

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể của người và đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể của người mà gắn kết đặc hiệu với protein giống angiopoietin 3 của người (human angiopoietin-like protein 3-hANGPTL3), trong đó kháng thể và đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể này được dùng để điều trị bệnh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gen mã hóa protein giống angiopoietin 3 (angiopoietin-like protein 3-ANGPTL3) được xác định từ cơ sở dữ liệu EST dựa vào các trình tự tín hiệu và các vòng xoắn lưỡng tính, và ADN bổ trợ ANGPTL3 có chiều dài đầy đủ được phân lập sau đó từ thư viện ADN bổ trợ của gan/lách bào thai người (Conklin et al., 1999, Genomics 62: 477-482). Protein hANGPTL3 có 460-axit amin được phân tích có chung 76% mức đồng nhất trình tự axit amin với ANGPTL3 của chuột và có cấu trúc đặc thù của angiopoietin; tức là, peptit tín hiệu, vùng vòng xoắn mở rộng được dự đoán là tạo ra vòng xoắn kép dạng dime hoặc trime, peptit liên kết ngắn, và vùng tương đồng fibrinogen hình cầu (fibrinogen homology domain-FD) (Conklin et al., 1999, trên đây). ANGPTL3 chứa bốn gốc xystein bảo toàn có liên quan đến các liên kết disulfua trong phân tử trong FD; tuy nhiên, ANGPTL3 không chứa hai xystein khác cũng như không chứa môtip gắn kết canxi đặc thù được tìm thấy trong FD của angiopoietin (các ANG; tức là, ANG1, ANG2 và ANG4) (Conklin et al., 1999, trên đây), mà là các yếu tố phát triển protein mà thúc

đẩy sự tạo thành mạch. Ngoài ra, không giống như ANG, ANGPTL3 không gắn kết với Tie2; tuy nhiên, nó cũng có thể cảm ứng sự tạo thành mạch bằng cách gắn kết với integrin $\alpha_v\beta_3$ thông qua FD ở đầu C của nó (Camenisch et al., 2002, J Biol Chem 277:17281-17290).

Số liệu *in vivo* toàn diện được thu từ mẫu chuột KK giao phối xa, mà béo phì vừa phải với lượng insulin, glucoza và lipit trong huyết tương cao bất thường, giống như bệnh đái tháo đường typ 2 ở người (Koishi et al., 2002, Nature Genetics 30:151 -157). Tuy nhiên, một chủng phụ của chuột, KK/San, được nhận thấy là có biểu hiện lượng lipit trong huyết tương thấp bất thường (giảm lipit huyết), mà được di truyền như là tính lặn theo thuyết di truyền Mendel. Locut được lập bản đồ trên nhiễm sắc thể 4 và cuối cùng được xác định là gen mã hóa ANGPTL3, mà chứa đoạn cài trình tự 4-bp nucleotit ở exon 6 (Koishi et al., 2002, trên đây). Do đó, lượng lipit trong huyết tương tăng sau khi chuyển gen ANGPTL3 qua trung gian adenovirut, hoặc sau khi sử dụng ANGPTL3 của người tái tổ hợp ở chuột KK/San. Tác dụng này không có liên quan đến sự thay đổi ở các gen có liên quan đến sự tổng hợp cholesterol, sự thanh thải lipoprotein hoặc sự oxy hóa NEFA (Koishi et al., 2002, trên đây). Hơn thế nữa, phân tích *in vitro* protein tái tổ hợp cho thấy ANGPTL3 ức chế trực tiếp hoạt tính lipoprotein lipaza (LPL), chứng tỏ nó là chất điều biến chuyển hóa lipit mà điều hòa lượng lipoprotein (VLDL) triglyxerit mật độ rất thấp thông qua sự ức chế hoạt tính LPL (Shimizu-gawa et al., 2002, J Biol Chem 277(37):33742-33748). Được nhận thấy rằng vùng xoắn kép ở đầu N, đặc biệt là các gốc 17-165 ở vùng đầu N, và không phải vùng FD ở đầu C, của ANGPTL3, cần thiết cho hoạt tính làm tăng lượng triglyxerit trong huyết tương ở chuột (Ono et al., 2003, J Biol Chem 278:41804-41809).

