào KB so với các biến thể L4. Các biến thể L4 này có hiệu suất sản xuất rất thấp trong hệ thống CHO-E1a và điều này khiến nó bị loại bỏ cho các bước tiếp theo.

ELISA gp130 người:

ELISA gp130 người sử dụng mức nồng độ OSM tương đối cao (25ng/ml), làm giảm khả năng tách kháng thể ái lực cao khỏi kháng thể ái lực thấp hơn, vì phối tử có mặt với lượng dư. Sau hai lần lặp lại thử nghiệm này với các biến thể L1 10G8 được làm tương thích với người, cả 3 biến thể này đều được chỉ ra là có hiệu lực tương đương trong việc phong bế cả OSM người và khỉ cynomolgus liên kết với thụ thể gp130 trong thử nghiệm này (**Fig. 18**).

Thử nghiệm gp130 người cũng được thực hiện khi có mặt huyết thanh AB người 25%. Hai lần lặp lại thử nghiệm này chỉ ra là tất cả các kháng thể này, các biến thể H0L1, H1L1 và H2L1 10G8 được làm tương thích với người vẫn giữ được khả năng phong bế OSM người và khỉ cynomolgus liên kết với gp130 (số liệu không thể hiện).

2.3 Tách các đoạn Fab và kết tinh phức 10G8 mAb-OSM

2.3.1 Tạo các đoạn Fab

Các đoạn Fab từ kháng thể mẹ 10G8 được tạo ra bằng cách cắt bằng papain được bất động trên hạt (Pierce 20341) trong 20h ở 37°C trong dung dịch đệm chứa đệm phosphat 20mM độ pH =7, EDTA 10mM và L-xystein 10mM. Sau khi cắt, các hạt được loại bỏ bằng cách sử dụng cột nhựa dùng một lần, sau đó các đoạn Fc nhiễm và kháng thể chưa cắt được loại bỏ khỏi các đoạn Fab bằng cách sử dụng sắc ký typ protein A (MabSelect, GE Healthcare 17-5438-03). Phần chưa liên kết, chứa các đoạn Fab, được tinh chế thêm bằng cách sử dụng sắc ký loại cỡ Superdex 200pg (SEC) (GE

Healthcare 17-1069-01) sử dụng HEPES 25mM độ pH=7,7, đệm NaCl 150mM làm pha động. Phức hợp này được tạo ra bằng cách trộn 11,5mg Fab đã tinh chế (GRITS30249) với 5,75mg OSM tái tổ hợp (GRITS23122), tỉ lệ mol là 1:1, trong 1,5h ở 4°C. Sau đó phức hợp này được tinh chế từ nguyên liệu chưa được tạo phức sử dụng SEC Superdex 200pg. Phức đã hòa tan được cô đặc đến 44mg/ml protein toàn phần (năng suất 9,2mg) sử dụng thiết bị cô đặc ly tâm được lắp với màng 10kmcwco (Vivaspin VS2002). Các thành phần phức được xác nhận bằng cách sử dụng kỹ thuật giải trình tự đầu cùng N, đo phổ khối và SDS-PAGE. Hoạt tính liên kết chức năng OSM của các đoạn Fab được xác nhận bằng cách sử dụng thử nghiệm ức chế gp130 (số liệu không thể hiện).

2.3.2 Kết tinh phức hợp 10G8-OSM

Các đoạn Fab OSM 10G8 được tạo phức với OSM, và phức này được kết tinh ở 20°C sử dụng PEG3500 làm chất gây kết tủa. Sự kết tinh được tối ưu hóa, được gửi đi phân tích ở European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) và cấu trúc này được hòa tan ở 3,5Å. Các đường xoắn ốc B và C của OSM liên kết mAb 10G8 có bề mặt tốt và cản trở vị trí II của OSM liên kết với thụ thể gp130 hoàn toàn bằng cách gây trở ngại lập thể, không có sự tương tác trực tiếp với các gốc bất kỳ của vị trí II. Chỉ các gốc liên quan trực tiếp đến sự liên kết (khoảng cách ngắn hơn 5Å) khi được phân giải ở 3,5Å được minh họa trong bảng 11 và Fig. 9. Tác dụng cản trở này chủ yếu là do chuỗi nhẹ. Bốn CDR liên kết với các chuỗi xoắn B và C của OSM, CDRH2, H3 và CDRL1 và L3, trực tiếp hoặc qua tương tác qua trung gian nước. Phân tử OSM không bị biến dạng đáng kể trên sự liên kết với 10G8 mAb. Vì hai trong số các CDR này không liên kết nên CDRH1 và L2, các biến thể của kháng thể này được tạo ra, trong đó một hoặc cả hai biến thể này được chuyển lại trình tự của người. Điều này có thể dẫn đến phân tử này có khả năng gây miễn dịch kém hơn thể ghép thẳng được làm tương thích với người.

Bảng 11:

Các gốc OSM	Resno(typ)	Nguyên tử	Các gốc kháng thể (L=chuỗi nhẹ, H=chuỗi nặng)	Resno(Typ)	Nguyên tử	Khoảng cách tính theo Angstrom
A	82(LEU)	C	H	104(THR)	CG2	3,45
A	82(LEU)	O	H	104(THR)	CG2	3,47
A	83(HIS).	CA	H	59(TYR)	OH	3,20
A	83(HIS).	CB	H	59(TYR)	OH	3,37
A	83(HIS).	CE1	H	103(THR).	CG2	3,43
A	83(HIS).	NE2	H	106(TRP).	CH2	3,44
A	83(HIS).	CD2	H	59(TYR).	OH	3,30
A	83(HIS).	C	H	59(TYR).	OH	3,26
A	83(HIS).	O	H	59(TYR).	OH	2,62
A	84(ARG).	NH1	H	57(PHE).	CE1	3,47
A	90(GLN).	OE1	H	60(TYR).	O	3,30
A	90(GLN).	NE2	H	65(ARG).	NH2	3,08
A	94(LYS).	NZ	H	62(ASP).	OD2	3,38
A	115(ARG) .	NE	H	104(THR).	OG1	3,19
A	115(ARG) .	NH2	H	105(PHE).	CD1	3,49
A	115(ARG) .	NH2	H	105(PHE).	CE1	3,25
A	115(ARG) .	NH2	H	104(THR).	O	3,21

A	122(ARG)	NH2	H	103(THR).	OG1	3,14
A	152(THR).	OG1	H	58(THR).	OG1	3,19
A	112(GLN).	O	L	96(ARG).	NH2	3,08
A	115(ARG)	NH2	L	96(ARG).	O	3,30
A	123(ASN).	CG	L	34(TYR).	OH	3,18
A	123(ASN).	ND2	L	34(TYR).	OH	2,56

2.3.3

2.3.4 Kháng thể 10G8 được làm tương thích với người: Đột biến thể CDR người

Cấu trúc tinh thể được hòa tan trong nhà của mAb 10G8 kháng OSM được tạo phức với OSM, xác nhận CDRH1 và CDRL2 là không liên quan trực tiếp đến sự liên kết kháng nguyên. Các CDR dòng tinh người thích hợp được lựa chọn để thay thế các CDR dòng tinh chuột này. Hai trình tự dòng tinh người CDRH1 và hai trình tự dòng tinh người CDRL2 được kiểm tra về tác động của chúng trên sự liên kết kháng nguyên. Đối với cả CDR chuỗi nặng và nhẹ, các trình tự từ khung nhận dòng tinh người ban đầu được kiểm tra (lần lượt là IGHV3_7 và IGKV4_1) và cả hai trình tự dòng tinh người khác mà được chọn dựa vào sự tương đồng CDR và khung bên sườn (IGHV3_23 và IGKV1_5). Các trình tự CDRH1 và CDRL2 dòng tinh người được trao đổi với các CDR chuột tương ứng trong các vùng V của H0 và L1 được làm tương thích với người. Các vùng V mới được tổng hợp *de novo* bằng cách thiết kế oligonucleotit chồng lấp và khuếch đại PCR như trong phần 1.1.4.

2.4 Thử nghiệm sinh học kháng thể 10G8 được làm tương thích với người: mAb H0L1 10G8 được làm tương thích với người thành mAb 10G8 được làm tương thích với người có CDR không liên kết được làm tương thích với người

2.4.1 Sàng lọc thứ cấp

Phân tích BIACore:

Phân tích BIACore dịch nổi chuyển nhiễm từ nhiều cấu trúc khác nhau của CDRH1 và CDRL2 của 10G8 được làm tương thích với người chứng minh rằng kháng thể duy nhất vẫn giữ đầy đủ ái lực với OSM người của mAb tiền ứng viên là phân tử H0(IGHV3_23)L1 (**bảng 12**). Cấu trúc này, cùng với hai phân tử khác có các trị số KD tốt nhất tiếp theo, H0L1(IGKV4_1) và H0(IGHV3_23)L1(IGK4_1), được khuếch đại và được tinh chế cho thử nghiệm tiếp theo.

Bảng 12: Động học BIACore – Động học liên kết OSM khỉynomolgus và OSM người của dịch nổi chuyển nhiễm chứa các kháng thể biến đổi CDRH1 và CDRL2 của H0L1 10G8 được làm tương thích với người back-up kháng OSM so với kháng thể khảm 10G8.

	OSM khỉ Cyno			OSM người		
	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)
H0 IGHV3_7 +L1	3,37E+7	0,8146	24,2	9,10E+4	9,67E-4	10,6
H0 IGHV3_23 +L1	3,52E+5	1,09E-4	0,310	3,61E+5	1,58E-4	0,437
H0+L1 IGKV4_1	1,50E+5	2,12E-4	1,41	1,61E+5	2,21E-4	1,37
H0+L1 IGKV1_5	6,75E+4	5,57E-4	8,26	6,87E+4	6,40E-4	9,33
H0 IGHV3_7 +L1 IGKV4_1	5,07E+4	1,77E-3	34,9	3,68E+4	1,63E-3	44,4
H0 IGHV3_7	Mức độ bắt giữ thấp			Mức độ bắt giữ thấp		

+L1 IGKV1_5						
H0 IGHV3_23 +L1 IGKV4_1	1,52E+5	2,23E-4	1,47	1,59E+5	2,47E-4	1,56
H0 IGHV3_23 +L1 IGKV1_5	6,67E+4	5,93E-4	8,89	7,11E+4	6,60E-4	9,27
H0+L1	3,45E+5	1,04E-4	0,301	3,32E+5	1,53E-4	0,461
H0L1 đã tinh chế	3,38E+5	1,15E-4	0,341	3,40E+5	1,51E-4	0,445

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB:

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB chứng minh rằng cấu trúc 10G8 H0(IGHV3_23)L1 được làm tương thích với người (được dán nhãn là H0('CDRH1)L1) thể hiện hiệu lực rất giống với mAb mẹ được làm tương thích với người 10G8 H0L1 (được dán nhãn là H0L1). Sự chuyển hóa ngược bất kỳ CDRL2 không liên kết thành trình tự người chỉ ra sự giảm hoạt tính trung hòa, như được thấy từ số liệu đối với các kháng thể H0L1(IGKV4_1) (được gắn nhãn H0L1(huCDRL2)) và H0(IGHV3_23)L1(IGK4_1) (được gắn nhãn H0(huCDRH1)L1(huCDRL2)) (**Fig. 20, bảng 13**).

Bảng 13: Thử nghiệm trung hòa tế bào KB – Tóm tắt ba lần lặp lại thử nghiệm trung hòa tế bào KB để xếp loại hoạt tính kháng OSM người và khỉ cynomolgus của các biến thể CDRH1 và CDRL2 10G8 được làm tương thích với người.

Xếp loại OSM người	Kháng thể	IC50 trung bình với OSM người $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	IC50 trung bình với OSM Cynomolgus $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (xếp loại OSM Cyno)
1	H0(huCDRH1)L1	0,008 $\pm$ 0,005 (53pM)	0,007 $\pm$ 0,000 (1) (47pM)
2	H0L1	0,009 $\pm$ 0,002	0,007 $\pm$ 0,002 (2)

		(60pM)	(47pM)
3	H0L1(huCDRL2)	0,054±0,024 (360pM)	0,081±0,004 (4) (540pM)
4	H0(huCDRH1)L1(huCDRL2))	0,077±0,038 (513pM)	0,114±0,045 (5) (760pM)

Từ các số liệu, H0(huCDRH1)L1 của 10G8 được làm tương thích với người được lựa chọn làm mAb tiền ứng viên dẫn đầu để mô tả hoàn chỉnh.

2.2 Các thử nghiệm sinh học về kháng thể 10G8 được làm tương thích với người: H0(IGHV3_23)L1 mAb 10G8 được làm tương thích với người

2.2.1 Sàng lọc thứ cấp

Phân tích BIACore:

Phân tích BIACore được thực hiện trên H0(IGHV3_23)L1 mAb đã tinh chế và ddc xếp loại dựa vào kháng thể khảm 10G8 và mAb mẹ H0L1 của 10G8 được làm tương thích với người. Không có hoặc có rất ít sự khác biệt giữa mAb H0(IGHV3_23)L1 và mAb H0L1 mẹ về ái lực đối với cả OSM người và khỉ cynomolgus (**bảng 6**). mAb H0(IGHV3_23)L1 có ái lực với OSM người tăng cao gấp 6,5 lần (0,8 log) so với kháng thể 15E10h được làm tương thích với người kháng OSM không cạnh tranh thay thế. Mẽ OSM mới được sử dụng cho thử nghiệm này, dẫn đến các trị số KD thấp hơn, tuy nhiên các khác biệt giữa các biến thể được làm tương thích với người và kháng thể không cạnh tranh vẫn là giống nhau.

Bảng 14: Động học BIACore – Động học liên kết với OSM khi cynomolgus và OSM người của mAb H0(IGHV3_23)L1 đã tinh chế so với thể khảm 10G8 và so với mAb mẹ H0L1 10G8 được làm tương thích với người và với kháng thể 15E10h được làm tương thích với người kháng OSM không cạnh tranh thay thế.

	OSM khỉ cyno			OSM người		
	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (pM)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (pM)
Thế khảm 10G8	2,50E+05	6,63E-05	266	4,27E+05	7,87E-05	184
H0 (CDRH1 IGHV3_23) L1	4,23E+05	8,39E-05	199	7,09E+05	9,65E-05	136
H0L1	4,27E+05	8,31E-05	195	7,12E+05	8,90E-05	125
15E10h	5,07E+05	3,24E-04	640	7,36E+05	6,49E-04	882

Phân tích Kinexa

Ái lực pha dung dịch Kinexa (Sapidyne Instruments 3200) được sử dụng để xác định ái lực toàn phần của kháng thể kháng OSM H0(huCDRH1)L1 và 15E10 được làm tương thích với người (kháng thể OSM không có liên quan) với OSM người, OSM khỉ cynomolgus macaque, OSM khỉ rhesus macaque và OSM marmoset (**bảng 15**). 15E10 được làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh.

Các hạt OSM được tạo ra bằng cách hấp thu (hạt polymethylmetacrylat - PMMA) hoặc tạo cặp amin (hạt sepharosa được hoạt hóa NHS). Một dãy phân tử OSM được thử nghiệm đòi hỏi tạo ra các hạt được bao bằng các nồng độ khác nhau của OSM. Đối với phần pha dung dịch, nồng độ cố định của kháng thể được ủ với một dãy rộng các nồng độ OSM và cho phép đạt tới sự cân bằng bằng cách ủ ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 2 giờ trước khi tiến hành phân tích. Sau đó, các hạt OSM được sử dụng để xác định lượng kháng thể tự do có mặt trong các mẫu pha dung dịch, do kháng thể tự do này liên kết với chất nền hạt OSM sau đó được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp thích hợp (kháng người hoặc kháng chuột tùy thuộc vào cấu trúc được thử nghiệm) được gắn thuốc nhuộm huỳnh quang. Các đường cong liên kết mà được khớp vào bằng cách sử dụng phần mềm phân tích Kinexa Pro có sẵn

trong máy. Nhiều lần chạy sử dụng các nồng độ khởi động khác nhau của kháng thể sau đó được tập hợp và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm phân tích n-đường cong để cho kết quả xác định ái lực chính xác hơn.

H0(huCDRH1)L1 thể hiện ái lực cao hơn với OSM người như đã được đánh giá trước đó bằng phân tích Biacore. Khác với Biacore, trong đó kháng thể này được liên kết vào bề mặt chip, Kinexa sử dụng kháng thể và phối tử tự do trong pha lỏng để đánh giá ái lực mà có liên hệ gần hơn với trạng thái tự nhiên.

Bảng 15: Động học Kinexa – động học liên kết OSM người, khỉ cynomolgus, khỉ rhesus và khỉ marmoset của akt back-up kháng OSM đã tinh chế H0(huCDRH1)L1 và 15E10 được làm tương thích với người.

Cấu trúc	Kháng nguyên	KD (pM)	95% cao (pM)	95% thấp (pM)
H0(huCDRH1)L1	OSM người	38	62	22
H0(huCDRH1)L1	OSM khỉ Cyno	53	82	31
H0(huCDRH1)L1	OSM khỉ Marmoset	21	31	14
H0(huCDRH1)L1	OSM khỉ Rhesus	122	161	90
15E10 được làm tương thích với người	OSM người	727	1000	499
15E10 được làm tương thích với người	Cyno OSM	102	157	61
15E10 được làm tương thích với người	OSM của khỉ Marmoset	**6100	468000	<22,5
15E10 được làm tương thích với người	OSM khỉ Rhesus	102	181	52

** Ái lực là rất yếu đối với OSM khỉ marmoset, nghĩa là đối với thử nghiệm điều khiển thụ thể sẽ cần hơn 40nM kháng thể để sử dụng các lượng μ M OSM.

Kết luận chung là sự liên kết của 15E10 được làm tương thích với người với OSM của khỉ marmoset yếu hơn đáng kể so với ái lực của nó với OSM người.

ELISA gp130 người:

ELISA gp130 người sử dụng lượng dư OSM (25ng/ml), do đó làm giảm khả năng tách kháng thể ái lực cao khỏi kháng thể ái lực thấp của nó. Sau 3 lần lặp lại thử nghiệm gp130, được xác nhận là kháng thể 10G8 mẹ của chuột, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ H0L1 của 10G8 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1 đều có hiệu lực trong việc cản trở cả OSM người và khỉ cynomolgus liên kết với thụ thể gp130 trong thử nghiệm này (**Fig. 21**). Do mức nồng độ kháng nguyên trong thử nghiệm này cao nên không thể xếp loại rõ ràng được.

Thử nghiệm gp130 người được lặp lại khi có mặt huyết thanh AB người 25% và dịch hoạt dịch gộp của người 25%. Ba lần lặp lại thử nghiệm này đối với mỗi chất nền chỉ ra rằng tất cả các kháng thể, kháng thể mẹ của chuột 10G8, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ H0L1 của 10G8 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1 cùng với 15E10h vẫn giữ được khả năng cản trở OSM người và khỉ cynomolgus liên kết với gp130 (số liệu không được thể hiện).

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB:

Thử nghiệm trung hòa tế bào KB là thử nghiệm có khả năng phân biệt để tách các chất trung hòa ái lực cao khỏi chất trung hòa có ái lực thấp tốt hơn so với thử nghiệm gp130, do mức nồng độ OSM thấp (1ng/ml) được sử dụng. Từ 3 lần lặp lại thử nghiệm này, (H0(huCDRH1)L1 cho trị số IC50 trung

bình là 30ng/ml kháng OSM người, 41ng/ml kháng OSM khi cynomolgus và 36ng/ml kháng OSM khi marmoset (**Fig. 22; bảng 17**).