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của ANGPTL3 của người được thể hiện trong SEQ ID NOS:161 và 162, tương ứng. Kháng thể kháng ANGPTL3 được mô tả trong, ví dụ, WO2008/073300 và US 7,935,796.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng của người có chiều dài đầy đủ (monoclonal antibody-mAb) và các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng mà gắn kết đặc hiệu và trung hòa, ức chế, phong bế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào, ít nhất một hoạt tính của ANGPTL3, cụ thể là, ANGPTL3 của người (SEQ ID NO:161). Hoạt tính của ANGPTL3 mà có thể được trung hòa, được ức chế, được phong bế, được phá hủy, được làm giảm hoặc được can thiệp bởi các kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn của chúng, bao gồm, nhưng không theo cách làm giới hạn, ức chế hoạt tính LPL, cảm ứng sự tạo mạch, và tác dụng tương tự. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn của nó có thể trung hòa, ức chế, phong bế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào, hoạt tính của hANGPTL3 bằng cách gắn kết với epitop của hANGPTL3 mà có liên quan trực tiếp đến hoạt tính đích của hANGPTL3. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn của nó có thể trung hòa, ức chế, phong bế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào, hoạt tính của hANGPTL3 bằng cách gắn kết với epitop của hANGPTL3 mà không có liên quan trực tiếp đến hoạt tính đích của hANGPTL3, nhưng kháng thể hoặc đoạn gắn kết của chúng ức chế, phong bế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào hoạt tính đích của hANGPTL3 trong không gian hoặc trong cấu trúc. Theo một phương án khác nữa, kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn của nó gắn kết với epitop của hANGPTL3 mà không có liên quan trực tiếp đến hoạt tính đích (ví dụ, ức chế hoạt tính LPL, cảm ứng sự tạo mạch, và hoạt tính tương tự) của hANGPTL3 (tức là, kháng thể không phong bế), nhưng kháng thể này hoặc đoạn gắn kết của nó dẫn đến làm tăng sự thanh thải hANGPTL3 khỏi hệ tuần hoàn, so với sự thanh thải

hANGPTL3 khi không có mặt kháng thể hoặc đoạn của nó, nhờ đó gián tiếp ức chế, phong bế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào, hoạt tính của hANGPTL3. Sự thanh thải hANGPTL3 khỏi hệ tuần hoàn có thể đặc biệt được tăng lên bằng cách kết hợp hai hoặc nhiều kháng thể không phong bế khác nhau mà không cạnh tranh với nhau để gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3.

Kháng thể (Ab) có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ bao gồm phần gắn kết kháng nguyên (ví dụ, Fab, F(ab')₂ hoặc đoạn scFv), và có thể được cải biến để tác động đến chức năng, ví dụ để làm giảm các chức năng của chất tác động còn lại (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146 và 180, hoặc trình tự hầu như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:2, 18, 34, 66, 82, 114, và 180. Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:66.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154 và 188, hoặc trình tự hầu như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ

ID NO:10, 26, 42, 74, 90, 122 và 188. Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 74.

Theo các phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 và 180/188. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR và LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 66/74, 82/90, 114/122 và 180/188. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR và LCVR nêu trong SEQ ID NO:66/74.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa trình tự axit amin của vùng quyết định bổ sung chuỗi nặng 3 (heavy chain complementarity determining region 3-HCDR3) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152 và 186, hoặc trình tự hầu như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%; và trình tự axit amin của CDR3 chuỗi nhẹ (light chain CDR3-LCDR3) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160 và 194, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 bao gồm SEQ ID NO:8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160 hoặc 186/194. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 bao gồm SEQ ID NO:8/16, 24/32, 40/48, 72/80, 88/96, 120/128 hoặc 186/194. Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc đoạn

của nó chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 bao gồm SEQ ID NO:72/80.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó còn chứa trình tự axit amin của CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148 và 182, hoặc trình tự hầu như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và trình tự axit amin của CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150 và 184, hoặc trình tự hầu như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và tùy ý còn chứa trình tự axit amin của CDR1 chuỗi nhẹ (LCCDR1) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156 và 190, hoặc trình tự hầu như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và/hoặc trình tự axit amin của CDR2 chuỗi nhẹ (LCCDR2) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158 và 192, hoặc trình tự hầu như tương tự của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%.

Theo cách khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa tổ hợp HCDR1/HCDR2/HCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:4/6/8, 20/22/24, 36/38/40, 52/54/56, 68/70/72, 84/86/88, 100/102/104, 116/118/120, 132/134/136, 148/150/152 và 182/184/186; và/hoặc tổ hợp LCDR1/LCDR2/LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:12/14/16, 28/30/32, 44/46/48, 60/62/64, 76/78/80, 92/94/96, 108/110/112, 124/126/128, 140/142/144, 156/158/160 và 190/192/194. Theo một phương án, các trình tự axit amin của CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm tổ hợp trình tự CDR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48,

52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 100/102/104/108/110/112, 116/118/120/124/126/128, 132/134/136/140/142/144, 148/150/152/156/158/160 và 182/184/186/190/192/194. Theo một phương án, các trình tự axit amin của CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm tổ hợp trình tự CDR nêu trong SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 116/118/120/124/126/128 hoặc 182/184/186/190/192/194. Theo một phương án khác, các trình tự axit amin của CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm tổ hợp trình tự CDR nêu trong SEQ ID NO:68/70/72/76/78/80.

Theo một phương án có liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa các vùng CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong cặp HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 và 180/188. Các phương pháp và kỹ thuật xác định CDR trong các trình tự axit amin của HCVR và LCVR là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được dùng để xác định CDR trong các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được mô tả ở đây. Các định nghĩa thông thường mà có thể được dùng để xác định ranh giới của CDR bao gồm định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Theo các thuật ngữ thông thường, định nghĩa Kabat được dựa trên sự biến đổi trình tự, định nghĩa Chothia được dựa trên vị trí của các vùng cấu trúc vòng, và định nghĩa AbM là sự kết hợp giữa các phương pháp Kabat và Chothia. Ví dụ, xem tài liệu, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); và Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Cơ sở dữ liệu công khai cũng sẵn có để xác định các trình tự CDR trong kháng thể. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa các

trình tự CDR nằm trong cặp HCVR và LCVR nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 66/74, 82/90, 114/122 hoặc 180/188. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa các trình tự CDR nằm trong cặp HCVR và LCVR nêu trong SEQ ID NO:66/74.

Theo một phương án có liên quan khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh để gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3, trong đó kháng thể này hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên chứa các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong cặp trình tự HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 hoặc 180/188. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên cạnh tranh để gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO:66/74. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên cạnh tranh để gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa tổ hợp trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm 4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 100/102/104/108/1 10/1 12, 116/1 18/120/124/126/128, 132/134/136/140/142/144, 148/150/152/156/158/160 và 182/184/186/190/192/194. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cạnh tranh để gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3, trong đó kháng thể hoặc đoạn của nó chứa tổ hợp trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NOS: 68/70/72/76/78/80.

Theo một phương án khác có liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với cùng một epitop trên hANGPTL3 mà được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn của nó chứa các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ cặp trình tự HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122,

130/138, 146/154 hoặc 180/188. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên theo sáng chế gắn kết với cùng một epitop trên hANGPTL3 mà được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO:66/74. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó theo sáng chế gắn kết với cùng một epitop trên hANGPTL3 mà được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn của nó chứa tổ hợp trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm 4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 100/102/104/108/110/112, 116/118/120/124/126/128, 132/134/136/140/142/144, 148/150/152/156/158/160 và 182/184/186/190/192/194. Theo một phương án, epitop này được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn của nó chứa tổ hợp trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:68/70/72/76/78/80.

Theo một khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 phân lập hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với epitop nằm trong vùng xoắn kép ở đầu N ở các gốc từ 17 đến 209 nêu trong SEQ ID NO:161 và trung hòa, ức chế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào, ít nhất một hoạt tính của hANGPTL3. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong vùng xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3 (SEQ ID NO:161) và trung hòa, ức chế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào, ít nhất một hoạt tính của hANGPTL3, miễn là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO: 170 (tương ứng với các gốc Glu32 đến Leu57 của hANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO: 161). Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc từ 17 đến 200, 17 đến 100, 17 đến 70, 17 đến 65, 17 đến 60, 17 đến 57, hoặc 17 đến 50, của hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), tùy ý miễn là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO: 170. Theo một phương án khác,