Bảng 17: thử nghiệm trung hòa tế bào KB – Tóm tắt ba lần lặp lại thử nghiệm trung hòa tế bào KB để xếp loại hoạt tính kháng OSM người, khi cynomolgus và khi marmoset của H0(huCDRH1)L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh

Xếp loại OSM người	Kháng thể	IC50 trung bình với OSM người $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	IC50 trung bình với OSM khi Cynomolgus $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (Cyno OSM ranking)	IC50 trung bình với OSM khi Marmoset $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ (xếp loại OSM khi Marm)
1	10G8	0,0026 $\pm$ 0,0009 (17pM)	0,0017 $\pm$ 0,0006 (3) (11pM)	0,0017 $\pm$ 0,0003 (1) (11pM)
2	H0L1	0,0028 $\pm$ 0,0004 (19pM)	0,0014 $\pm$ 0,0003 (2) (9pM)	0,0017 $\pm$ 0,0008 (2) (11pM)
3	(H0(huCDRH1)L1	0,0030 $\pm$ 0,0015 (20pM)	0,0041 $\pm$ 0,0025 (4) (27pM)	0,0036 $\pm$ 0,0024 (3) (24pM)
4	10G8Ch	0,0052 $\pm$ 0,0064 (35pM)	0,0011 $\pm$ 0,0004 (1) (7pM)	0,0271 $\pm$ 0,0450 (4) (181pM)
5	15E10h	0,0391 $\pm$ 0,0207 (261pM)	0,0054 $\pm$ 0,0020 (5) (36pM)	Không trung hòa

Khi có mặt huyết thanh AB người 25% hoặc hoạt dịch người được góp 25%, (H0(huCDRH1)L1 và 15E10h vẫn giữ được khả năng trung hòa cả OSM người và khi cynomolgus (**Fig. 23**). Một số sự giảm mạnh hoạt tính được quan sát thấy khi có mặt huyết thanh AB 25% hoặc hoạt dịch được góp 25%. Điều này chủ yếu là do các chất nền này gây nhiễu kết quả đọc của xét nghiệm này. Các mức nền IL-6 được quan sát thấy trong thử nghiệm này cao hơn trong thử nghiệm bình thường.

Khác với 15E10h, H0(huCDRH1)L1 được chỉ ra là trung hòa OSM khi marmoset trong thử nghiệm trung hòa tế bào KB. Panel chứa 3 kháng thể người kháng OSM bổ sung, 10D3DLE, OM4.11.17 và OM4.11.31, cũng không còn khả năng trung hòa OSM khi marmoset.

Thử nghiệm OSM người nội sinh gp130:

Kháng thể mẹ của chuột 10G8, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ H0L1 của 10G8 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1 cũng như 15E10h ức chế OSM người nội sinh từ 4 kháng thể cho riêng biệt (**Fig. 24**). Từ các kết quả của 4 kháng thể hiển tằng này, có rất ít sự khác biệt giữa kháng thể mẹ H0L1 và các mAb H0(huCDRH1)L1; các kháng thể này được xếp hạng cao hơn kháng thể mẹ của chuột 10G8 và kháng thể khảm của nó (**bảng 18**). H0(huCDRH1)L1 có hiệu lực tăng gấp xấp xỉ 12 lần (1,09 log) so với 15E10h. OSM tự nhiên được tạo ra từ việc kích thích GM-CSF của bạch cầu trung tính của người khỏe mạnh.

Bảng 18: Thử nghiệm OSM người nội sinh gp130 – Tóm tắt 4 kháng thể hiển tằng của bạch cầu trung tính trong ELISA gp130 để đánh giá hoạt tính kháng OSM người nội sinh của kháng thể mẹ của chuột 10G8, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ H0L1 của 10G8 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể không liên quan được sử dụng làm đối chứng âm.

Xếp loại	mAb	IC50 $\mu\text{g/ml} \pm \text{Sd}$
1	H0L1	0,0058 $\pm$ 0,019 (39pM)
2	H0(huCDRH1)L1	0,0062 $\pm$ 0,0023 (41pM)
3	10G8	0,0090 $\pm$ 0,0020 (60pM)
4	10G8Ch	0,0091 $\pm$ 0,0004 (61pM)
5	15E10h	0,0760 $\pm$ 0,0181 (507pM)

Hoạt tính phản ứng LIF người (thử nghiệm trung hòa tế bào KB):

LIF người là thành viên có quan hệ gần nhất với OSM người của họ IL-6. Ba lần lặp lại thử nghiệm tế bào KB LIF người chỉ ra rằng kháng thể mẹ của chuột 10G8, kháng thể khảm 10G8, kháng thể mẹ H0L1 của 10G8 được làm tương thích với người (H0L1) và H0(huCDRH1)L1 hoặc 15E10h không trung hòa LIF người. 15E10h được bổ sung vào để so sánh. Kháng thể kháng LIF người đã có trên thị trường trung hòa LIF trong thử nghiệm này (**Fig. 25**). Điều này chứng minh rằng các kháng thể này là đặc hiệu OSM.

Thử nghiệm tế bào gan người sơ cấp:

Tế bào gan người sơ cấp là nhạy cảm với OSM và giải phóng các protein pha cấp tính, như SAA và CRP, đáp ứng với kích thích OSM. H0(huCDRH1)L1 ức chế sự giải phóng SAA (**Fig. 26**) và CRP (**Fig. 27**) được cảm ứng bởi OSM người trong các tế bào gan theo cách phụ thuộc liều từ 3 thể hiện tăng riêng biệt. 15E10 được làm tương thích với người được bổ sung vào để so sánh.

Các thử nghiệm tương đương được thực hiện bằng cách sử dụng các typ tế bào người sơ cấp khác. Các tế bào này bao gồm tế bào nội mô tĩnh mạch rốn người; tế bào hoạt dịch giống nguyên bào sợi người từ bệnh nhân bị bệnh viêm khớp dạng thấp; các nguyên bào sợi phổi người từ bệnh nhân xơ hóa phổi tự phát và người khỏe mạnh (số liệu không thể hiện). Như với các thử nghiệm trước đây, H0(huCDRH1)L1 thể hiện khả năng trung hòa OSM tốt hơn so với 15E10 được làm tương thích với người. Số lần khác biệt về hiệu lực giữa H0(huCDRH1)L1 và 15E10 được làm tương thích với người thay đổi phụ thuộc vào dòng tế bào và nồng độ OSM.

2.6 Mô tả sinh lý

Profin sinh lý cơ bản của H0(huCDRH1)L1 được thực hiện cùng với mAb mẹ H0L1 của 10G8 được làm tương thích với người. Các kháng thể được đưa vào thử nghiệm gây căng thẳng môi trường, như:

- Nhiệt độ, bằng cách ủ trong 14 ngày ở 4°C hoặc 37°C;
- 5 chu kỳ làm đông lạnh-làm tan;
- Khử amit bắt buộc, bằng cách ủ với amoni bicacbonat 1% ở 37°C trong 48 giờ.

Kháng thể không thể hiện sự mất khả năng biến đổi sinh lý hoặc mất hoạt tính sau thử nghiệm gây căng thẳng được đề cập trên đây.

2.6 Các kháng thể được làm tương thích với người biến đổi CDRH3

2. 6.1 Cấu trúc của các kháng thể được làm tương thích với người biến đổi CDRH3

Việc thay thế mỗi gốc của CDRH3 (SEQ ID NO:3) bằng gốc axit amin thay thế được thực hiện bằng cách sử dụng trình tự có chiều dài đầy đủ của H0 chuỗi nặng (IGHV3_23) SEQ ID NO. 75 (trình tự biến đổi: SEQ ID NO: 74) trên plasmit pTT (National Research Council Canada, với vị trí đa tách dòng biến đổi (Multiple Cloning Site: MCS)) làm phân tử bazơ. Kháng thể gây đột biến vị trí (site-directed mutagenesis technique: SDM) được sử dụng, nhờ đó các oligonucleotit được thiết kế mang trình tự NNK (N = A/T/G/C; K = G hoặc T) ở vị trí thế axit amin. Phản ứng mạch polymeraza (Polymerase chain reaction: PCR) được sử dụng để tạo ra các plasmit mới chứa thay đổi này, kỹ thuật giải trình tự ADN được sử dụng để xác định các dòng có thay đổi axit amin. Theo cách này, các biến thể được phân lập có từ 10 đến 17 axit amin khác nhau ở mỗi vị trí trong số 12 vị trí CDRH3. Các kháng thể biến đổi CDRH3 được sản xuất bằng cách đồng chuyển nhiễm các vector pTT chứa biến thể H0 (IGHV3_23) có chuỗi nhẹ L1 (SEQ ID NO: 72) và kiểm tra dịch nổi về khả năng liên kết.

164 biến thể CDRH3 được tạo ra và được kiểm tra trong phân tích tiếp theo (xem 2.6.2 và 2.6.3).

2.6.2 Biểu hiện biến thể CDRH3 trong tế bào HEK 293 6E

Các plasmid pTT mã hóa các biến thể (H0 (IGHV3_23)) CDRH3 chuỗi nặng và chuỗi nhẹ L1 được đồng chuyển nhiễm tạm thời vào các tế bào HEK 293 6E và được biểu hiện ở mức độ thấp để tạo ra kháng thể. Các kháng thể được đánh giá trực tiếp từ dịch nổi nuôi cấy mô.

2.6.3 Phân tích động học các dịch nổi nuôi cấy mô biến đổi CDRH3

Các phân tích động học ban đầu để sàng lọc CDRH3 được thực hiện trên ProteOn XPR36 (Biorad Laboratories) và một số dịch nổi được lựa chọn để phân tích động học chính xác hơn trên BiaCore T100.

Để phân tích ProteOn, kháng IgG người (GE Healthcare/Biacore BR-1008-39) được tạo cặp với chip GLM (Biorad Laboratories 176-5012) bằng cách tạo cặp amin bậc một. Các biến thể CDRH3 được bắt giữ trực tiếp lên bề mặt này và OSM người tái tổ hợp được chuyển qua bề mặt kháng thể bị giữ ở 256, 64, 16, 4 và 1nM, cùng với riêng việc tiêm đệm (nghĩa là, 0nM) được sử dụng để tham chiếu kép các đường cong liên kết. Sau hiện tượng liên kết OSM, bề mặt bắt giữ được tái tạo: với 3M $MgCl_2$, việc tái tạo này loại bỏ kháng thể bị giữ trước đó sẵn sàng cho chu kỳ bắt giữ khác và phân tích liên kết. Sau đó số liệu được lắp vào mô hình 1:1 (với sự truyền chất) có sẵn trong phần mềm phân tích ProteOn. Lần chạy này được thực hiện bằng cách sử dụng HBS-EP (Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69) và nhiệt độ phân tích là 25°C.

Phương pháp tương tự được sử dụng để phân tích các cấu trúc bằng cách sử dụng Biacore T100, kháng IgG người (GE Healthcare/Biacore BR-1008-39) được tạo cặp với chip CM5 (GE Healthcare/Biacore BR-1006-68) bằng cách tạo cặp amin bậc 1, các kháng thể được giữ trên bề mặt này và OSM người tái tổ hợp được chuyển qua bề mặt kháng thể bị giữ ở 256, 64,

16, 4 và 1nM, với riêng việc tiêm đậm (nghĩa là, 0nM) được sử dụng để tham chiếu đôi đường cong liên kết. Sự tái tạo là bằng cách sử dụng các xung chứa $MgCl_2$ 3M hoặc axit phosphoric 100mM hoặc sử dụng cả hai chất phản ứng. Số liệu được lắp vào mô hình 1:1 sẵn có trong phần mềm phân tích Biacore T100. Việc chạy được thực hiện bằng cách sử dụng HBS-EP (Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69) và nhiệt độ phân tích là 25°C.

Xem Fig. 33 cho các kết quả về số liệu liên kết.

Tóm tắt trình tự (Bảng A)

Mô tả	Trình tự axit amin	Trình tự polynucleotit
10G8 CDRH1	SEQ.I.D.NO:1	n/a
10G8 CDRH2	SEQ.I.D.NO:2	n/a
10G8 CDRH3	SEQ.I.D.NO:3	n/a
10G8 CDRL1	SEQ.I.D.NO:4	n/a
10G8 CDRL2	SEQ.I.D.NO:5	n/a
10G8 CDRL3	SEQ.I.D.NO:6	n/a
3E3 CDRH1	SEQ.I.D.NO:7	n/a
3E3 CDRH2	SEQ.I.D.NO:8	n/a
3E3 CDRH3	SEQ.I.D.NO:9	n/a
3E3 CDRL1	SEQ.I.D.NO:10	n/a
3E3 CDRL2	SEQ.I.D.NO:11	n/a
3E3 CDRL3	SEQ.I.D.NO:12	n/a
2B7 CDRH1	SEQ.I.D.NO:13	n/a
2B7 CDRH2	SEQ.I.D.NO:14	n/a
2B7 CDRH3	SEQ.I.D.NO:15	n/a
2B7 CDRL1	SEQ.I.D.NO:16	n/a
2B7 CDRL2	SEQ.I.D.NO:17	n/a
2B7 CDRL3	SEQ.I.D.NO:18	n/a
9G2 CDRH1	SEQ.I.D.NO:19	n/a
9G2 CDRH2	SEQ.I.D.NO:20	n/a
9G2 CDRH3	SEQ.I.D.NO:21	n/a

9G2 CDRL1	SEQ.I.D.NO:22	n/a
9G2 CDRL2	SEQ.I.D.NO:23	n/a
9G2 CDRL3	SEQ.I.D.NO:24	n/a
Vùng chức năng V _H 10G8 (chuột)	SEQ.I.D.NO:26	SEQ.I.D.NO:25
Vùng chức năng V _L 10G8 (chuột)	SEQ.I.D.NO:28	SEQ.I.D.NO:27
Vùng chức năng V _H 3E3 (chuột)	SEQ.I.D.NO:30	SEQ.I.D.NO:29
Vùng chức năng V _L 3E3 (chuột)	SEQ.I.D.NO:32	SEQ.I.D.NO:31
Vùng chức năng V _H 2B7 (chuột)	SEQ.I.D.NO:34	SEQ.I.D.NO:33
Vùng chức năng V _L 2B7 (chuột)	SEQ.I.D.NO:36	SEQ.I.D.NO:35
Vùng chức năng V _H 9G2 (chuột)	SEQ.I.D.NO:38	SEQ.I.D.NO:37
Vùng chức năng V _L 9G2 (chuột)	SEQ.I.D.NO:40	SEQ.I.D.NO:39
Vùng chức năng V _H 10G8 (thể khảm)	SEQ.I.D.NO:42	SEQ.I.D.NO:41
Vùng chức năng V _L 10G8 (thể khảm)	SEQ.I.D. NO:44	SEQ.I.D.NO:43
Vùng chức năng V _H 9G2 (thể khảm)	SEQ.I.D.NO:46	SEQ.I.D.NO:45
Vùng chức năng V _L 9G2 (thể khảm)	SEQ.I.D. NO:48	SEQ.I.D.NO:47
Trình tự nucleotit nhận dòng tinh chuỗi nặng người IGHV3_7	SEQ.I.D. NO:50	SEQ.I.D.NO:49
Trình tự nucleotit nhận dòng tinh chuỗi nhẹ biến đổi người IGKV4_1	SEQ.I.D. NO:52	SEQ.I.D.NO:51
H0 V _H được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D.NO:54	SEQ.I.D.NO:53
H1 V _H được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D.NO:56	SEQ.I.D.NO:55
H2 V _H được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D.NO:58	SEQ.I.D.NO:57
L0 V _L được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:60	SEQ.I.D.NO:59
L1 V _L được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:62	SEQ.I.D.NO:61
L2 V _L được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:64	SEQ.I.D.NO:63
L3 V _L được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa)	SEQ.I.D. NO:66	SEQ.I.D.NO:65

L4 VL được làm tương thích với người 10G8 (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:68	SEQ.I.D.NO:67
Chuỗi nặng H0 trưởng thành (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:70	SEQ.I.D.NO:69
Chuỗi nhẹ L1 trưởng thành (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:72	SEQ.I.D.NO:71
Biến thể VH được làm tương thích với người H0 (IGHV3_23 CDRH1) (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:74	SEQ.I.D.NO:73
Chuỗi nặng H0 (IGHV3_23 CDRH1) trưởng thành (trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon)	SEQ.I.D. NO:76	SEQ.I.D.NO:75
Dòng tinh chuỗi nặng người IGHV3_23 CDRH1	SEQ.I.D. NO:77	n/a
Dòng tinh chuỗi nhẹ của người IGKV1_5 CDRL2	SEQ.I.D. NO:78	n/a
Chuỗi nặng 15E10h	SEQ.I.D.NO:79	n/a
Chuỗi nhẹ 15E10h	SEQ.I.D.NO:80	n/a
B3 VH được làm tương thích với người 15E10	SEQ.I.D.NO:81	n/a
L2 VL được làm tương thích với người 15E10	SEQ.I.D.NO:82	n/a
OSM người	SEQ.I.D.NO:84	SEQ.I.D.NO:83

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể liên kết đặc hiệu với Oncostatin M (OSM) và ngăn cản sự liên kết của OSM với thụ thể gp130 mà không tương tác trực tiếp với các gốc của vị trí II và trong đó kháng thể này chứa CDRH3 của SEQ ID NO.3 hoặc biến thể của SEQ ID NO.3 trong đó

Vị trí 98 được thế bằng Leu, và trong đó kháng thể này chứa:

- i) CDRH2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 2
- ii) CDRL1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 4 và
- iii) CDRL3 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 6:

và trong đó kháng thể này liên kết với cả OSM của khỉ Marmoset và OSM người với ái lực mạnh hơn 1nM khi được đo bằng Biacore hoặc kinexa.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này không liên kết trực tiếp với bất kỳ một trong số các gốc Q20, G120, Q16, N124.

3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó kháng thể này tương tác với một hoặc nhiều gốc 82, 83, 84, 90, 94, 112, 115, 122, 123, 152 của OSM người.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này còn chứa thêm:

- i) CDRH1 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO:77 và
- ii) CDRL2 như được chỉ ra trong SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ IN NO:78.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này không tương tác trực tiếp qua CDRH1 hoặc CDRL2 với OSM.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này còn chứa vùng biến đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi SEQ. ID. NO:73 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi SEQ. ID. NO:61.

7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này còn chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ. ID. NO:74 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ. ID. NO:62.

8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này còn chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ. ID. NO:76 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ. ID. NO:72.
9. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.
10. Kháng thể theo điểm 9, trong đó kháng thể này là IgG1.
11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó khi được liên kết với OSM, đồng tinh thể chứa ô đơn vị có các chiều là khoảng $a=168,525 \text{ \AA}$, $b=81,614 \text{ \AA}$, $c=55,540 \text{ \AA}$ và $\beta=106,60^\circ$.
12. Tế bào chủ tái tổ hợp, được biến nạp, chuyển nhiễm, hoặc được tải nạp chứa ít nhất một caset biểu hiện, trong đó caset biểu hiện này chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể theo điểm 8 và còn chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm 8.
13. Tế bào chủ theo điểm 12, trong đó tế bào này là thuộc loài động vật có vú.
14. Tế bào chủ theo điểm 13, trong đó tế bào này là CHO hoặc NSO.
15. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên và chất mang dược dụng.

Danh mục trình tự**SEQ ID NO: 1 10G8 CDRH1**

NYAMS

SEQ ID NO: 2 10G8 CDRH2

TISDGGSFYYLDNVRG

SEQ ID NO: 3 10G8 CDRH3

DVGHTTFWYFDV

SEQ ID NO: 4 10G8 CDRL1

RASKSVSAAGYNFMH

SEQ ID NO: 5 10G8 CDRL2

YASNLES

SEQ ID NO: 6 10G8 CDRL3

LHSREFPFT

SEQ ID NO: 7 3E3 CDRH1

SYAMS

SEQ ID NO: 8 3E3 CDRH2

TISDGGSFYYFANIQG

SEQ ID NO: 9 3E3 CDRH3

DVGLTTFWYFDV

SEQ ID NO: 10 3E3 CDRL1

RASKSVSPSGYDFMH

SEQ ID NO: 11 3E3 CDRL2

YASELES

SEQ ID NO: 12 3E3 CDRL3

QHSREFPFT

SEQ ID NO: 13 2B7 CDRH1

NYAMS

SEQ ID NO: 14 2B7 CDRH2

TISDGGGYTYLDNGQG

SEQ ID NO: 15 2B7 CDRH3

DVGLTTFWYFDV

SEQ ID NO: 16 2B7 CDRL1

RASKSVSPSSYNFMH

SEQ ID NO: 17 2B7 CDRL2

YASNLES

SEQ ID NO: 18 2B7 CDRL3

QHSREFPFT

SEQ ID NO: 19 9G2 CDRH1

NYAMS

SEQ ID NO: 20 9G2 CDRH2

TISDGGSFYYLDNVKG

SEQ ID NO: 21 9G2 CDRH3

DVGHTTFWYFDV

SEQ ID NO: 22 9G2 CDRL1

RASKSVSASGYNFMH

SEQ ID NO: 23 9G2 CDRL2

YASNLES

SEQ ID NO: 24 9G2 CDRL3

QHSREFPFT

SEQ ID NO: 25 Trình tự nucleotit V_H 10G8

GAAATGCAACTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGGAGCCT
GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT
CAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAG
AGCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCA
CCTACTATCTAGACAATGTAAGGGGCCGATTCACCATCTCCAG
AGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATTTG
AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGG
GACATACTACCTTTTGGTACTTCGATGTCTGGGGCTCAGGGAC
CGCGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 26 Trình tự axit amin V_H 10G8

EMQLVESGEGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKS
LEWVATISDGGSTYYLDNVRGRFTISRDNAKNNLYLQMSHLKS
DDTAMYYCARDVGHTTFWYFDVWGSGTAVTVSS

SEQ ID NO: 27 Trình tự nucleotit V_L 10G8

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTGTATCTCT
 GGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGTAGGGCCAGCAAAAGTGT
 CAGTGCAGCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAAA
 CCAGGACAGCCGCCCAAAGTCCTCATCAAGTATGCATCCAACC
 TAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGAT
 GCTGTAACATATTACTGTCTGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTCA
 CGTTCGGAGGGGGGACCAACCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO: 28 Trình tự axit amin V_L 10G8

DIVLTQSPVFLVVS LGQRATISCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
 GQPPKVLIK YASNLESGV PARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAVTY
 YCLHSREFPFTFGGGTNLEIK

SEQ ID NO: 29 Trình tự nucleotit V_H 3E3

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAACCT
 GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGTACCCTCTGGATTCACTTT
 CAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAG
 AGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCA
 CCTACTATTTTGCCAATATACAGGGCCGATTCACCATCTCCAG
 AGACAATACCAAGAACAACCTATACCTGCAAATGAACCATCTG
 AAGTCTGAGGACGCAGGCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGG
 GCCTTACTACGTTTTGGTATTTTCGATGTCTGGGGCACAGGGAC
 CACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 30 Trình tự axit amin V_H 3E3

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCVPSGFTFSSYAMSWVRQTPEKRL
 EWVATISDGGSTYYFANIQGRFTISRDNTKNNLYLQMNHLKSED
 AGMYYCARDVGLTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO: 31 Trình tự nucleotit V_L 3E3

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAACTATATCTCT
 GGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGT
 CAGTCCATCTGGCTATGATTTTCATGCACTGGTATCAACAGAAG
 CCAGGACAGCCGCCCAAACCTCATCAAGTATGCATCCGAAC
 TAGAATCTGGGGTCCCTGGCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGATTTACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAAGAAGAT
 GCTGCAACATATTTCTGTTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTCA
 CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO: 32 Trình tự axit amin V_L 3E3

DIVLTQSPASLTISLGQRATISCRASKSVSPSGYDFMHWYQQKPGQ
 PPKLLIKYASELESGVPGRFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYFC
 QHSREFPFTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 33 Trình tự nucleotit V_H 2B7

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAACCT
 GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT
 CAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAG
 AGGCTGGAGTGGGTCGCGACCATTAGTGATGGTGGTGGTTACA
 CCTACTATTTAGACAATGGACAGGGCCGATTCACCATCTCCAG

AGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAGCCATCTG
 AAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGG
 GACTTACTACGTTTTTGGTACTTCGATGTCTGGGGGCACAGGGAC
 CACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 34 Trình tự axit amin V_H 2B7

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKR
 LEWVATISDGGGYTYYL DNGQGRFTISRDNKNNLYLQMSHLKS
 EDTAMYYCARDVGLTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO: 35 Trình tự nucleotit V_L 2B7

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTCCTTAGTTATATCTCT
 GGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGT
 CAGTCCATCTAGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAGA
 CCAGGACAGCCGCCCAAACCTCCTCATCACGTATGCTTCCAACC
 TAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAAGAGGAT
 GCTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTCA
 CGTTCGGAGGGGGGGACCAGGCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO: 36 Trình tự axit amin V_L 2B7

DIVLTQSPVSLVISLGQRATISCRASKSVSPSSYNFMHWYQQRPGQ
 PPKLLITYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC
 QHSREFPFTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 37 Trình tự nucleotit V_H 9G2

GAAGTACAAC TAGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGGAGCCT
 GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT
 CAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAG
 AGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCA
 CCTACTATCTAGACAATGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAG
 AGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATTTG
 AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGG
 GACATACTACGTTTTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGAC
 CACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 38 Trình tự axit amin V_H 9G2

EVQLVESGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKR
 LEWVATISDGSFTYYLDNVKGRFTISRDNKNNLYLQMSHLKS
 DDTAMYYCARDVGHTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO: 39 Trình tự nucleotit V_L 9G2

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTATATCTCT
 GGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGT
 CAGTGCATCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAAA
 CCAGGACAGCCGCCCAAAGTCCTCATCAAGTATGCATCCAACC
 TAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGAT
 GCTGTAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTCA
 CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

SEQ ID NO: 40 Trình tự axit amin V_L 9G2

DIVLTQSPVFLVISLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPG
 QPPKVLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAVTY
 CQHSREFPFTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:41 Trình tự nucleotit khảm V_H 10G8

GAAATGCAACTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGGAGCCT
 GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT
 CAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAAAG
 AGCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCA
 CCTACTATCTAGACAATGTAAGGGGCCGATTCACCATCTCCAG
 AGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATTTG
 AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGG
 GACATACTACCTTTTGGTACTTCGATGTCTGGGGCTCAGGGAC
 ACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTG
 TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA
 GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
 CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGACCCAG
 ACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG
 GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCAC
 ACCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCA
 GCGTGTTCTGTTCCTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGAT
 CAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGC
 CACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
 GTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAG
 TACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC

ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGT
 CCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAA
 GGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC
 CCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
 TGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCC
 CCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAA
 GCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT
 CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
 CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 42 Trình tự axit amin khảm V_H 10G8

EMQLVESGEGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKS
 LEWVATISDGGSTYYLDNVRGRFTISRDNANKNNLYLQMSHLKS
 DDTAMYCYCARDVGHTTFWYFDVWGSGLVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO: 43 Trình tự nucleotit khảm V_L 10G8

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTGTATCTCT
 GGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGTAGGGCCAGCAAAAGTGT

CAGTGCAGCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAAA
 CCAGGACAGCCGCCCAAAGTCCTCATCAAGTATGCATCCAACC
 TAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGAT
 GCTGTAACATATTACTGTCTGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTCA
 CGTTCGGAGGGGGGACCAACCTGGAAATAAAACGTACGGTGG
 CCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCT
 GAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTC
 TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCC
 CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGAC
 AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGA
 GCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGG
 TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAA
 CCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 44 Trình tự axit amin khảm V_L 10G8

DIVLTQSPVFLVVSLGQRATISCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
 GQPPKVLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAVTY
 YCLHSREFPFTFGGGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
 CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
 TLTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 45 Trình tự nucleotit khảm V_H 9G2

GAAGTACAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGGAGCCT
 GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT
 CAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAAG
 AGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCA

CCTACTATCTAGACAATGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG
AGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATTTG
AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGG
GACATACTACGTTTTTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGAC
ACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTG
TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA
GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTG
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGGCACCAG
ACCTACATCTGTAAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCAC
ACCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCA
GCGTGTTCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCT
CAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGC
CACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC
ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGT
CCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAA
GGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC
CCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC
TGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCC
CCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAA
GCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTT
CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO: 46 Trình tự axit amin khảm V_H 9G2

EVQLVESGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKR
 LEWVATISDGGSFYYLDNVKGRFTISRDNANKNNLYLQMSHLKS
 DDTAMYYCARDVGHTTFWYFDVWGTGTLVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO: 47 Trình tự nucleotit khảm V_L 9G2

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTATATCTCT
 GGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAGGGCCAGCAAAAGTGT
 CAGTGCATCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAAA
 CCAGGACAGCCGCCCAAAGTCCTCATCAAGTATGCATCCAACC
 TAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGAT
 GCTGTAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTCA
 CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTACGGTGG
 CCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCT
 GAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTC
 TACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCC
 CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGAC
 AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA

GCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGG
TGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAA
CCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO: 48 Trình tự axit amin khảm V_L 9G2

DIVLTQSPVFLVISLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPG
QPPKVLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAVTYY
CQHSREFPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSST
LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:49 Trình tự nucleotit nhận dòng tinh V_H người
IGHV3_7

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG
GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT
AGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAG
AAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA
GAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

SEQ ID NO:50 Trình tự axit amin nhận dòng tinh V_H người
IGHV3_7

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKG
LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAR

SEQ ID NO:51 Trình tự nucleotit nhận dòng tinh V_L người
IGKV4_1

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCT
GGGCGAGAGGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGT
TTTATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAG
CAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCAT
CTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGG
GTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCT
GAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT

SEQ ID NO:52 Trình tự axit amin nhận dòng tinh V_L người
IGKV4_1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQ
KPGQPPKLLIYWASTRESGVLPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA
VYYCQQYYST

SEQ ID NO:53 Trình tự nucleotit H0 V_H được làm tương thích với
người 10G8 được tối ưu hóa codon

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTCCAGCCC
GGCGGGAGCCTGAGACTCTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCT
TCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA
AGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCT
TCACCTACTATCTGGACAACGTGAGGGGCAGGTTACCATCAG
CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG
CCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAC
GTCGGCCACACCACCTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGG
GCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:54 Trình tự axit amin H0 V_H được làm tương thích với người 10G8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKG
LEWVATISDGGSTFTYYLDNVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGTLVTSS

SEQ ID NO:55 Trình tự nucleotit H1 V_H được làm tương thích với người 10G8 – được tối ưu hóa codon

GAGATGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTCCAGCCC
GGCGGGAGCCTGAGACTCTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCT
TCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA
AGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCT
TCACCTACTATCTGGACAACGTGAGGGGCAGGTTCACCATCAG
CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG
CCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAC
GTCGGCCACACCACCTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGG
GCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:56 Trình tự axit amin H1 V_H được làm tương thích với người 10G8

EMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGK
GLEWVATISDGGSTFTYYLDNVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR
AEDTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGTLVTSS

SEQ ID NO:57 Trình tự nucleotit H2 V_H được làm tương thích với người 10G8 – được tối ưu hóa codon

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCC
GGCGGGAGCCTGAGACTCTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCT
TCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA
AGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCT
TCACCTACTATCTGGACAACGTGAGGGGCAGGTTACCATCAG
CAGGGACAACGCCAAGAAGAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG
CCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAC
GTCGGCCACACCACCTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCTCCG
GCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:58 Trình tự axit amin H2 V_H được làm tương thích với người 10G8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKG
LEWVATISDGGSTFTYYLDNVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGSGTLVTVSS

SEQ ID NO:59 Trình tự nucleotit L0 V_L được làm tương thích với người 10G8 – được tối ưu hóa codon

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCC
TGGGCGAAAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCG
TGAGCGCTGCCGGCTACAACTTCATGCACTGGTACCAGCAGAA
GCCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAAC
CTGGAGAGCGGCGTGCCAGACAGGTTTCAGCGGATCTGGCAGC
GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCCGAGG
ACGTCGCCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCCTT
CACCTTTGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:60 Trình tự axit amin L0 V_L được làm tương thích với người 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
GQPPKLLIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY
YCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:61 Trình tự nucleotit L1 V_L được làm tương thích với người 10G8 – được tối ưu hóa codon

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCC
TGGGCGAAAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCG
TGAGCGCTGCCGGCTACAACTTCATGCACTGGTACCAGCAGAA
GCCCCGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAAC
CTGGAGAGCGGCGTGCCAGACAGGTTTCAGCGGATCTGGCAGC
GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCCGAGG
ACGTCGCCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTCCCCCTT
CACCTTTGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:62 Trình tự axit amin L1 V_L được làm tương thích với người 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
GQPPKVLIIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY
YCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:63 Trình tự nucleotit L2 V_L được làm tương thích với người 10G8 – được tối ưu hóa codon

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCC
TGGGCGAAAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCG
TGAGCGCTGCCGGCTACAACTTCATGCACTGGTACCAGCAGAA

GCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAAC
 CTGGAGAGCGGCGTGCCAGACAGGTTTCAGCGGATCTGGCAGC
 GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCCGAGG
 ACGTCGTGGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCCTT
 CACCTTTGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:64 Trình tự axit amin L2 V_L được làm tương thích
 với người 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
 GQPPKLLIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVVVY
 YCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:65 Trình tự nucleotit L3 V_L được làm tương thích với
 người 10G8 - được tối ưu hóa codon

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCC
 TGGGCGAAAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCG
 TGAGCGCTGCCGGCTACAACTTCATGCACTGGTACCAGCAGAA
 GCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAAC
 CTGGAGAGCGGCGTGCCAGACAGGTTTCAGCGGATCTGGCAGC
 GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCCGAGG
 ACGTCGCCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCCTT
 CACCTTTGGCGGGCGGCACCAACGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:66 Trình tự axit amin L3 V_L được làm tương thích với
 người 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
 GQPPKLLIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY
 YCLHSREFPFTFGGGTNVEIK

SEQ ID NO:67 Trình tự nucleotit L4 V_L được làm tương thích với
 người 10G8 -được tối ưu hóa codon

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCC
 TGGGCGAAAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCG
 TGAGCGCTGCCGGCTACAACCTCATGCACTGGTACCAGCAGAA
 GCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAAC
 CTGGAGAGCGGCGTGCCAGACAGGTTTCAGCGGATCTGGCAGC
 GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCCGAGG
 ACGTCGTGGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCCTT
 CACCTTTGGCGGGCGGCACCAACGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:68 Trình tự axit amin L4 V_L được làm tương thích với
 người 10G8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
 GQPPKVLIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVVVY
 YCLHSREFPFTFGGGTNVEIK

SEQ ID NO:69 Trình tự nucleotit chuỗi nặng H0 trưởng thành -được
 tối ưu hóa codon

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTCCAGCCC
 GGCGGGAGCCTGAGACTCTTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCT
 TCAGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA

AGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCT
TCACCTACTATCTGGACAACGTGAGGGGCAGGTTACCATCAG
CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG
CCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAC
GTCGGCCACACCACCTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGG
GCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCA
GCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG
CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA
GCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCA
CCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGAC
CCACACCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGC
CCCAGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGT
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGT
GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAG
GTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCA
GCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCC
TGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT
GACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACC
ACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACA
GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACG
TGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTA
CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO:70 Trình tự axit amin chuỗi nặng H0 trưởng thành

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKG
LEWVATISDGGSTYYLDNVRGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

**SEQ ID NO:71 Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ L1 trưởng thành -
được tối ưu hóa codon**

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCC
TGGGCGAAAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCAAGAGCG
TGAGCGCTGCCGGCTACAACTTCATGCACTGGTACCAGCAGAA
GCCCCGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAAC
CTGGAGAGCGGCGTGCCAGACAGGTTTCAGCGGATCTGGCAGC
GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCCGAGG
ACGTCGCCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTTCCCCTT
CACCTTTGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGT
GGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAAC
TCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATG

CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGG
 ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCT
 GAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGA
 GGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC
 AACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:72 Trình tự axit amin chuỗi nhẹ L1 trưởng thành

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKP
 GQPPKVLIIYYASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY
 YCLHSREFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:73 Trình tự nucleotit H0 (IGHV3_23 CDRH1) biến
 đổi V_H được làm tương thích với người được tối ưu hóa codon

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTCCAGCCC
 GGCGGGAGCCTGAGACTCTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCT
 TCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA
 AGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCT
 TCACCTACTATCTGGACAACGTGAGGGGCAGGTTCACCATCAG
 CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG
 CCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAC
 GTCGGCCACACCACCTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGG
 GCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:74 Trình tự axit amin H0 (IGHV3_23 CDRH1) biến
 đổi V_H được làm tương thích với người

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG
LEWVATISDGGSTFTYYLDNVRGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGTLVTVSS

SEQ ID NO:75 Trình tự nucleotit chuỗi nặng H0 (IGHV3_23
CDRH1) trưởng thành - được tối ưu hóa codon

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTCCAGCCC
GGCGGGAGCCTGAGACTCTCTTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCT
TCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCA
AGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCT
TCACCTACTATCTGGACAACGTGAGGGGCAGGTTACCATCAG
CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACAG
CCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAC
GTCGGCCACACCACCTTCTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGG
GCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCA
GCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGG
CACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA
GCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCA
CCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGAC
CCACACCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGC
CCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGA
TGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGT
GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGA

GCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG
 CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAG
 GTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCA
 GCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCC
 TGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCT
 GACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACC
 ACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACA
 GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACG
 TGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTA
 CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO:76 Trình tự axit amin chuỗi nặng H0 (IGHV3_23
 CDRH1) trưởng thành

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG
 LEWVATISDGGSTYYLDNVRGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE
 DTAVYYCARDVGHTTFWYFDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
 CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

SEQ ID NO:77 IGHV3_23 CDRH1 dòng tinh chuỗi nặng của
 người

SYAMS

SEQ ID NO:78 IGKV1_5 CDRL2 dòng tinh chuỗi nhẹ của người

KASSLES

SEQ ID NO: 79 Trình tự axit amin chuỗi nặng được làm tương thích với người 15E10:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGK
GLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMSHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID NO: 80 Trình tự axit amin chuỗi nhẹ được làm tương thích với người 15E10:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRL
LIEDTSNLAGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWS
SYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 81 VH B3 được làm tương thích với người 15E10

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGK
GLEWVAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFDVWGRGTLV (TVSS)

SEQ ID NO: 82 L2 VL được làm tương thích với người 15E10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRL
LIEDTSNLA SGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWS
SYPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 83 Trình tự polynucleotit OSM người

ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCC
TTGCACTC
CTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCT
CGAAAGAG
TACCGCGTGCTCCTTGGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCA
TGCAGGAC
ACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGG
ATGTTTCCT
AAACTGAGAGAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGGCCTTCCCC
AGTGAGGAG
ACCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCCTGCAGACCCTCA
ATGCCACA
CTGGGCTGCGTCCTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGCC
TCCCCAAG
GCCCAGGATTTGGAGAGGTCTGGGCTGAACATCGAGGACTTGG
AGAAGCTG
CAGATGGCGAGGCCGAACATCCTCGGGCTCAGGAACAACATC
TACTGCATG

GCCCAGCTGCTGGACAACTCAGACACGGCTGAGCCCACGAAG
 GCTGGCCGG
 GGGGCCTCTCAGCCGCCACCCCCACCCCTGCCTCGGATGCTT
 TTCAGCGC
 AAGCTGGAGGGGCTGCAGGTTCTGCATGGCTACCATCGCTTCA
 TGCACTCA
 GTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCGAACCGG
 AGCCGGAGA
 CACAGCCCCCACCAGGCCCTGAGGAAGGGGGTGCGCAGGACC
 AGACCCTCC
 AGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGG
 TAG

SEQ ID NO: 84 **Trình tự axit amin OSM người**

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQK
 QTDLMQD
 TSRLDPYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQ
 TLNAT
 LGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLR
 NNIYCM
 AQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGY
 HRFMHS
 VGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRK GKRLMTRG
 QLPR