kháng thể hoặc đoạn của nó gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc từ 40 đến 200, từ 40 đến 100, từ 40 đến 70, từ 50 đến 200, từ 50 đến 100, từ 50 đến 70, từ 58 đến 200, từ 58 đến 100, từ 58 đến 70, từ 58 đến 68, hoặc từ 61 đến 66, của hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), tùy ý miễn là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:170. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể gắn kết với epitop mà có thể bao gồm nhiều hơn một epitop được liệt kê hoặc các gốc nằm trong vùng xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3, tùy ý miễn là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:170.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn của nó, cụ thể là, phân tử bất kỳ trong số các phân tử mô tả trên đây. Các vector biểu hiện tái tổ hợp mang các axit nucleic theo sáng chế, và tế bào chủ, ví dụ tế bào vi khuẩn, ví dụ E. coli, hoặc tế bào động vật có vú, như tế bào CHO, mà các vector này được đưa vào, cũng được mô tả bởi sáng chế, như là các phương pháp tổng hợp kháng thể bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong các điều kiện cho phép tổng hợp kháng thể, và thu hồi kháng thể đã được tổng hợp.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn của nó chứa HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145 và 179, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:1, 17, 33, 65, 81, 113 hoặc 179. Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:65.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa LCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao

gồm SEQ ID NO:9, 25, 4, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153 và 187, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa LCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:9, 25, 41, 73, 89, 121 hoặc 187. Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa LCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:73.

Theo các phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) được mã hóa bởi cặp trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1/9, 17/25, 33/41, 49/57, 65/73, 81/89, 97/105, 113/121, 129/137, 145/153 và 179/187. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR/LCVR được mã hóa bởi cặp trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:1/9, 17/25, 33/41, 65/73, 81/89, 113/121 hoặc 179/187. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCVR/LCVR được mã hóa bởi cặp trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:65/73.

Theo một phương án, sáng chế mô tả kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa vùng HCDR3 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151 và 185, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và vùng LCDR3 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159 và 193, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCDR3 và LCDR3 được mã hóa bởi cặp trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:7/15, 23/31, 39/47, 55/63, 71/79, 87/95, 103/111, 119/127, 135/143, 151/159 và 185/193. Theo một phương án khác, kháng thể

hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCDR3 và LCDR3 được mã hóa bởi cặp trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:7/15, 23/31, 39/47, 71/79, 87/95, 119/127 hoặc 185/193. Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa cặp trình tự HCDR3 và LCDR3 được mã hóa bởi cặp trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:71/79.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó còn chứa vùng HCDR1 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147 và 181, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và vùng HCDR2 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149 và 183, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%; và tùy ý còn chứa vùng LCDR1 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155 và 189, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và/hoặc vùng LCDR2 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157 và 191, hoặc trình tự gần tương đồng có mức đồng nhất ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%.

Theo cách khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể chứa tổ hợp HCDR1/HCDR2/HCDR3 được mã hóa bởi tổ hợp trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:3/5/7, 19/21/23, 35/37/39, 51/53/55, 67/69/71, 83/85/87, 99/101/103, 115/117/119, 131/133/135, 147/149/151 và 181/183/185; và/hoặc tổ hợp LCDR1/LCDR2/LCDR3 được mã hóa bởi tổ hợp trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:11/13/15, 27/29/31, 43/45/47, 59/61/63, 75/77/79, 91/93/95, 107/109/111, 123/125/127, 139/141/143, 155/157/159 và

189/191/193. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hóa bởi tổ hợp trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:67/69/71/75/77/79.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất kháng thể của người kháng ANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được mã hóa bởi các đoạn trình tự nucleotit thu được từ các trình tự dòng tế bào mầm V_H , D_H và J_H , và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được mã hóa bởi các đoạn trình tự nucleotit thu được từ các trình tự dòng tế bào mầm V_K và J_K , trong đó HCVR và LCVR được mã hóa bởi các đoạn trình tự nucleotit thu được từ tổ hợp các gen dòng tế bào mầm được chọn từ nhóm bao gồm: (i) V_{H3-43} , D_{H3-3} , J_{H3} , V_{K1-5} và J_{K2} ; (ii) V_{H3-11} , D_{H1-1} , J_{H4} , V_{K1-39} và J_{K4} ; (iii) V_{H3-30} , D_{H1-7} , J_{H6} , V_{K1-5} và J_{K1} ; (iv) V_{H3-30} , D_{H1-26} , J_{H6} , V_{K1-12} và J_{K3} ; (v) V_{H3-30} , D_{H3-10} , J_{H6} , V_{K1-12} và J_{K3} ; và (vi) V_{H3-23} , D_{H3-10} , J_{H4} , V_{K1-5} và J_{K1} .