Fig. 1: ELISA gp130 người

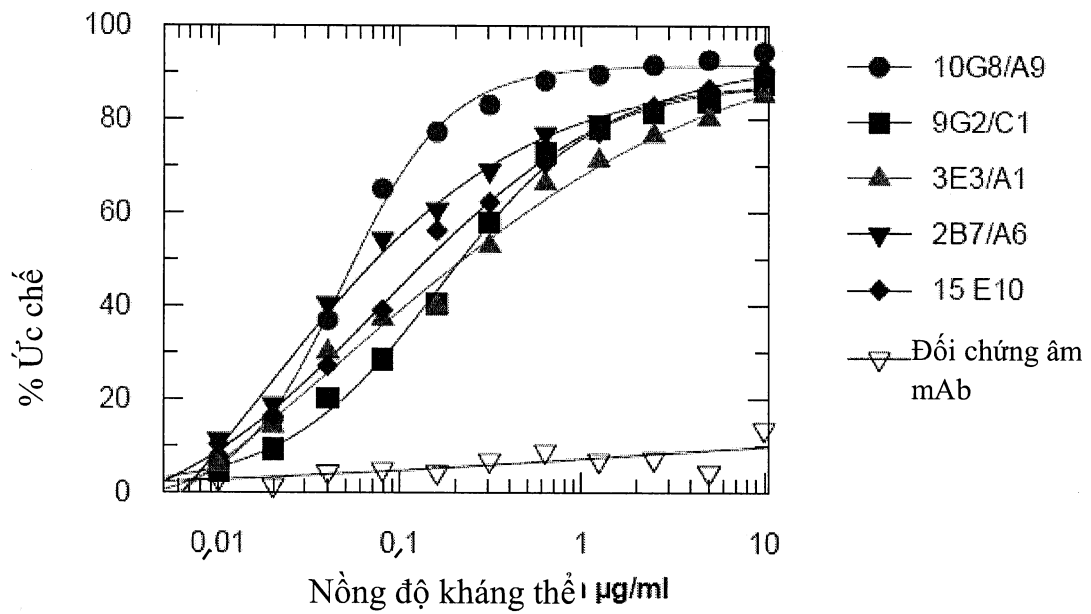


Fig. 2: Thử nghiệm tế bào KB

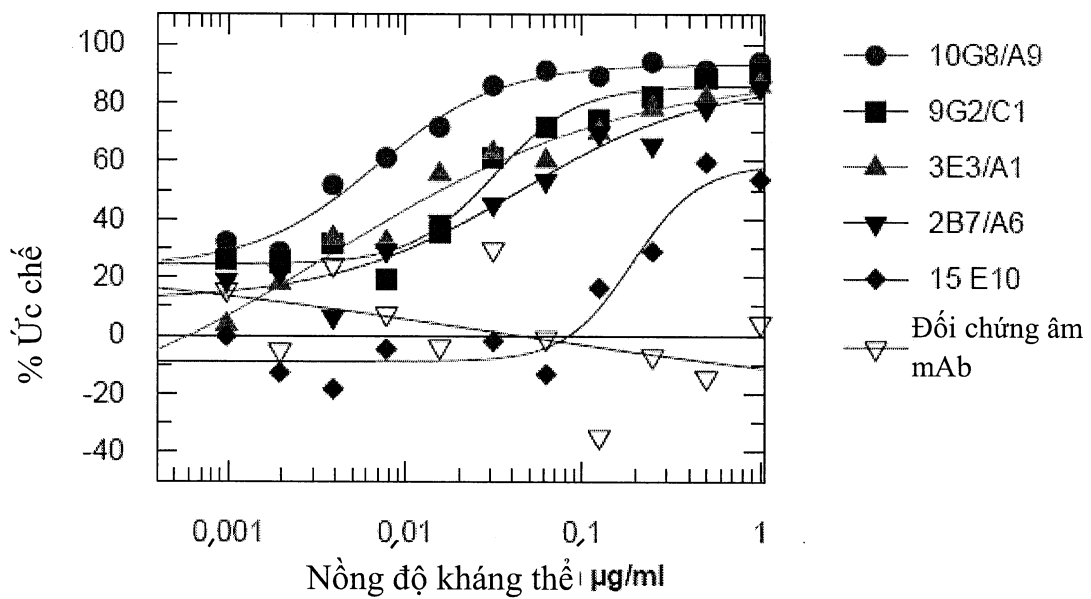


Fig. 3: Thử nghiệm tế bào KB

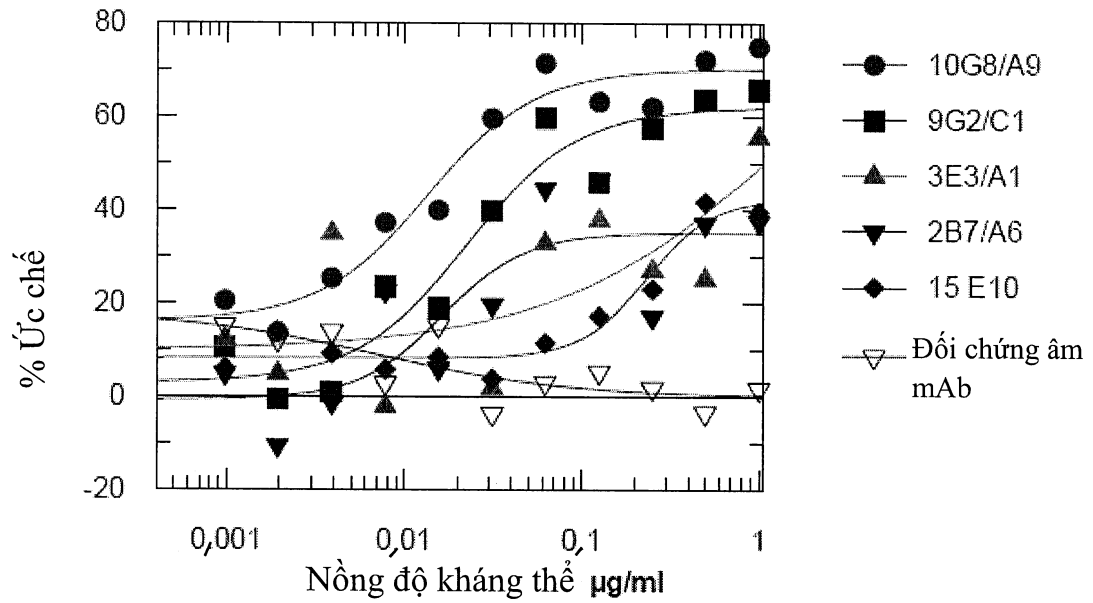


Fig. 4: Thử nghiệm gp130 người của OSM nội sinh

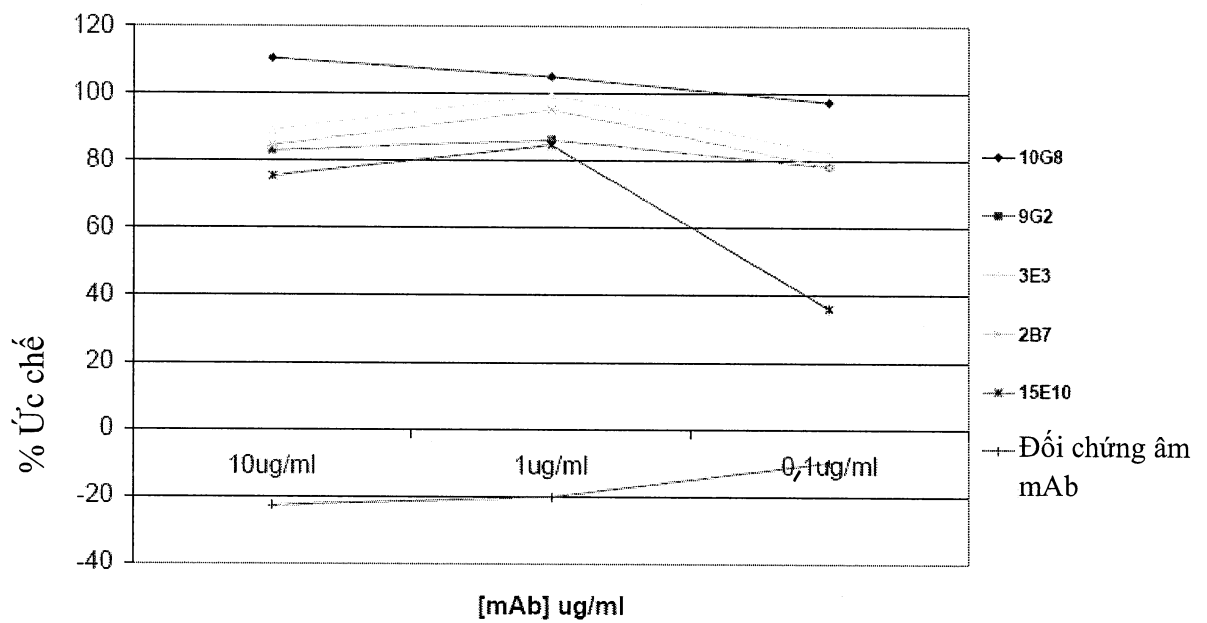


Fig. 5: Thử nghiệm tế bào KB

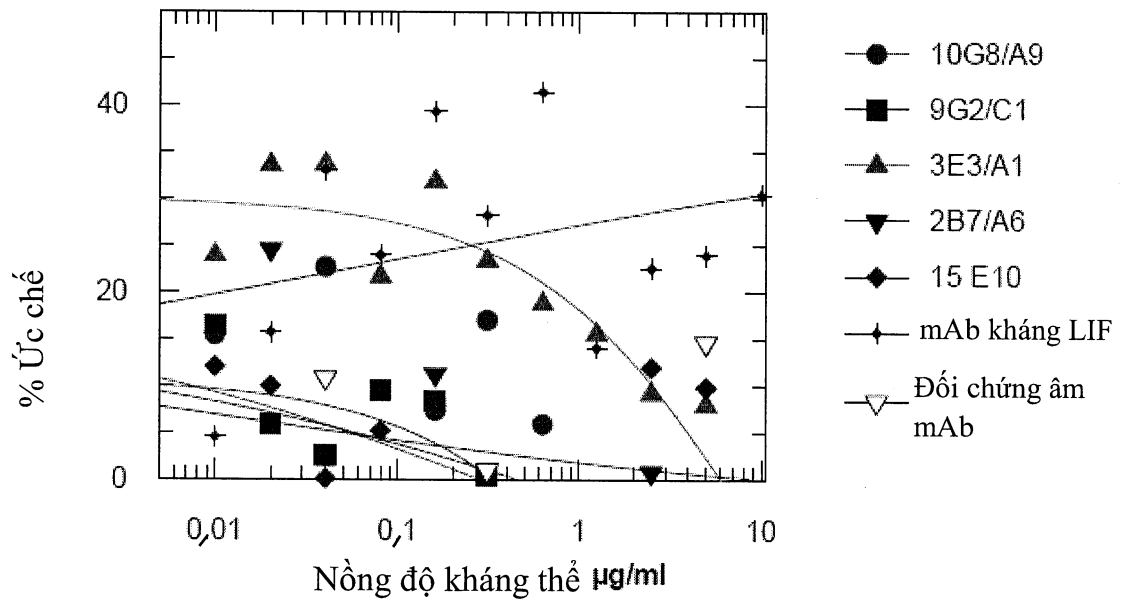


Fig. 6: Thử nghiệm tế bào KB

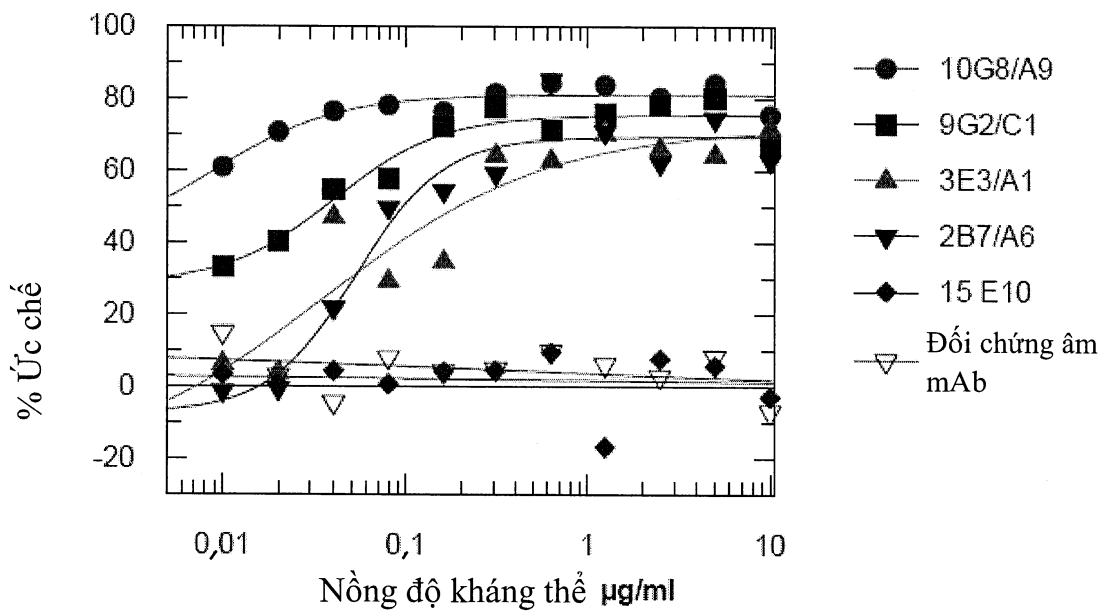


Fig. 7

	E V Q L V E S G G G L V E P G G S L K L S C A A S G F T F S	Majority
	102030	
1	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S	2B7 VH protein
1	E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S	3E3 VH protein
1	E V Q L V E S G G G L V E P G G S L K L S C A A S G F T F S	9G2 VH protein
1	E M Q L V E S G E G L V E P G G S L K L S C A A S G F T F S	10G8 VH protei
	N Y A M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S D G G S F T Y Y	Majority
	405060	
31	N Y A M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S D G G S F T Y Y	2B7 VH protein
31	S Y A M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S D G G S F T Y Y	3E3 VH protein
31	N Y A M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S D G G S F T Y Y	9G2 VH protein
31	N Y A M S W V R Q T P E K S L E W V A T I S D G G S F T Y Y	10G8 VH protei
	L D N V Q G R F T I S R D N A K N N L Y L Q M S H L K S D D	Majority
	708090	
61	L D N G Q G R F T I S R D N A K N N L Y L Q M S H L K S E D	2B7 VH protein
61	F A N I Q G R F T I S R D N T K N N L Y L Q M N H L K S E D	3E3 VH protein
61	L D N V K G R F T I S R D N A K N N L Y L Q M S H L K S D D	9G2 VH protein
61	L D N V R G R F T I S R D N A K N N L Y L Q M S H L K S D D	10G8 VH protei
	T A M Y Y C A R D V G L T T F W Y F D V W G T G T V T V S	Majority
	100110120	
91	T A M Y Y C A R D V G L T T F W Y F D V W G T G T V T V S	2B7 VH protein
91	A G M Y Y C A R D V G L T T F W Y F D V W G T G T V T V S	3E3 VH protein
91	T A M Y Y C A R D V G H T T F W Y F D V W G T G T V T V S	9G2 VH protein
91	T A M Y Y C A R D V G H T T F W Y F D V W G S G T A V T V S	10G8 VH protei
	S	Majority
121	S	2B7 VH protein
121	S	3E3 VH protein
121	S	9G2 VH protein
121	S	10G8 VH protei

Decoration 'Decoration #1' Các gốc đóng khung khác với trình tự bảo thủ

Fig. 8

	D I V L T Q S P V S L V I S L G Q R A T I S C R A S K S V S	Majority
	102030	
1	D I V L T Q S P V S L V I S L G Q R A T I S C R A S K S V S	2B7 VL proteir
1	D I V L T Q S P A S L T I S L G Q R A T I S C R A S K S V S	3E3 VL proteir
1	D I V L T Q S P V F L V I S L G Q R A T I S C R A S K S V S	9G2 VL proteir
1	D I V L T Q S P V F L V I S L G Q R A T I S C R A S K S V S	10G8 VL protei
	A S G Y N F M H W Y Q Q K P G Q P P K V L I K Y A S N L E S	Majority
	405060	
31	P S S Y N F M H W Y Q Q R P G Q P P K L L I T Y A S N L E S	2B7 VL proteir
31	P S G Y D F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I K Y A S E L E S	3E3 VL proteir
31	A S G Y N F M H W Y Q Q K P G Q P P K V L I K Y A S N L E S	9G2 VL proteir
31	A A G Y N F M H W Y Q Q K P G Q P P K V L I K Y A S N L E S	10G8 VL protei
	G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y	Majority
	708090	
61	G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y	2B7 VL proteir
61	G V P G R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y	3E3 VL proteir
61	G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y	9G2 VL proteir
61	G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A V T Y	10G8 VL protei
	Y C Q H S R E F P F T F G G G T K L E I K	Majority
	100110	
91	Y C Q H S R E F P F T F G G G T R L E I K	2B7 VL proteir
91	F C Q H S R E F P F T F G G G T K L E I K	3E3 VL proteir
91	Y C Q H S R E F P F T F G G G T K L E I K	9G2 VL proteir
91	Y C L H S R E F P F T F G G G T N L E I K	10G8 VL protei

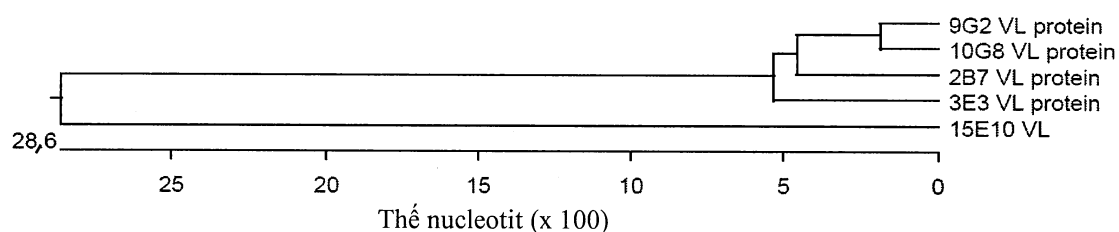
Decoration 'Decoration #1': Các gốc đóng khung khác với trình tự bảo thủ

Fig. 9

Cây phả hệ của các back up VH so với 15E10 VL.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)

10 tháng 12, 2007 17:24

Trang



Khoảng cách cặp trình tự của các back up VH so với 15E10 VL.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)

10 tháng 12, 2007 17:24

	1	2	3	4	5	
1		59,4	58,5	59,4	57,5	1
2	55,8		91,0	92,8	90,1	2
3	57,7	9,6		91,0	87,4	3
4	55,8	7,6	9,6		96,4	4
5	59,7	10,7	13,8	3,7		5
	1	2	3	4	5	

Sự phân kỳ

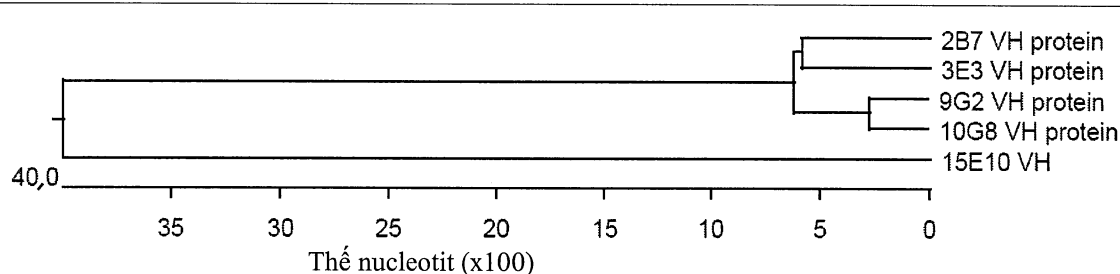
15E10 VL
2B7 VL protein
3E3 VL protein
9G2 VL protein
10G8 VL protein

Fig. 10

Cây phả hệ của các back up VH so với 15E10 VH.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)

10 tháng 12, 2007 17:16

F



Khoảng cách cặp trình tự của back up VH so với 15E10 VH.meg ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet)

10 tháng 12, 2007 17:16

	1	2	3	4	5	
1		49,2	48,3	50,8	48,3	1
2	79,9		89,3	94,2	90,1	2
3	82,1	11,6		87,6	83,5	3
4	75,5	6,0	13,6		95,0	4
5	82,1	10,7	18,7	5,1		5
	1	2	3	4	5	