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3 với hằng số phân ly cân bằng (K_D) bằng 7nM hoặc thấp hơn, 6nM hoặc thấp hơn, 5nM hoặc thấp hơn, 4nM hoặc thấp hơn, 3nM hoặc thấp hơn, 2nM hoặc thấp hơn, hoặc 1nM hoặc thấp hơn, như được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, BIACORE™). Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có K_D bằng 800pM hoặc thấp hơn, 700pM hoặc thấp hơn; 600pM hoặc thấp hơn; 500pM hoặc thấp hơn; 400pM hoặc thấp hơn; 300pM hoặc thấp hơn; 200pM hoặc thấp hơn; 100pM hoặc thấp hơn; hoặc 50pM hoặc thấp hơn.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với protein hANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO: 161, nhưng không phản ứng chéo với protein có liên quan, như protein giống angiopoietin của người 4 (hANGPTL4; SEQ ID

NO:164), như được xác định bởi, ví dụ, ELISA, thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt, hoặc công nghệ LUMINEX® XMAP®, như được mô tả ở đây. ANGPTL4 là một protein được tiết khác mà được biết đến là làm giảm hoạt tính LPL và có vùng xoắn kép ở đầu N và vùng giống fibrinogen ở đầu C (Ge et al., 2004, J Biol Chem 279:2038-2045; Yau et al., 2009, J Biol Chem 284:11942-1 1952). Theo các phương án có liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với protein hANGPTL3 và phản ứng chéo với protein hANGPTL4. Theo các phương án nhất định, ái lực gắn kết của kháng thể hANGPTL3 hoặc đoạn của nó với protein hANGPTL4 là 75% hoặc thấp hơn, hoặc 50% hoặc thấp hơn, ái lực gắn kết của kháng thể hoặc đoạn của nó với protein hANGPTL3.

Theo một phương án có liên quan khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà không phản ứng chéo với ANGPTL3 của chuột nhắt (mANGPTL3; SEQ ID NO:163), hoặc ANGPTL3 của chuột cống (rANGPTL3; SEQ ID NO:175), nhưng phản ứng chéo với ANGPTL3 của khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (MfANGPTL3), ví dụ, với các gốc 17-170 ở đầu N nêu trong SEQ ID NO: 177 (một phần trình tự axit amin của MfANGPTL3). Theo một phương án có liên quan khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn của nó mà phản ứng chéo với MfANGPTL3, mANGPTL3 và rANGPTL3.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 có kiểu glycosyl hóa cải biến. Trong một vài ứng dụng, cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể là hữu dụng, hoặc ví dụ loại bỏ gốc fucoza để làm tăng chức năng độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity-ADCC) (xem tài liệu Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Ở các ứng dụng khác, việc loại bỏ vị trí N-glycosyl hóa có thể làm giảm các phản ứng miễn dịch không mong muốn chống lại kháng thể điều trị, hoặc làm tăng ái lực của kháng thể. Ở các ứng dụng khác nữa, cải biến galactosyl hóa có thể

được tiến hành để cải biến tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity-CDC).

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể của người tái tổ hợp hoặc đoạn của nó mà gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3 và chất mang được dụng. Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc các đoạn của chúng theo sáng chế, mà không cạnh tranh chéo với nhau, và chất mang được dụng. Theo một phương án, được phẩm theo sáng chế có thể chứa hai hoặc nhiều kháng thể không phong bế, mà không cạnh tranh với nhau để gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3 và là hữu hiệu trong việc thanh thải hANGPTL3 khỏi hệ tuần hoàn. Các hỗn hợp kháng thể không phong bế thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hỗn hợp kháng thể chứa cặp trình tự HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) nêu trong: (i) SEQ ID NO:82/90 và 180/188, tương ứng; (ii) SEQ ID NO: 1 14/122 và 180/188, tương ứng; (iii) SEQ ID NO:82/90 và 18/26, tương ứng; hoặc (iv) SEQ ID NO: 1 14/122 và 18/26, tương ứng.