Sự phân kỳ

Tỉ lệ phần trăm tương đồng

15E10 VH
2B7 VH protein
3E3 VH protein
9G2 VH protein
10G8 VH protein

Fig. 11: ELISA liên kết với OSM người trực tiếp

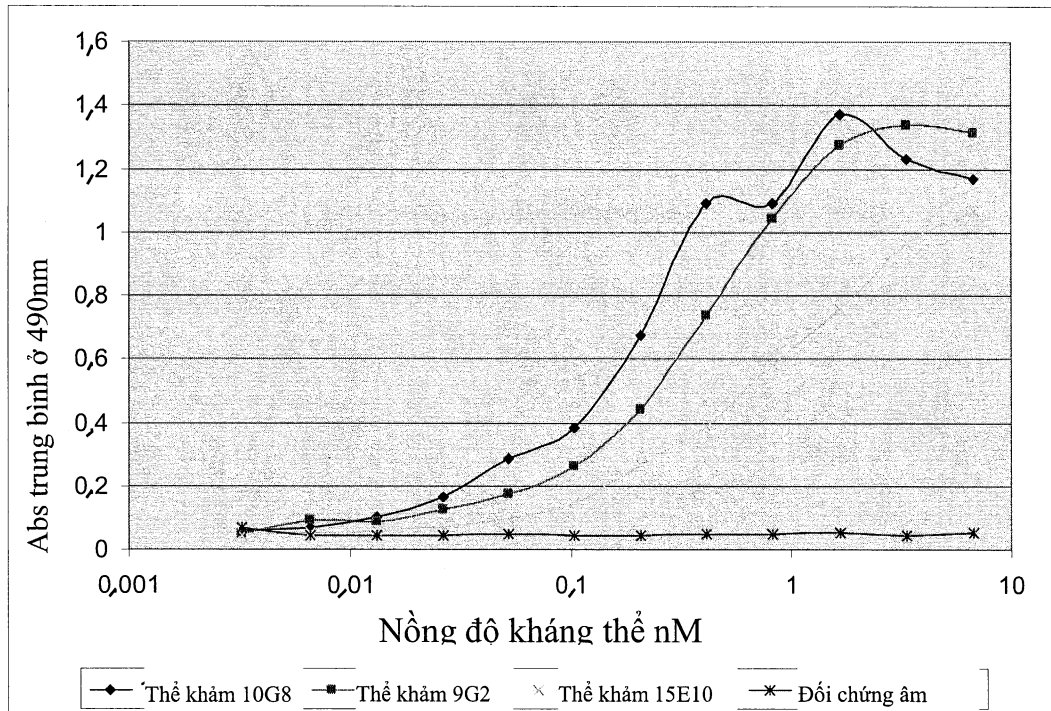


Fig. 12: ELISA gp130 người

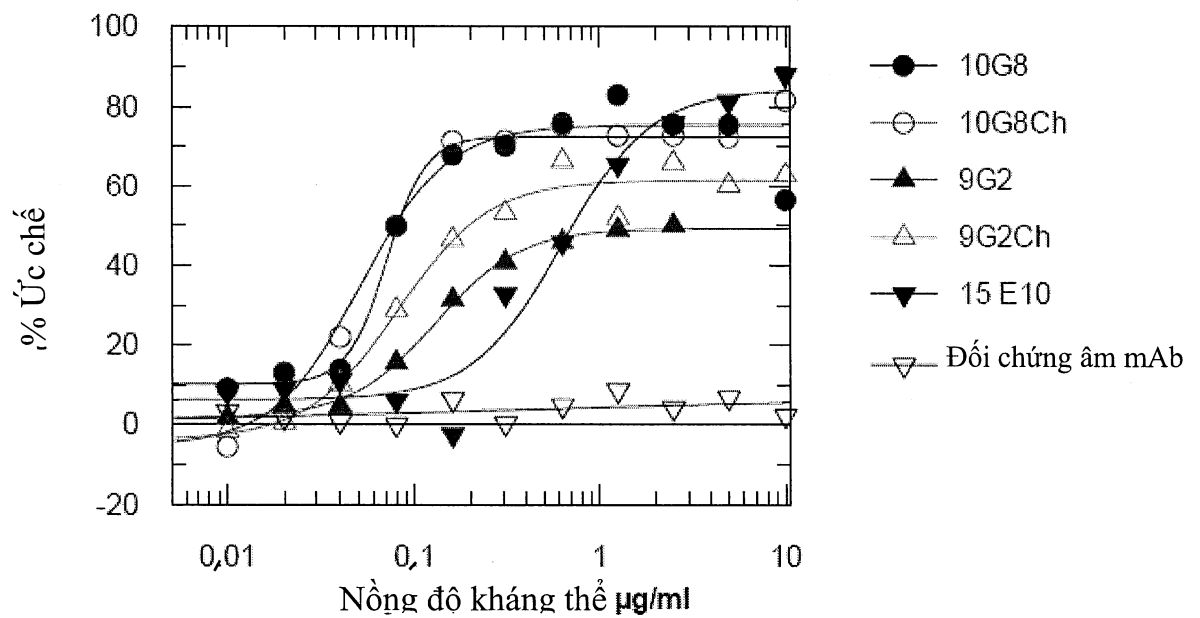


Fig. 13: Thử nghiệm tế bào KB

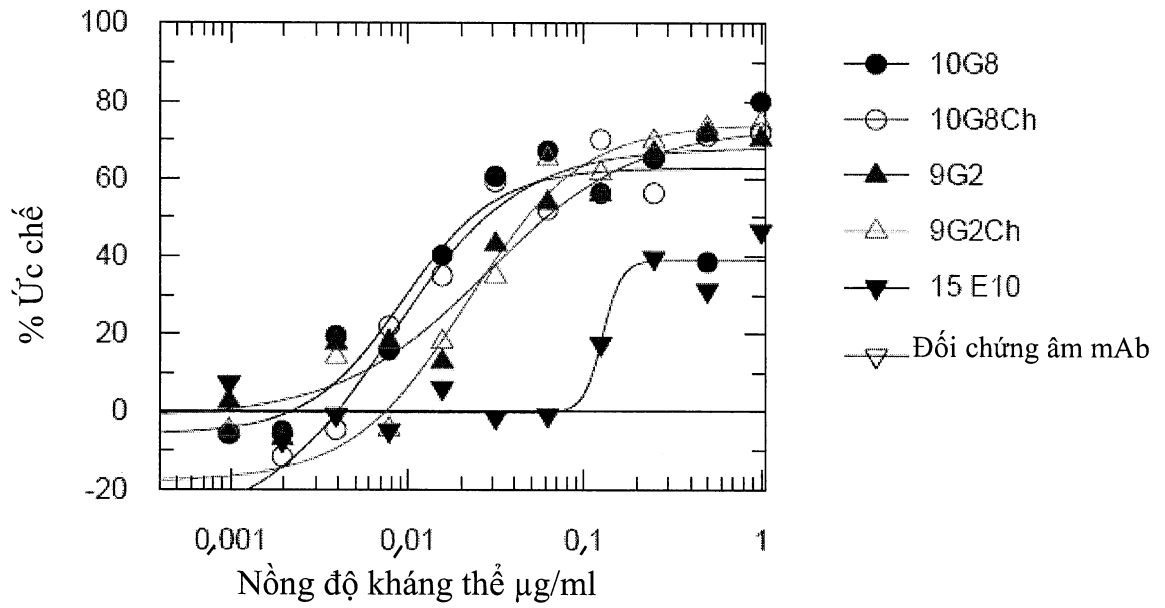


Fig. 14: Thử nghiệm tế bào KB

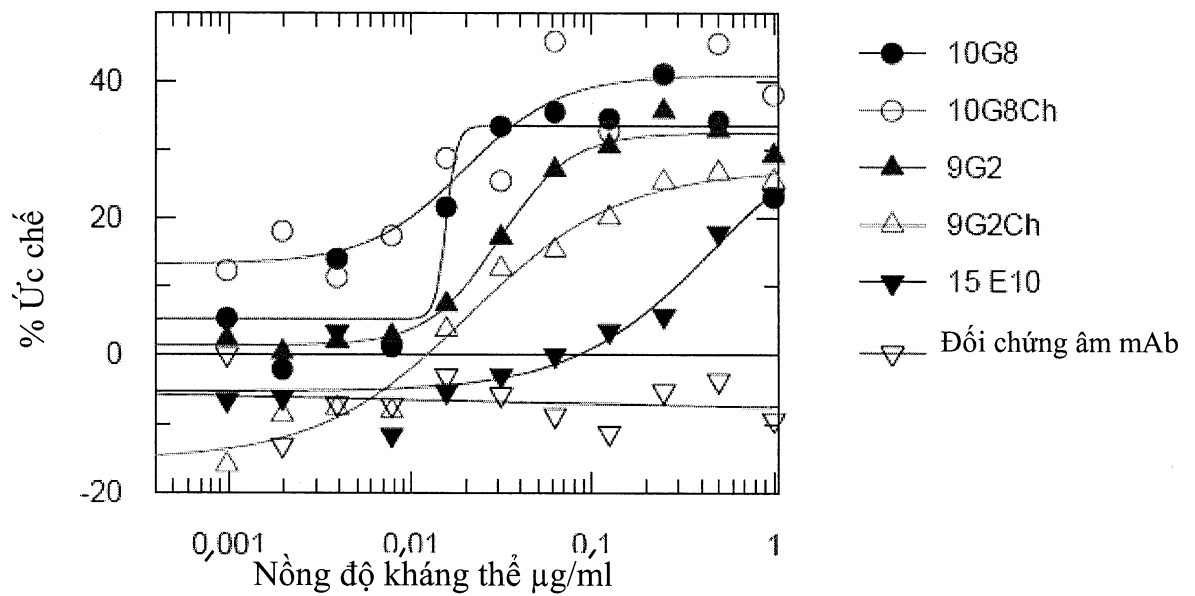


Fig. 15: Thử nghiệm gp130 của OSM nội sinh

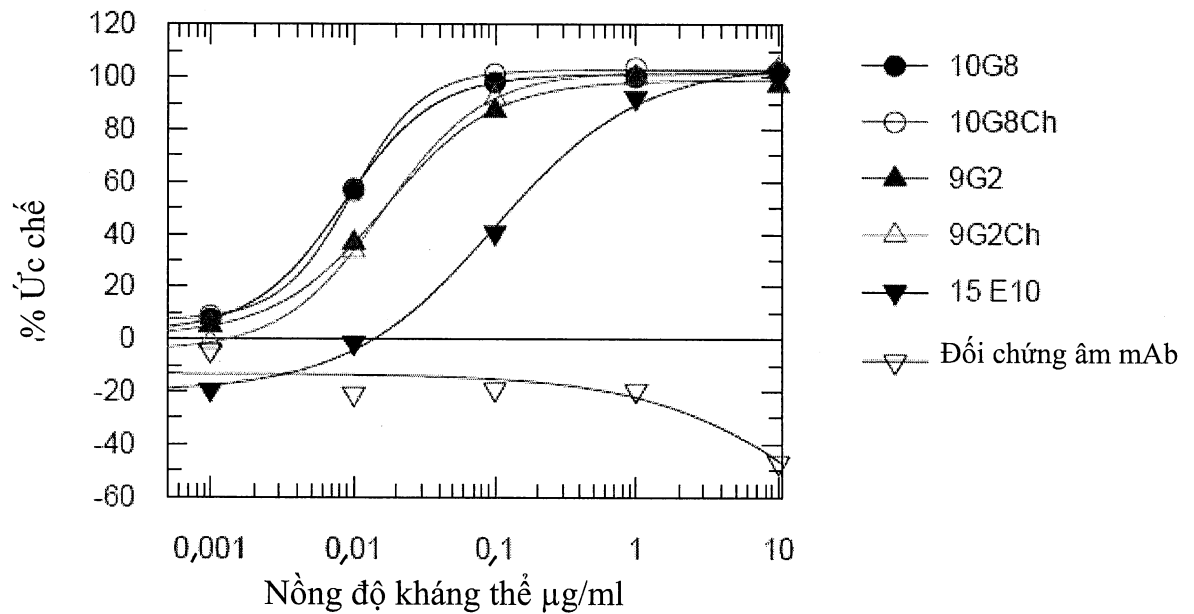


Fig. 16: Human LIF Thử nghiệm tế bào KB

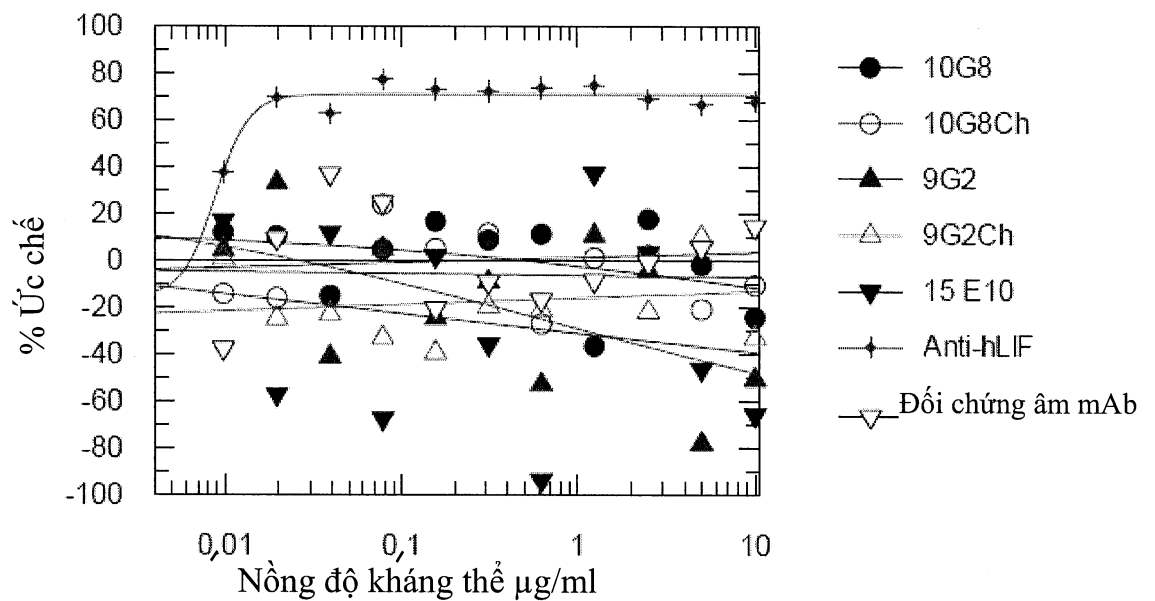