Theo các phương án có liên quan, sáng chế đề xuất chế phẩm mà là hỗn hợp của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, và chất điều trị thứ hai. Chất điều trị thứ hai này có thể là một hoặc nhiều chất bất kỳ như (1) chất ức chế 3-hydroxy-3-metylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA) reductaza, như cerivastatin, atorvastatin, simvastatin, pitavastatin, rosuvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, và chất tương tự; (2) chất ức chế tái hấp thu cholesterol và/hoặc tái hấp thu axit mật; (3) niacin, mà làm tăng hiện tượng dị hóa lipoprotein; (4) fibrat hoặc axit carboxylic lưỡng tính, mà làm giảm lượng lipoprotein mật độ thấp (low-density lipoprotein-LDL), cải thiện lượng lipoprotein mật độ cao (high-density lipoprotein-HDL) và TG, và làm giảm số cơn đau tim không gây tử vong; và (5) các chất hoạt hóa yếu tố phiên mã LXR mà đóng một vai trò trong việc loại trừ cholesterol như 22-hydroxycholesterol, hoặc hỗn hợp cố định như ezetimibe cùng với

simvastatin; statin và nhựa gắn kết axit mật (ví dụ, cholestyramin, colestipol, colesevelam), hỗn hợp cố định gồm niacin và statin (ví dụ, niacin và lovastatin); hoặc với các chất làm giảm lipid khác như este etyl của axit béo omega-3 (ví dụ, omacor). Hơn thế nữa, chất điều trị thứ hai có thể là một hoặc nhiều chất ức chế ANGPTL3 khác cũng như là các chất ức chế các phân tử khác, như ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6 và proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9), mà có liên quan đến sự chuyển hóa lipid, cụ thể là, sự cân bằng nội mô cholesterol và/hoặc triglycerit. Các chất ức chế các phân tử này bao gồm các phân tử nhỏ và kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với các phân tử này và phong bế hoạt tính của chúng.

Theo các phương án có liên quan, chất điều trị thứ hai có thể là một hoặc nhiều chất chống ung thư, như chất hóa trị, chất chống tạo mạch, chất ức chế phát triển, chất gây độc tế bào, chất gây chết theo chương trình, và các chất khác đã biết rõ trong lĩnh vực điều trị bệnh ung thư hoặc các bệnh tăng sinh khác, cũng như là các chất điều trị khác, như chất giảm đau, chất chống viêm, bao gồm các dược chất chống viêm không steroid (non-steroidal anti-inflammatory drug-NSAID), như chất ức chế Cox-2, và các chất tương tự, để làm thuyên giảm và/hoặc làm giảm các triệu chứng đi kèm bệnh ung thư/khối u.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất phương pháp làm trung hòa, ức chế, phong bế, phá hủy, làm giảm hoặc can thiệp vào, hoạt tính hANGPTL3 bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu để điều trị dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và, tùy ý một hoặc nhiều chất điều trị khác được mô tả trên đây. Kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn của chúng theo sáng chế có

thể là kháng thể trung hòa hoặc kháng thể không phong bế kháng ANGPTL3, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo các phương án có liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng sự thanh thải hANGPTL3 khỏi hệ tuần hoàn của đối tượng cần điều trị, bao gồm cho đối tượng này sử dụng ít nhất hai kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn của chúng theo sáng chế mà không cạnh tranh với nhau để gắn kết với hANGPTL3 và tốt hơn là không phong bế ít nhất một hoạt tính của hANGPTL3 (tức là, kháng thể không phong bế). Ít nhất một hoạt tính của hANGPTL3 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở ức chế hoạt tính LPL, cảm ứng sự tạo mạch, và hoạt tính tương tự. Theo một phương án, một hỗn hợp gồm ít nhất hai kháng thể kháng hANGPTL3 không phong bế hoặc các đoạn của chúng làm tăng sự thanh thải hANGPTL3 khỏi hệ tuần hoàn ít nhất là 20%, 30 %, 40%, 50%, 60%, 70%, hoặc 80%, so với việc không sử dụng kháng thể hoặc các đoạn của chúng. Lượng hANGPTL3 trong hệ tuần hoàn có thể được đo bằng các thử nghiệm *in vitro* đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và các thử nghiệm được mô tả ở đây. Theo một phương án khác, hỗn hợp gồm ít nhất hai kháng thể kháng hANGPTL3 không phong bế chứa các cặp trình tự HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) nêu trong: (i) SEQ ID NO:82/90 và 180/188, tương ứng; (ii) SEQ ID NO: 114/122 và 180/188, tương ứng; (iii) SEQ ID NO:82/90 và 18/26, tương ứng; hoặc (iv) SEQ ID NO:114/122 và 18/26, tương ứng.

Bệnh được điều trị bằng các phương pháp theo sáng chế là bệnh hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ mà được cải thiện, được làm thuyên giảm, được ức chế hoặc được phòng ngừa, hoặc tỷ lệ tái phát bệnh được làm giảm, so với tỷ lệ tái phát mà không điều trị bằng kháng thể kháng hANGPTL3 (ví dụ, bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến ANGPTL3), bằng cách loại bỏ, ức chế, làm giảm, hoặc mặt khác can thiệp vào hoạt tính của ANGPTL3. Ví dụ về các bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế

bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến sự chuyển hóa lipid, như tăng lipid huyết, tăng lipoprotein huyết và rối loạn lipid huyết, bao gồm rối loạn lipid huyết gây xơ vữa động mạch, rối loạn lipid huyết do tiểu đường, tăng triglycerit huyết, bao gồm tăng triglycerit huyết nghiêm trọng với TG > 1000mg/dl, tăng cholesterol huyết, nhiễm dưỡng chấp máu, rối loạn lipid huyết hỗn hợp (bệnh béo phì, hội chứng chuyển hóa, bệnh đái tháo đường, v.v.), hội chứng loạn dưỡng chất mỡ, hội chứng teo mô mỡ, và hội chứng tương tự, mà được gây ra bởi, ví dụ, hoạt tính LPL giảm và/hoặc thiếu hụt LPL, hoạt tính của thụ thể LDL (LDLR) giảm và/hoặc sự thiếu hụt thụ thể LDL (ví dụ, tăng cholesterol huyết có tính gia đình đồng hợp tử với LDLR^{-/-}), ApoC2 đã thay đổi, sự thiếu hụt ApoE, ApoB tăng, tăng tổng hợp và/hoặc giảm bài tiết lipoprotein tỷ trọng rất thấp (VLDL), điều trị bằng được chất nhất định (ví dụ, rối loạn lipid huyết do điều trị bằng glucocorticoid gây ra), yếu tố di truyền bẩm sinh, chế độ ăn, lối sống, và yếu tố tương tự. Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể phòng ngừa hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến hoặc do tăng lipid huyết, tăng lipoprotein huyết, và/hoặc rối loạn lipid huyết gây ra, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh tim mạch, như bệnh xơ vữa động mạch, bệnh phình mạch, bệnh tăng huyết áp, bệnh viêm họng, đột quỵ, bệnh mạch máu não, bệnh suy tim xung huyết, bệnh động mạch vành, bệnh nhồi máu cơ tim, bệnh mạch máu ngoại vi, và bệnh tương tự; bệnh viêm tụy cấp; bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (nonalcoholic steatohepatitis-NASH); rối loạn đường máu, như bệnh đái tháo đường; bệnh béo phì, và bệnh tương tự.

Các ví dụ khác về bệnh hoặc rối loạn mà có thể điều trị được bằng các phương pháp theo sáng chế bao gồm bệnh ung thư/khối u cũng như là bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến sự tạo mạch không thuộc khối u, bao gồm bệnh tạo mạch ở mắt, như bệnh thoái hóa điểm vàng có liên quan đến tuổi, tắc tĩnh mạch trung tâm võng mạc hoặc tắc tĩnh mạch nhánh võng mạc, bệnh võng mạc đái tháo đường, bệnh võng mạc ở trẻ sinh non, và bệnh tương tự, bệnh viêm,

như bệnh viêm khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis-RA), bệnh vẩy nến, và bệnh tương tự.