Fig. 17: Thử nghiệm tế bào KB

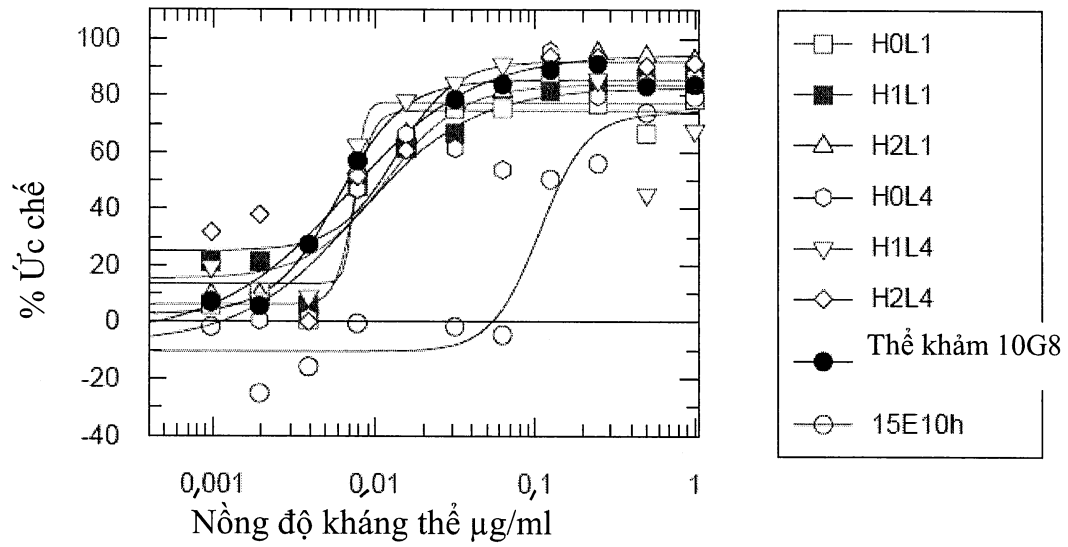


Fig. 18: Gp130 người ELISA

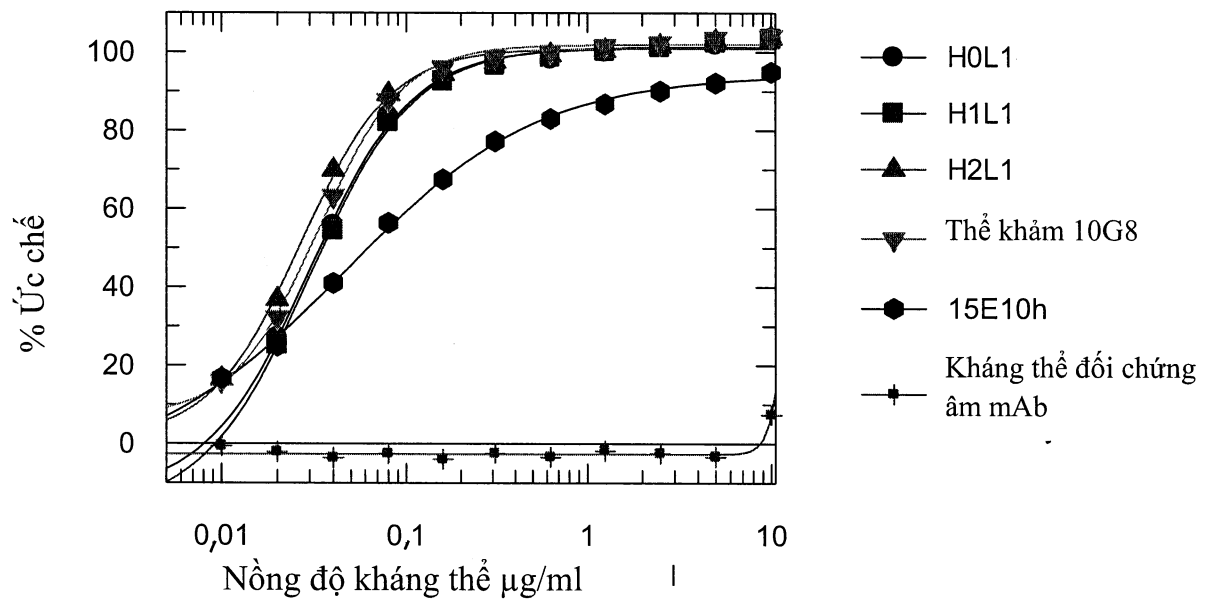


Fig. 19: Phức hợp liên kết OSM người-10G8 mAb

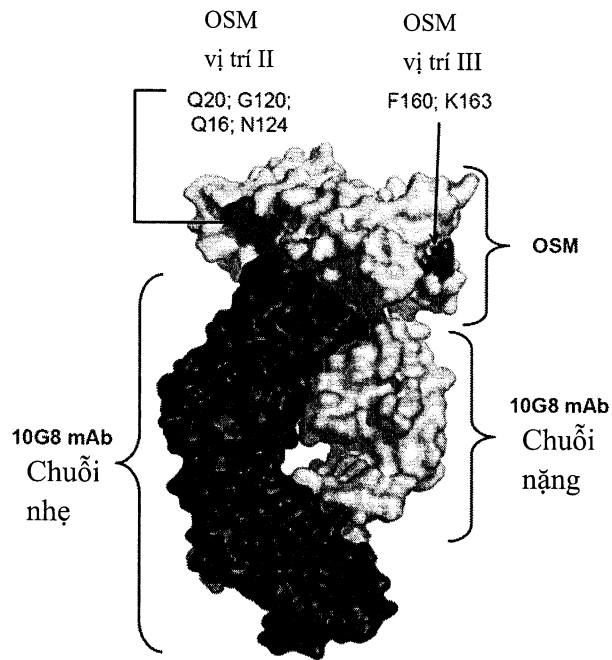


Fig. 20: Thử nghiệm tế bào KB-

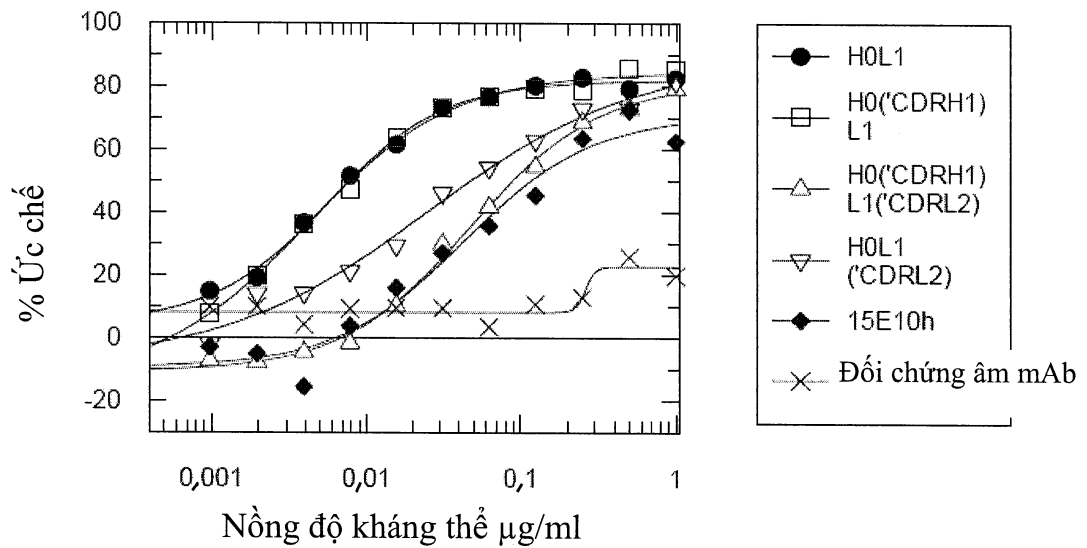


Fig. 21: ELISA gp130 người -

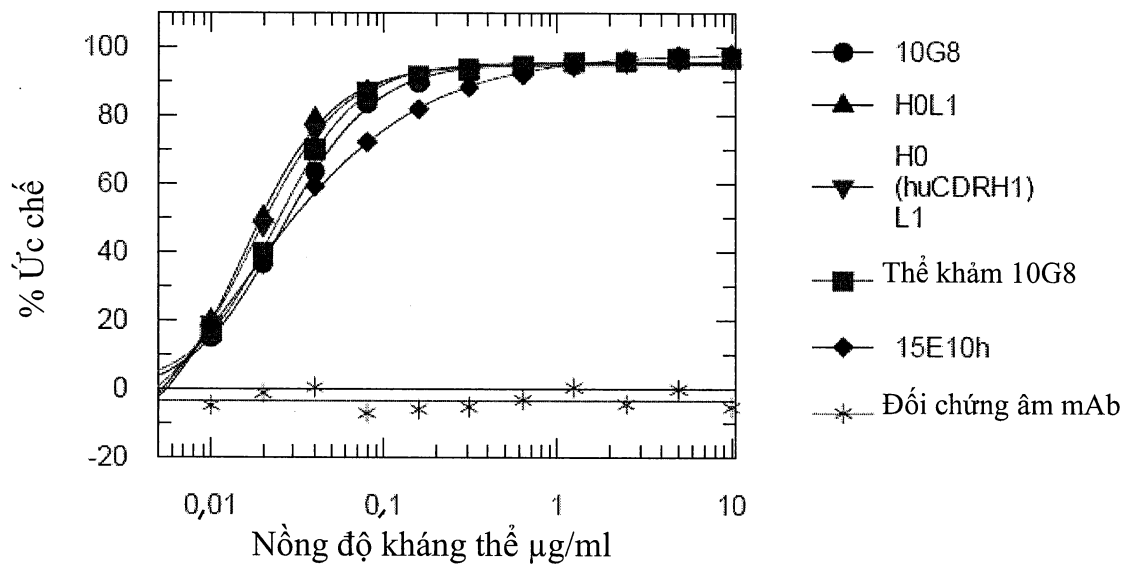


Fig. 22: Thử nghiệm tế bào KB-

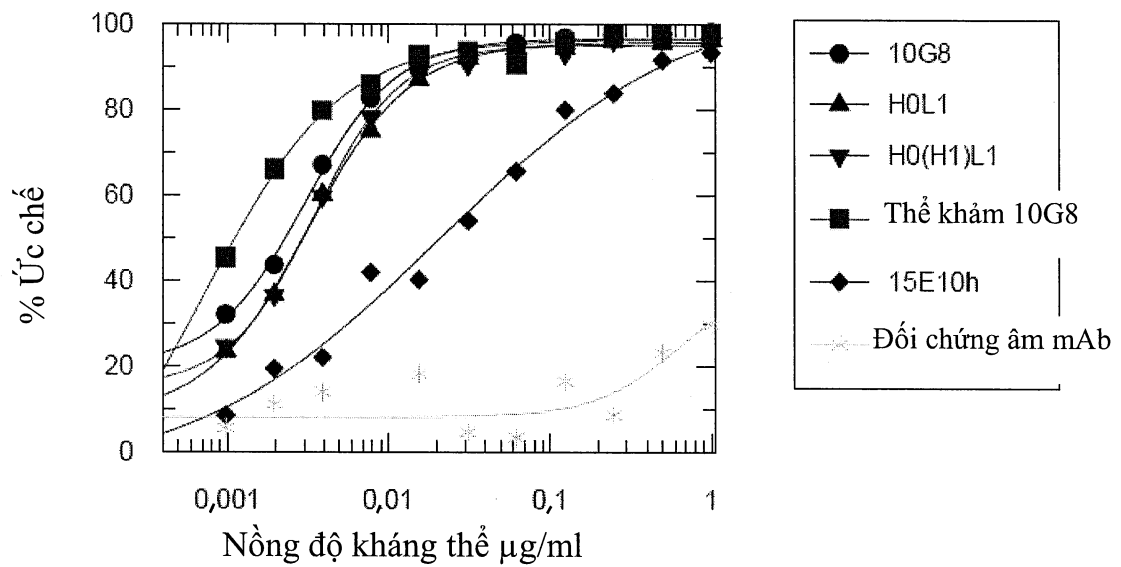


Fig. 23: Thử nghiệm tế bào KB-

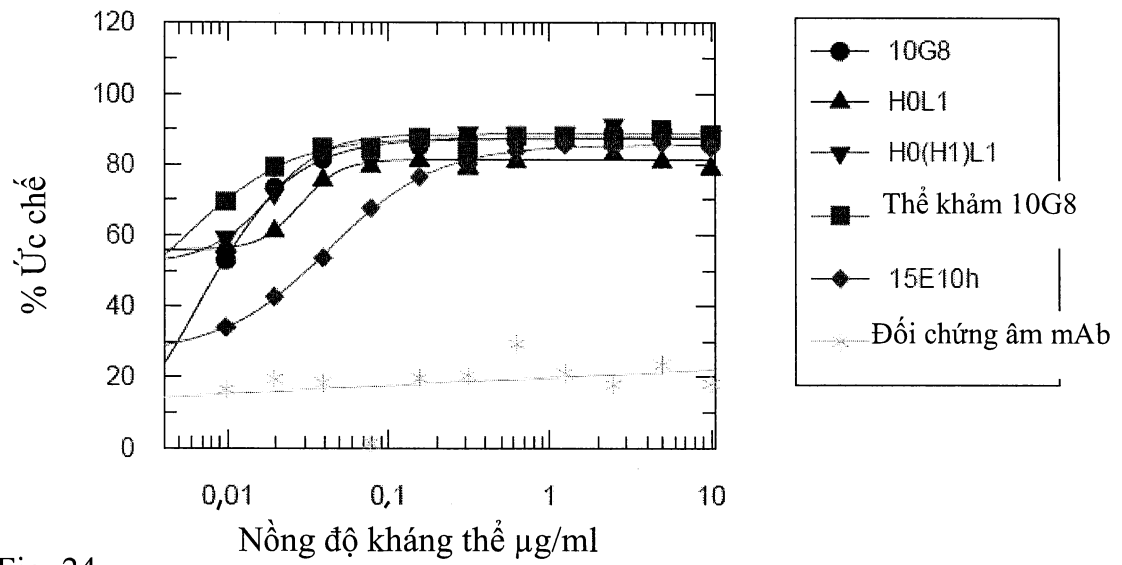


Fig. 24:

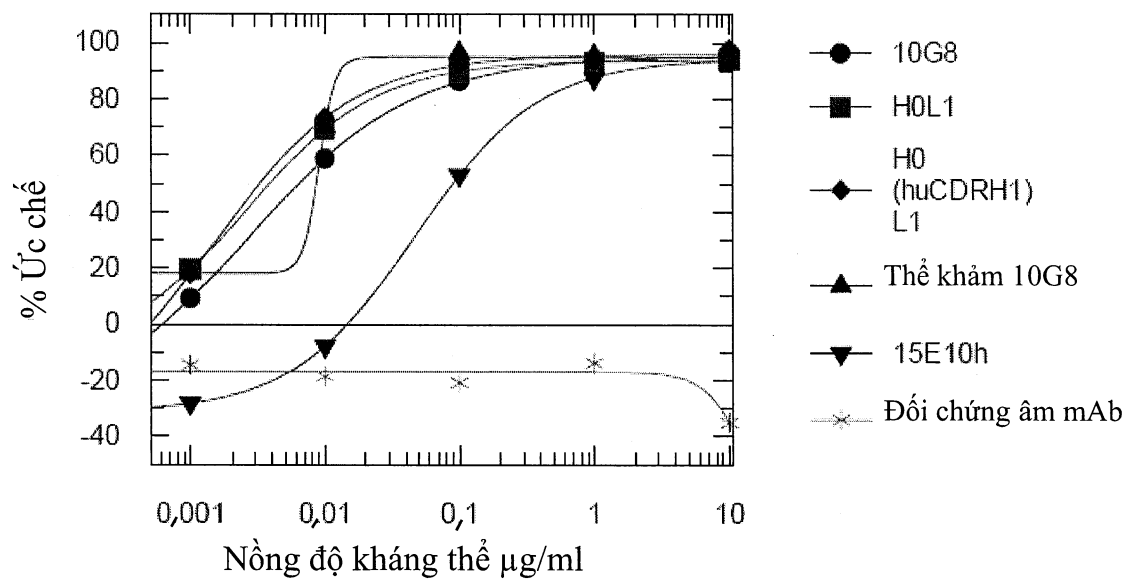


Fig. 25:

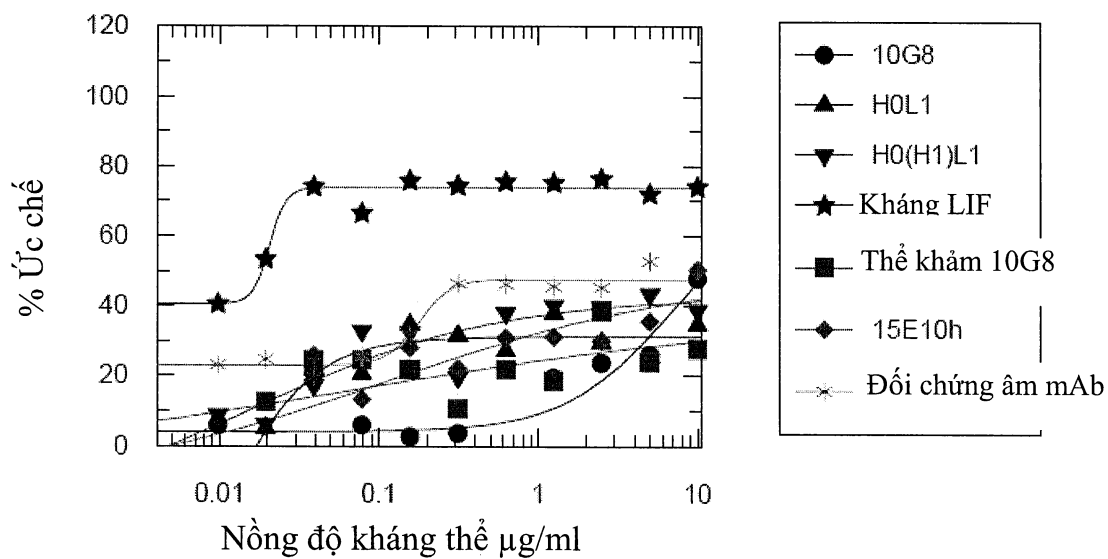


Fig. 26: Thử nghiệm tế bào gan người – SAA

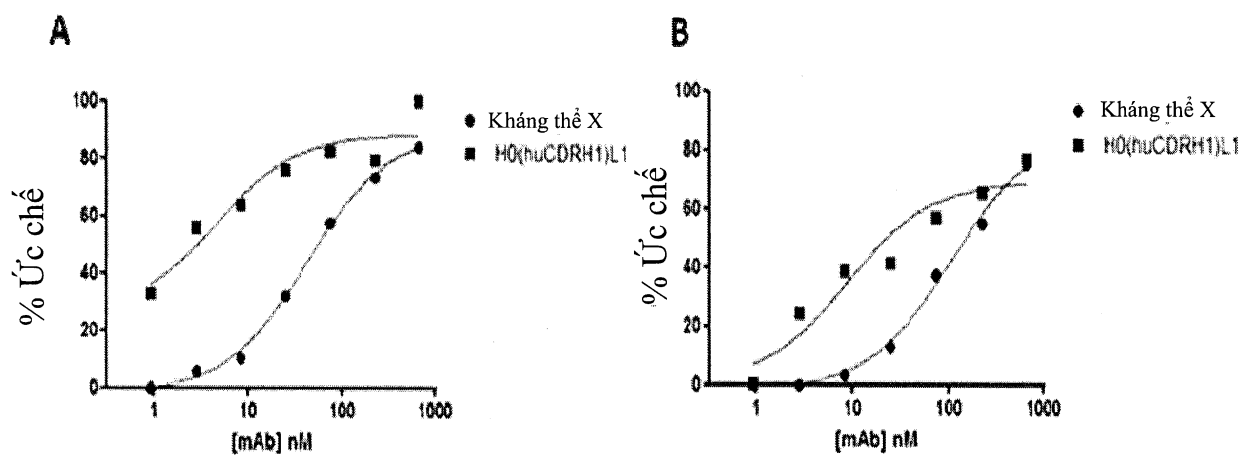


Fig. 27: Thử nghiệm tế bào gan người - CRP

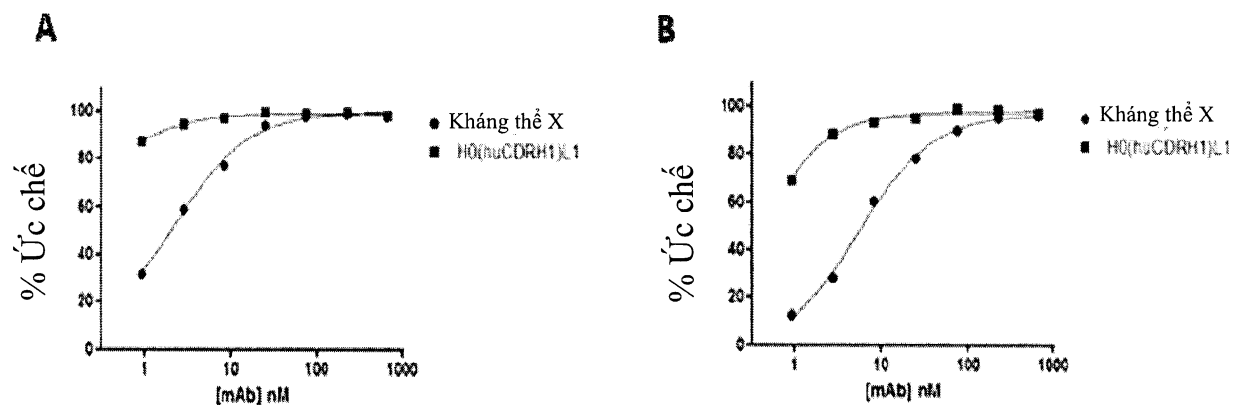


Fig. 28: Thử nghiệm tế bào hoạt dịch tương tự nguyên bào sợi người- IL-6

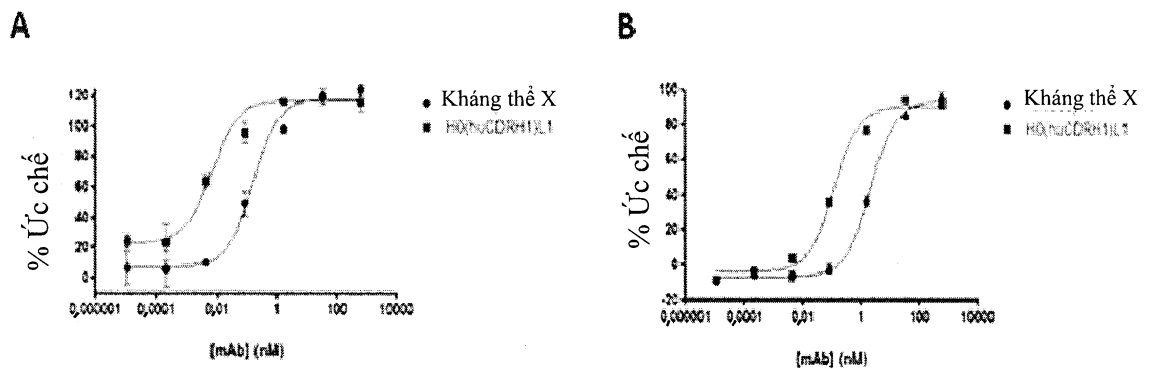


Fig. 29: Thử nghiệm tế bào hoạt dịch tương tự nguyên bào sợi người - MCP-1

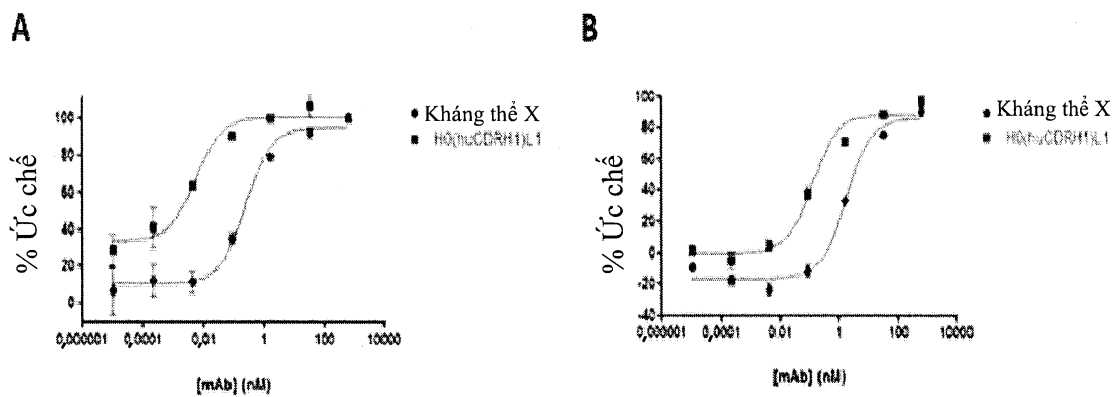


Fig. 30: Thử nghiệm tế bào màng trong tĩnh mạch rốn người

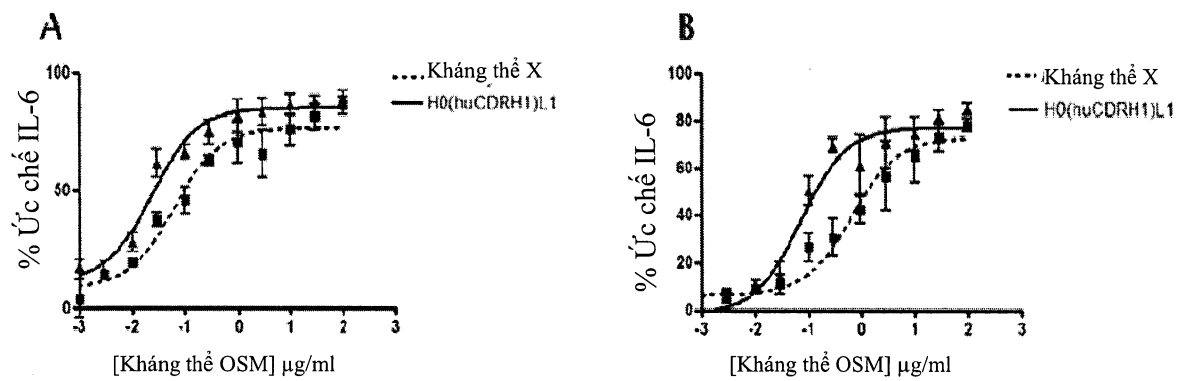


Fig. 31: Thử nghiệm nguyên bào sợi phổi người - MCP-1

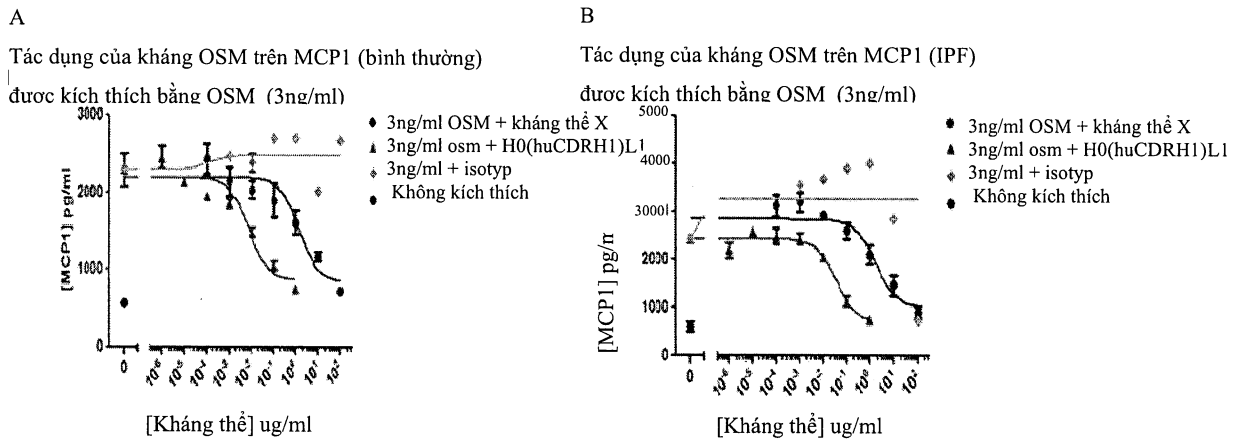


Fig. 32: Thử nghiệm nguyên bào sợi phổi người - IL-6

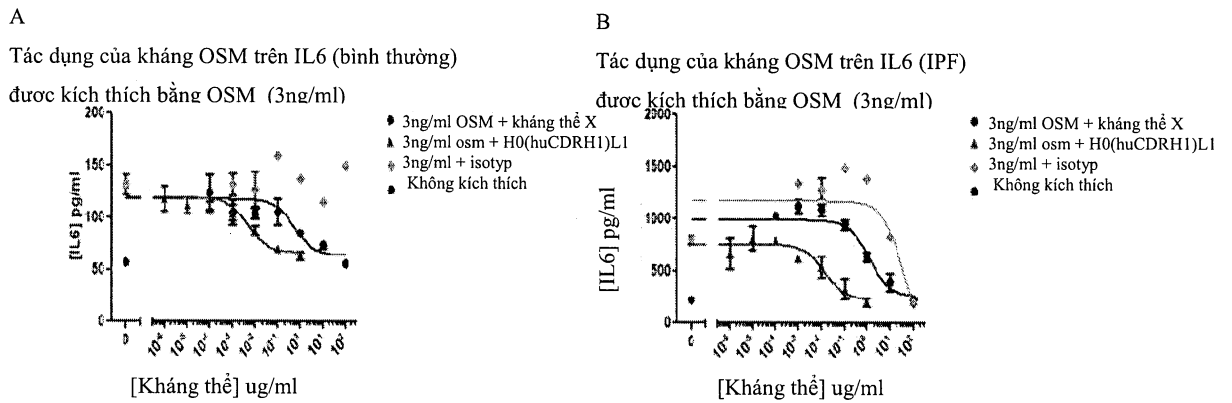


Fig. 33.

Pos	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	101	102
Ala	5.76 E-10	5.72 E-10	4.86 E-10	6.59 E-10	5.41 E-10	8.55 E-09	8.10 E-09	4.81 E-09	3.94 E-10	8.69 E-10	1.55 E-09	3.38 E-10
Cys		6.64 E-10	6.51 E-10	1.50 E-09	7.08 E-10	8.95 E-09	8.92 E-09	8.12 E-09		5.86 E-10		
Asp	4.42 E-10			4.94 E-10	4.24 E-09		4.27 E-08	2.32 E-08		6.72 E-10	3.55 E-10	
Glu	7.85 E-10		1.10 E-09		1.28 E-09			4.91 E-10	4.82 E-10	6.88 E-10	4.26 E-10	
Phe		6.1 E-10	6.37 E-10	3.25 E-10	2.54 E-07		4.47 E-10	3.37 E-09	3.65 E-10	4.50 E-10	2.60 E-09	4.25 E-10
Gly	5.17 E-10	4.88 E-10	3.07 E-10	1.11 E-09	5.25 E-09	1.81 E-08	6.31 E-08	2.21 E-08	3.88 E-10	6.61 E-10	7.10 E-10	4.06 E-10
His	4.99 E-10	4.80 E-10		1.74 E-10	1.56 E-08		3.97 E-08	3.62 E-08	1.20 E-09			
Ile				7.18 E-09	1.69 E-09	1.87 E-08	2.46 E-08	4.55 E-08				
Lys		6.71 E-10		2.45 E-08	4.06 E-09	4.31 E-09		4.71 E-08		8.73 E-10	2.83 E-09	
Leu	5.68 E-10	5.55 E-10	2.19 E-09	7.42 E-10	1.56 E-09	4.20 E-08	3.35 E-09	1.62 E-08	4.24 E-10			4.26 E-10
Met	6.49 E-10		8.09 E-10	6.93 E-09	1.62 E-09		5.19 E-09	4.03 E-08				
Asn					1.33 E-09		6.58 E-09	4.02 E-08				
Pro	4.42 E-10	2.35 E-09	3.15 E-08	9.86 E-10	5.53 E-10	3.65 E-08		1.14 E-08		1.05 E-09	5.01 E-09	4.11 E-10
Gln	5.70 E-10			7.29 E-10			1.46 E-08	3.35 E-09	1.17 E-09		1.10 E-09	3.37 E-10
Arg	6.84 E-09	1.56 E-08	1.85 E-09	3.02 E-09	6.80 E-09			2.13 E-08	1.09 E-09	1.34 E-09	2.18 E-09	5.33 E-10

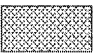
Ser	7.60 E-10	4.67 E-10	6.32 E-10	1.09 E-09	8.27 E-10	1.65 E-09	1.83 E-08	7.74 E-09	1.20 E-09	6.61 E-10	7.72 E-10	4.44 E-10
Thr	6.32 E-10	4.97 E-10	3.64 E-09	1.66 E-09	3.99 E-10	4.57 E-10	3.34 E-08	8.57 E-09	1.09 E-09	5.91 E-10	7.07 E-10	
Val	5.70 E-10	4.88 E-10	2.01 E-09	1.00 E-09	7.14 E-10	1.45 E-08	9.05 E-09	4.12 E-08	5.60 E-10	6.75 E-10	4.40 E-10	4.26 E-10
Trp	1.86 E-08	9.79 E-10	1.67 E-09	3.17 E-10	4.99 E-09		6.90 E-09	4.95 E-10	6.87 E-10	7.11 E-10	2.07 E-10	5.33 E-10
Tyr		6.78 E-10		2.07 E-09	4.44 E-10		1.41 E-08	6.76 E-09	3.64 E-10	5.09 E-10		

 Không liên kết

BOL Góc WT

D

 Giảm liên kết 3
lần

 Số liệu được tạo ra trong thử nghiệm riêng biệt

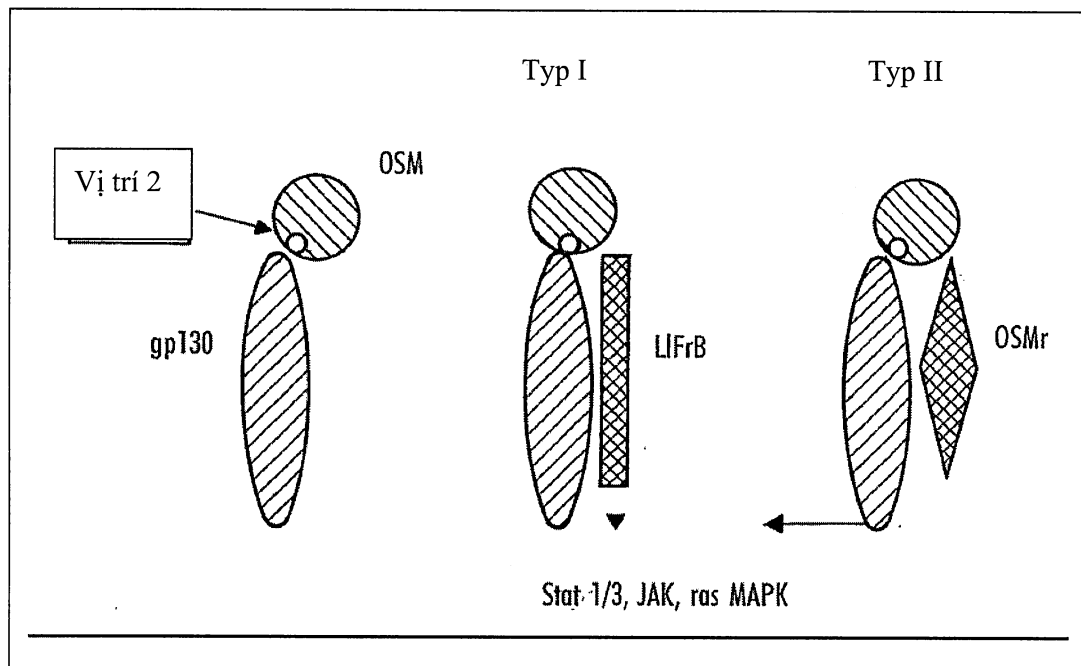


Fig. 34

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Glaxo Group Limited

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI ONCOSTATIN M (OSM) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> PB63694

<160> 84

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Murine

<400> 1

Asn Tyr Ala Met Ser

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Murine

<400> 2

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val Arg

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Murine

<400> 3

Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Murine

<400> 4

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Murine

<400> 5

Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Murine

<400> 6

Leu	His	Ser	Arg	Glu	Phe	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Murine

<400> 7

Ser	Tyr	Ala	Met	Ser
1				5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Murine

<400> 8

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

Gly

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Murine

<400> 9

Asp	Val	Gly	Leu	Thr	Thr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10		

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Murine

<400> 10

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Pro	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Murine

<400> 11

Tyr	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Murine

<400> 12

Gln	His	Ser	Arg	Glu	Phe	Pro	Phe	Thr
1				5				

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Murine

<400> 13

Asn	Tyr	Ala	Met	Ser
1				5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Murine

<400> 14

Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Gln
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
Gly			

```
<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Murine
```

```
<400> 15
Asp Val Gly Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val
 1             5             10
```

```
<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Murine
```

<400> 16
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Pro Ser Ser Tyr Asn Phe Met His
1 5 10 15

```
<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Murine
```

```
<400> 17
Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
  1             5
```

```
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Murine
```

<400> 18
Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

```
<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Murine
```

```
<400> 19
Asn Tyr Ala Met Ser
```

1

5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Murine

<400> 20

Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Asn	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Murine

<400> 21

Asp	Val	Gly	His	Thr	Thr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10		

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Murine

<400> 22

Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Phe	Met	His
1				5					10					15

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Murine

<400> 23

Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Murine

<400> 24

Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Phe Thr

1

5

<210> 25
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 25
 gaaatgcaac tgggtggagtc tggggaaggc ttagtggagc ctggaggggc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggaaaaga gcctggagtg ggctcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
 ctagacaatg taagggggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
 ttgcaaatga gccatttgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggacatacta ccttttggtta cttcgatgtc tggggctcag ggaccgcggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 26
 Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Ser Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ser Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 27
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgttttc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgta gggccagcaa aagtgtcagt gcagctggct ataatttcat gcactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc gcccaaagtc ctcatacaagt atgcatccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgtaacatat tactgtctgc acagtaggga gtttccgttc 300

acgttcggag gggggaccaa cctggaaata aaa

333

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> Murine

<400> 28

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Phe	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Ala
			20					25					30		
Gly	Tyr	Asn	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Val	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65					70					75				80	
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Val	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	His	Ser	Arg
				85					90					95	
Glu	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 29

<211> 363

<212> DNA

<213> Murine

<400> 29

gaagtgcagc	tggtggagtc	tgggggagac	ttagtgaaac	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tcctgtgtac	cctctggatt	cactttcagt	agttatgcca	tgtcttgggt	tcgccagact	120
ccggaaaaga	ggctggagtg	ggtcgcaacc	attagtgatg	gtggtagttt	cacctactat	180
tttgccaata	tacagggccg	attcaccatc	tccagagaca	ataccaagaa	caacctatac	240
ctgcaaatga	accatctgaa	gtctgaggac	gcaggcatgt	attactgtgc	aagagatgtg	300
ggccttacta	cgttttggtg	tttcgatgtc	tggggcacag	ggaccacggt	caccgtctcc	360
tca						363

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Murine

<400> 30

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Pro	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Ala	Asn	Ile
	50					55					60				

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn His Leu Lys Ser Glu Asp Ala Gly Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 31
 gacattgtgc tgacacagtc tcttgcttcc ttaactatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgca gggccagcaa aagtgtcagt ccatctggct atgatttcac gcactgggat 120
 caacagaagc caggacagcc gcccaaactc ctcatacaagt atgcatccga actagaatct 180
 ggggtccctg gcagggttcag tggcagtgagg tctgggacag atttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aagaagatgc tgcaacatat ttctgtcagc acagtaggga gtttccgttc 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 32
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 32
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Ile Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Pro Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Asp Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Leu Glu Ser Gly Val Pro Gly
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33
 <211> 364
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 33
 gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc 60

```

tctctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccggaagaaga ggctggagtg ggtcgcgacc attagtgatg gtggtgggta cacctactat 180
ttagacaatg gacagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaaagaa caacctgtac 240
ctgcagatga gccatctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
ggacttacta cgttttggta ccttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc 360
ctca 364

```

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Murine

```

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Gly
 50          55          60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Arg Asp Val Gly Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100          105          110
Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 35
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Murine

```

<400> 35
gacattgtgc tgacacagtc tcctgtttcc ttagttatat ctctggggca gagggccacc 60
atctcctgca gggccagcaa aagtgtcagt ccatctagct ataatttcat gcactggtac 120
caacagagac caggacagcc gcccaaactc ctcatcacgt atgcttccaa cctagaatct 180
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aagaggatgc tgcaacatat tactgtcagc acagtaggga gtttccgttc 300
acgttcggag gggggaccag gctggaaata aaa 333

```

<210> 36
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Murine

```

<400> 36
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Val Ile Ser Leu Gly
 1          5          10          15

```

Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Tyr	Asn	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Thr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
	50					55				60					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65					70				75					80	
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg
				85					90					95	
Glu	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 37
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 37
 gaagtacaac tagtggagtc tgggggaggc ttagtggagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcc a tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggaaaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
 ctagacaatg taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
 ttgcaaatga gccatttgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggacatacta cgtttttggt cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Murine

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Asn	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Asn	Leu	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Met	Ser	His	Leu	Lys	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Asp	Val	Gly	His	Thr	Thr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Thr	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115				120								

<210> 39
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Murine

<400> 39
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgttttc ttagttatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgca gggccagcaa aagtgtcagt gcatctggct ataatttcat gcactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc gcccaaagtc ctcataagc atgcatccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccagggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgtaacatat tactgtcagc acagtaggga gtttccgttc 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 40
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Murine

<400> 40
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Phe Leu Val Ile Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Val Thr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 41
 <211> 1353
 <212> DNA
 <213> Chimera

<400> 41
 gaaatgcaac tgggtggagtc tgggggaaggc ttagtggagc ctggaggggc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggaaaaga gcctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
 ctagacaatg taaggggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
 ttgcaaatga gccatttgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggacatacta ccttttggtg ctctgatgtc tggggctcag ggacactagt gaccgtgtcc 360
 agcgccagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgaacc ggtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg accgtgccca gcagcagcct gggcaccagc 600
 acctacatct gtaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660

```

cccaagagct gtgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccccca gctgctggga 720
ggccccagcg tgttctgttt cccccccaag cctaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 780
cccgagggtga cctgtgtggt ggtggatgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaat gccaaagacca agcccaggga ggagcagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgaaggt gtccaacaag gccctgcctg cccctatcga gaaaaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagagagccc cagggtgtaca ccctgcccc tagcagagat 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgctgtgtga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgatggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggcctgca caatcactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtcccctggc aag 1353

```

<210> 42

<211> 451

<212> PRT

<213> Chimera

<400> 42

```

Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
          20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Ser Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50          55          60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
          100          105          110
Ser 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 Lys 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	Asp	Glu	Leu	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> 43
<211> 654
<212> DNA
<213> Chimera
```

<400>	43						
gacattgtgc	tgacacagtc	tctctgttttc	ttagttgtat	ctctgggggca	gagggccacc	60	
atctcctgta	gggccagcaa	aagtgtcagt	gcagctggct	ataatttcac	gcactggtac	120	
caacagaaac	caggacagcc	gcccaaagtc	ctcatcaagt	atgcatccaa	cctagaatat	180	
ggggtccctg	ccagggttcag	tggcagtggt	tctgggacag	acttcaccct	caacatccat	240	
cctgtggagg	aggaggatgc	tgtaacatat	tactgtctgc	acagtaggga	gtttccggtt	300	
acgttcggag	gggggaccaa	cctggaaata	aaacgtacgg	tggcgcggcc	cagcgtgttc	360	
atcttccccc	ccagcgatga	gcagctgaag	agcggcaccg	ccagcgtggt	gtgtctgctg	420	
aacaacttct	acccccggga	ggccaagggt	cagtgggaag	tggacaatgc	cctgcagagc	480	
ggcaacagcc	aggagagcgt	gaccgagcag	gacagcaagg	actccacctc	cagcctgagc	540	
agcaccctga	ccctgagcaa	ggccgactac	gagaagcaca	aggtgtacgc	ctgtgaggtg	600	
accaccagg	gcctgtccag	ccccgtgacc	aagagcttca	accggggcga	gtgc	654	

```
<210> 44
<211> 218
<212> PRT
<213> Chimera
```

<400> 44
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Phe Leu Val Val Ser Leu Gly

1				5					10					15			
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Ala		
			20					25					30				
Gly	Tyr	Asn	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro		
		35					40					45					
Lys	Val	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala		
	50					55					60						
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His		
65					70					75					80		
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Val	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	His	Ser	Arg		
				85					90					95			
Glu	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Leu	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> 45

<211> 1353

<212> DNA

<213> Chimera

<400> 45

```

gaagtacaac tgggtggagtc tggggggaggc ttagtggagc ctggaggggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcc a tgtcttggt tgcgcagact 120
ccggaaaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
ctagacaatg taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
ttgcaaatga gccatttgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
ggacatacta cgttttggtta cttcgatgtc tggggcacag ggacactagt gaccgtgtcc 360
agcgccagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag cgccttggtg ctgcctggtg aaggactact tccccgaacc ggtgaccgtg 480
tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg accgtgcccc gcagcagcct gggcaccagc 600
acctacatct gtaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
ccaagagct gtgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccccca gctgctggga 720
ggccccagcg tgttcctgtt cccccccaag cctaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 780
cccgaggtga cctgtgtggt ggtggatgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaat gccaagacca agcccaggga ggagcagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgtaaggt gtccaacaag gccctgcctg cccctatcga gaaaaccatc 1020

```

```

agcaaggcca agggccagcc cagagagccc caggtgtaca ccctgcccc tagcagagat 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgcttggtag agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgatggcag cttcttcttg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caatcactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtcccctggc aag 1353

```

<210> 46
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Chimera

<400> 46

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100          105          110
Thr 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 Lys 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 Asp Glu Leu 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> 47
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> Chimera

```

<400> 47
gacattgtgc tgacacagtc tcctgttttc ttagttatat ctctggggca gagggccacc 60
atctcctgca gggccagcaa aagtgtcagt gcatctggct ataatttcat gcactggtac 120
caacagaaac caggacagcc gcccaaagtc ctcataagat atgcatccaa cctagaatct 180
gggggtccctg ccagggttcag tggcagtgagg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgtaacatat tactgtcagc acagtaggga gtttccgttc 300
acgttcggag ggggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggccgcccc cagcgtgttc 360
atcttcccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
aacaacttct acccccggga ggccaagggt cagtgggaagg tggacaatgc cctgcagagc 480
ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
accaccagg gcctgtccag ccccgtagacc aagagcttca accggggcga gtgc 654

```

<210> 48
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Chimera

```

<400> 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Phe Leu Val Ile Ser Leu Gly
1          5          10          15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
20          25          30
Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35          40          45
Lys Val Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

```

50		55		60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His				
65		70		75
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Val Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg				
	85		90	
Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg				
	100		105	
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln				
	115		120	
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr				
	130		135	
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser				
145		150		155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr				
	165		170	
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys				
	180		185	
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro				
	195		200	
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				205
	210		215	

<210> 49

<211> 294

<212> DNA

<213> Người Homo sapiens

<400> 49

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaga      294

```

<210> 50

<211> 98

<212> PRT

<213> Người

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1	5
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
	20
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val	
	50
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	
65	70
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	

Ala Arg 85 90 95

<210> 51
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Người Homo sapiens

<400> 51
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300

<210> 52
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 52
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr
 100

<210> 53
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 53
 gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggcggc ctggtccagc ccggcgggag cctgagactc 60
 tcttgccgag ctacgggctt caccttcagc aactacgcca tgagctgggt gaggcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtggccacc atcagcgacg gcggcagctt cacctactat 180

```

ctggacaacg tgaggggag gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgccgtgt actactgcgc cagggacgtc 300
ggccacacca ctttctggtta cttcgacgtc tggggcaggg gcacactagt gaccgtgtcc 360
agc 363

```

<210> 54

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 54

```

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 Thr Phe Ser Asn Tyr
          20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
          50          55          60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
          100          105          110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 55

<211> 363

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 55

```

gagatgcagc tgggtggaaag cggcgggcggc ctggtccagc ccggcggggag cctgagactc 60
tcttgcgccg ctagcggctt caccttcagc aactacgcca tgagctgggt gaggcaggcc 120
cccggaaggg gcctggagtg ggtggccacc atcagcgacg gcggcagctt cacctactat 180
ctggacaacg tgaggggag gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgccgtgt actactgcgc cagggacgtc 300
ggccacacca ctttctggtta cttcgacgtc tggggcaggg gcacactagt gaccgtgtcc 360
agc 363

```

<210> 56

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 56

Glu	Met	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	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20						25					30	
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Asn	Val
	50					55					60				
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Asp	Val	Gly	His	Thr	Thr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 57

<211> 363

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 57

gaggtgcagc	tggtggaaag	cggcggcggc	ctggtccagc	ccggcgggag	cctgagactc	60
tcttgcgccg	ctagcggctt	caccttcagc	aactacgcca	tgagctgggt	gaggcaggcc	120
cccggcaagg	gcctggagtg	ggtggccacc	atcagcgacg	gcggcagctt	cacctactat	180
ctggacaacg	tgaggggcag	gttcaccatc	agcaggggaca	acgccaagaa	cagcctgtac	240
ctgcagatga	acagcctgag	ggccgaggat	accgccgtgt	actactgcgc	cagggacgtc	300
ggccacacca	ccttctggta	cttcgacgtc	tggggctccg	gcacactagt	gaccgtgtcc	360
agc						363

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 58

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 Thr Phe Ser Asn Tyr
      20                25                30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
      50                55                60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
      65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
      100               105               110
Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115               120

```

<210> 59
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

```

<400> 59
gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggggcga aagggccacc 60
atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgccggct acaacttcat gcactggtac 120
cagcagaagc cccggccagcc ccccaagctg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
ggcgtgccag acagggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
agcctgcagg cccaggacgt cgccgtgtac tactgcctgc acagcaggga gttccccttc 300
acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aag                                     333

```

<210> 60
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

```

<400> 60
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 Lys Ser Val Ser Ala Ala
      20                25                30
Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35                40                45
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
      50                55                60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
      65                70                75                80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg

```

				85						90						95	
Glu	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105					110				

<210> 61
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 61
 gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggggcga aagggccacc 60
 atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgccggct acaacttcat gcactggtac 120
 cagcagaagc ccggccagcc cccaaggtg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
 ggctgtccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
 agcctgcagg ccgaggacgt cgccgtgtac tactgcctgc acagcaggga gttccccttc 300
 acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 62
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 62
 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 Lys Ser Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe 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 Cys Leu His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 63
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 63

```
gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcca aagggccacc 60
atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgccggct acaacttcat gcactggtag 120
cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
agcctgcagg ccgaggacgt cgtgggtgtac tactgcctgc acagcaggga gttccccttc 300
acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aag 333
```

<210> 64

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 64

```
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 Lys Ser Val Ser Ala Ala
          20           25           30
Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35           40           45
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
          50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65           70           75           80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Val Val Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg
          85           90           95
Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
```

<210> 65

<211> 333

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 65

```
gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcca aagggccacc 60
atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgccggct acaacttcat gcactggtag 120
cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
agcctgcagg ccgaggacgt cgcctgtgtac tactgcctgc acagcaggga gttccccttc 300
acctttggcg gcggcaccaa cgtggagatc aag 333
```

<210> 66

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 66
 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 Lys Ser Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 67
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 67
 gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctggggcga aagggccacc 60
 atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgccggct acaacttcat gcactgggtac 120
 cagcagaagc cgggccagcc cccaaggtg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
 ggcgtagccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
 agcctgcagg ccgaggacgt cgtgggtgtac tactgcctgc acagcaggga gttccccttc 300
 acctttggcg gcggcaccaa cgtggagatc aag 333

<210> 68
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 68
 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 Lys Ser Val Ser Ala Ala

			20						25					30				
Gly	Tyr	Asn	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro			
		35					40					45						
Lys	Val	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp			
	50					55					60							
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser			
65					70					75					80			
Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Val	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	His	Ser	Arg			
			85						90					95				
Glu	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105						110				

<210> 69

<211> 1353

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 69

```

gaggtgcagc  tgggtgaaag  cggcggcggc  ctggtccagc  ccggcgggag  cctgagactc  60
tcttgcgccg  ctagcggcct  caccttcagc  aactacgcca  tgagctgggt  gaggcaggcc  120
cccggcaagg  gcctggagtg  ggtggccacc  atcagcgacg  gcggcagctt  cacctactat  180
ctggacaacg  tgaggggagc  gttcaccatc  agcagggaca  acgccaagaa  cagcctgtac  240
ctgcagatga  acagcctgag  ggccgaggat  accgccgtgt  actactgcgc  caggggacgtc  300
ggccacacca  ccttctggta  cttcgacgtc  tggggcaggg  gcacactagt  gaccgtgtcc  360
agcgccagca  ccaagggcc  cagcgtgttc  cccctggccc  ccagcagcaa  gagcaccagc  420
ggcggcacag  ccgccctggg  ctgcctgggt  aaggactact  tccccgaacc  ggtgaccgtg  480
tcctggaaca  gcggagccct  gaccagcggc  gtgcacacct  tccccgccgt  gctgcagagc  540
agcggcctgt  acagcctgag  cagcgtgggt  accgtgccca  gcagcagcct  gggcacccag  600
acctacatct  gtaacgtgaa  ccacaagccc  agcaacacca  aggtggacaa  gaaggtggag  660
ccaagagct  gtgacaagac  ccacacctgc  cccccctgcc  ctgccccga  gctgctggga  720
ggccccagcg  tgttctgtgt  ccccccaag  cctaaggaca  ccctgatgat  cagcagaacc  780
cccgaggtga  cctgtgtggt  ggtggatgtg  agccacgagg  accctgaggt  gaagttcaac  840
tggtacgtgg  acggcgtgga  ggtgcacaat  gccaaagacca  agcccaggga  ggagcagtac  900
aacagcacct  accgggtggt  gtccgtgctg  accgtgctgc  accaggattg  gctgaacggc  960
aaggagtaca  agtgtaaagt  gtccaacaag  gccctgcctg  cccctatcga  gaaaaccatc  1020
agcaaggcca  agggccagcc  cagagagccc  caggtgtaca  ccctgcccc  tagcagagat  1080
gagctgacca  agaaccaggt  gtccctgacc  tgctgtgtga  agggcttcta  cccagcgcac  1140
atcgccgtgg  agtgggagag  caacggccag  cccgagaaca  actacaagac  cccccccct  1200
gtgctggaca  gcgatggcag  cttcttctg  tacagcaagc  tgaccgtgga  caagagcaga  1260
tggcagcagg  gcaacgtgtt  cagctgctcc  gtgatgcacg  aggccctgca  caatcactac  1320
accagaaga  gcctgagcct  gtcccctggc  aag  1353

```

<210> 70

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

 $\langle 400 \rangle$ 70

Glu 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Val	Gln	Pro	Gly 15	Gly
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser 20	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Asn	Tyr
Ala	Met	Ser 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
Ala	Thr 50	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly 55	Ser	Phe	Thr	Tyr	Tyr 60	Leu	Asp	Asn	Val
Arg 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala 75	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr 80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Arg	Asp	Val 100	Gly	His	Thr	Thr	Phe 105	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val 110	Trp	Gly
Arg	Gly	Thr 115	Leu	Val	Thr	Val	Ser 120	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys 125	Gly	Pro	Ser
Val	Phe 130	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser 135	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser 140	Gly	Gly	Thr	Ala
Ala 145	Leu	Gly	Cys	Leu 150	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro 155	Glu	Pro	Val	Thr	Val 160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly 165	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly 170	Val	His	Thr	Phe	Pro 175	Ala
Val	Leu	Gln	Ser 180	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser 185	Leu	Ser	Ser	Val	Val 190	Thr	Val
Pro	Ser	Ser 195	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln 200	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn 205	Val	Asn	His
Lys	Pro 210	Ser	Asn	Thr	Lys	Val 215	Asp	Lys	Lys	Val	Glu 220	Pro	Lys	Ser	Cys
Asp 225	Lys	Thr	His	Thr	Cys 230	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 235	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly 240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe 245	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys 250	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 255
Ile	Ser	Arg	Thr 260	Pro	Glu	Val	Thr	Cys 265	Val	Val	Val	Asp	Val 270	Ser	His
Glu	Asp 275	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn 280	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly 285	Val	Glu	Val
His	Asn 290	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro 295	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr 300	Asn	Ser	Thr	Tyr
Arg 305	Val	Val	Ser	Val	Leu 310	Thr	Val	Leu	His	Gln 315	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys 325	Lys	Val	Ser	Asn	Lys 330	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro 335	Ile
Glu	Lys	Thr	Ile 340	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly 345	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro 350	Gln	Val
Tyr	Thr	Leu 355	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp 360	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn 365	Gln	Val	Ser
Leu	Thr 370	Cys	Leu	Val	Lys	Gly 375	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp 380	Ile	Ala	Val	Glu
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> 71
<211> 654
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400>	71					
gacatcgtga	tgactcagag	ccccgatagc	ctggccgtga	gcctggggcga	aaggggccacc	60
atcaactgca	gggccagcaa	gagcgtgagc	gctgccggct	acaacttcac	gcactggtac	120
cagcagaagc	ccggccagcc	ccccaaaggtg	ctgatctact	acgcctccaa	cctggagagc	180
ggcgtgccag	acaggttcag	cggatctggc	agcggcaccg	acttcaccct	gaccactctca	240
agcctgcagg	ccgaggacgt	cgccgtgtac	tactgcctgc	acagcaggga	gttccccttc	300
acctttggcg	gcggcaccaa	ggtggagatc	aagcgtacgg	tggccgcccc	cagcgtgttc	360
atcttccccc	ccagcgatga	gcagctgaag	agcggcaccg	ccagcgtggt	gtgtctgctg	420
aacaacttct	acccccggga	ggccaaggtg	cagtgggaag	tggacaatgc	cctgcagagc	480
ggcaacagcc	aggagagcgt	gaccgagcag	gacagcaagg	actccacctc	cagcctgagc	540
agcaccctga	ccctgagcaa	ggccgactac	gagaagcaca	aggtgtacgc	ctgtgaggtg	600
accaccagg	gcctgtccag	ccccgtgacc	aagagcttca	accggggcga	gtgc	654

```
<210> 72
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 72															
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	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Ala
			20					25					30		
Gly	Tyr	Asn	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Val	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp
	50					55				60					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70					75					80
Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	His	Ser	Arg

				85					90					95			
Glu	Phe	Pro	Phe	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> 73

<211> 360

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 73

```

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcgggcggc ctggtccagc ccggcggggag cctgagactc 60
tcttgcgccg ctagcggcctt caccttcagc tacgccatga gctgggtgag gcaggccccc 120
ggcaagggcc tggagtgggt ggccaccatc agcgacggcg gcagcttcac ctactatctg 180
gacaacgtga ggggcagggt caccatcagc agggacaacg ccaagaacag cctgtacctg 240
cagatgaaca gcctgagggc cgaggatacc gccgtgtact actgcgccag ggacgtcggc 300
cacaccacct tctggtactt cgacgtctgg ggcaggggca cactagtgc cgtgtccagc 360

```

<210> 74

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<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	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
		20					25					30					
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
	35					40					45						
Ala	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Asn	Val		

50		55		60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr				
65		70		75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				80
	85		90	95
Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly				
	100		105	110
Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115		120	

<210> 75

<211> 1353

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 75

```

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggcggc ctggtccagc ccggcggggag cctgagactc 60
tcttgcgccg ctagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gaggcaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggccacc atcagcgacg gcggcagctt cacctactat 180
ctggacaacg tgaggggagc gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgccgtgt actactgcg cagggacgtc 300
ggccacacca ccttctggta cttcgacgtc tggggcaggg gcacactagt gaccgtgtcc 360
agcgccagca ccaaggggcc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctgggt aaggactact tccccgaacc ggtgaccgtg 480
tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtgggt accgtgcccc gcagcagcct gggcacccag 600
acctacatct gtaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
ccaagagct gtgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccccca gctgctggga 720
ggccccagcg tgttcctggt cccccccaag cctaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 780
cccagagtga cctgtgtggt ggtggatgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaat gccaagacca agcccaggga ggagcagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgtaaagt gtccaacaag gccctgcctg cccctatcga gaaaaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagagagccc caggtgtaca ccctgcccc tagcagagat 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgctgtgga agggcttcta cccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgatggcag cttcttcctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggccctgca caatcactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccctggc aag 1353

```

<210> 76

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<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	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Thr	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Asn	Val
	50					55					60				
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Asp	Val	Gly	His	Thr	Thr	Phe	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly
			100					105					110		
Arg	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	Lys	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	Asp	Glu	Leu	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> 5
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 77
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 78
 Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 79
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 79

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr		
			20					25					30				
Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ala	Val	Ile	Trp	Arg	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Met		
	50					55					60						
Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu		
65				70						75					80		
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85				90					95				
Lys	Ser	Pro	Asn	Ser	Asn	Phe	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Arg		
			100					105					110				

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 80

<211> 213

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 80

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
           20           25           30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Glu
           35           40           45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
           50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu
65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
           85           90           95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
           100           105           110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
           115           120           125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
           130           135           140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145           150           155           160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
           165           170           175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
           180           185           190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
           195           200           205
Asn Arg Gly Glu Cys
           210

```

<210> 81

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

<400> 81

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
           20           25           30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
           50           55           60
Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65           70           75           80

```

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Lys	Ser	Pro	Asn	Ser	Asn	Phe	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Arg
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

```
<210> 82
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Người Homo sapiens và Loài chuột Mus musculus

```

<400> 82
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20          25          30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Glu
      35          40          45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      50          55          60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu
65          70          75          80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
          85          90          95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100          105

```

```
<210> 83
<211> 759
<212> DNA
<213> Người Homo sapiens
```

<400>	83					
atgggggtac	tgctcacaca	gaggacgctg	ctcagtctgg	tccttgcact	cctgtttcca	60
agcatggcga	gcatggcggc	tataggcagc	tgctcgaaag	agtaccggt	gctccttggc	120
cagctccaga	agcagacaga	tctcatgcag	gacaccagca	gactcctgga	cccctatata	180
cgtatccaag	gcctggatgt	tcctaaactg	agagagcact	gcagggagcg	ccccggggcc	240
ttccccagtg	aggagaccct	gagggggctg	ggcaggcggg	gcttcctgca	gacctcaat	300
gccacactgg	gctgcgtcct	gcacagactg	gccgacttag	agcagcgcc	ccccaaaggcc	360
caggatttgg	agaggtctgg	gctgaacatc	gaggacttgg	agaagctgca	gatggcgagg	420
ccgaacatcc	tcgggctcag	gaacaacatc	tactgcatgg	cccagctgct	ggacaactca	480
gacacggctg	agcccacgaa	ggctggccgg	ggggcctctc	agccgcccac	ccccaccct	540
gcctcggatg	cttttcagcg	caagctggag	ggctgcaggt	tcctgcatgg	ctaccatcgc	600
ttcatgcact	cagtggggcg	ggtcttcagc	aagtgggggg	agagcccgaa	ccggagccgg	660
agacacagcc	cccaccaggc	cctgaggaag	ggggtgcgca	ggaccagacc	ctccaggaaa	720
ggcaagagac	tcatgaccag	gggacagctg	ccccggtag			759

<210> 84
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Người Homo sapiens

<400> 84

Met	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Gln	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Leu	Ala
1				5					10					15	
Leu	Leu	Phe	Pro	Ser	Met	Ala	Ser	Met	Ala	Ala	Ile	Gly	Ser	Cys	Ser
			20					25					30		
Lys	Glu	Tyr	Arg	Val	Leu	Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Lys	Gln	Thr	Asp	Leu
		35					40					45			
Met	Gln	Asp	Thr	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ile	Gln	Gly
	50					55					60				
Leu	Asp	Val	Pro	Lys	Leu	Arg	Glu	His	Cys	Arg	Glu	Arg	Pro	Gly	Ala
65					70					75					80
Phe	Pro	Ser	Glu	Glu	Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Gly	Arg	Arg	Gly	Phe	Leu
				85					90					95	
Gln	Thr	Leu	Asn	Ala	Thr	Leu	Gly	Cys	Val	Leu	His	Arg	Leu	Ala	Asp
			100					105					110		
Leu	Glu	Gln	Arg	Leu	Pro	Lys	Ala	Gln	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Gly	Leu
		115					120					125			
Asn	Ile	Glu	Asp	Leu	Glu	Lys	Leu	Gln	Met	Ala	Arg	Pro	Asn	Ile	Leu
	130					135					140				
Gly	Leu	Arg	Asn	Asn	Ile	Tyr	Cys	Met	Ala	Gln	Leu	Leu	Asp	Asn	Ser
145					150					155					160
Asp	Thr	Ala	Glu	Pro	Thr	Lys	Ala	Gly	Arg	Gly	Ala	Ser	Gln	Pro	Pro
				165					170					175	
Thr	Pro	Thr	Pro	Ala	Ser	Asp	Ala	Phe	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Gly	Cys
			180					185					190		
Arg	Phe	Leu	His	Gly	Tyr	His	Arg	Phe	Met	His	Ser	Val	Gly	Arg	Val
		195					200					205			
Phe	Ser	Lys	Trp	Gly	Glu	Ser	Pro	Asn	Arg	Ser	Arg	Arg	His	Ser	Pro
	210					215					220				
His	Gln	Ala	Leu	Arg	Lys	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Arg	Pro	Ser	Arg	Lys
225					230					235					240
Gly	Lys	Arg	Leu	Met	Thr	Arg	Gly	Gln	Leu	Pro	Arg				
				245					250						