Các phương án khác là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào phần mô tả chi tiết sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng trình tự của các peptit 1-3 được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết kháng thể kháng hANGPTL3 (ví dụ 5) so với các tỷ lệ có liên quan của trình tự hANGPTL3 (tức là, nằm trong các gốc từ 30 đến 70 nêu trong SEQ ID NO:161 hoặc GenBank #NP_055310). Peptit 1 (đối chứng: peptit ANGPTL4; SEQ ID NO:168); Peptit 2 (peptit ANGPTL3; SEQ ID NO:169); và peptit 3 (peptit ANGPTL3; SEQ ID NO:170).

Fig.2 thể hiện các kết quả của kháng thể kháng hANGPTL3 gắn kết với các peptit xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3 (peptit 2 và 3) hoặc hANGPTL4 (Peptit  đối chứng isotyp; và : kháng thể H4H1276S.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả chi tiết, cần hiểu rằng sáng chế không giới hạn ở các phương pháp và các điều kiện thử nghiệm cụ thể được mô tả, vì thế các phương pháp và điều kiện thử nghiệm có thể được thay đổi. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định là làm giới hạn, vì phạm vi của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn ở yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa như thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mặc dù, các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng để tiến hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả ở đây.

Định nghĩa

Thuật ngữ "protein giống angiopoietin 3 của người" hoặc "hANGPTL3", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ ANGPTL3 có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO:162 và trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 161, hoặc đoạn có hoạt tính sinh học của nó.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch gồm có bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bởi liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng cố định chuỗi nặng (C_H ; gồm có các vùng CH1, CH2 và CH3). Mỗi chuỗi nhẹ gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng cố định chuỗi nhẹ (C_L). HCVR và LCVR có thể còn được chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định bổ sung (complementarity determining region-CDR), nằm rải rác với các vùng mà được bảo toàn, được gọi là vùng khung (framework region-FR). Mỗi HCVR và LCVR gồm có ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amin đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4.

Sự thay thế một hoặc nhiều gốc CDR hoặc loại bỏ một hoặc nhiều CDR là cũng có thể. Kháng thể đã được mô tả trong tài liệu khoa học, trong đó một hoặc hai CDR có thể không cần thiết để gắn kết. Padlan và các đồng tác giả (1995 FASEB J. 9:133-139) đã phân tích các vùng tiếp xúc giữa các kháng thể và các kháng nguyên của chúng, dựa vào các cấu trúc tinh thể đã công bố, và đã kết luận rằng chỉ khoảng 1/5 đến 1/3 gốc CDR thực sự tiếp xúc với kháng nguyên. Padlan cũng nhận thấy rằng nhiều kháng thể, trong đó một hoặc hai CDR không có axit amin nào tiếp xúc với kháng nguyên (cũng xem tài liệu, Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Các gốc CDR không tiếp xúc với kháng nguyên có thể được xác định dựa vào các nghiên cứu trước đây (ví dụ, các gốc H60-H65 trong CDRH2 thường không cần thiết), từ các vùng của các CDR Kabat nằm ngoài các CDR

Chothia, bằng cách lập mô hình phân tử và/hoặc theo kinh nghiệm. Nếu CDR hoặc (các) gốc của nó bị loại bỏ, thì nó thường được thay thế bằng axit amin nằm ở vị trí tương ứng trong trình tự kháng thể khác của người hoặc trình tự liên ứng của các trình tự này. Các vị trí thay thế trong các CDR và axit amin để thay thế cũng có thể được lựa chọn theo kinh nghiệm. Các axit amin thay thế theo kinh nghiệm có thể được bảo toàn hoặc là các axit amin thay thế không bảo toàn.

Thuật ngữ "kháng thể của người", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ kháng thể có các vùng biến đổi và cố định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch của dòng tế bào mầm của người. mAb của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch của dòng tế bào mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến gen ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng cách đột biến soma *in vivo*), ví dụ ở các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người", như được sử dụng ở đây, không được dự định là bao gồm các mAb, trong đó các trình tự CDR thu được từ dòng tế bào mầm của loài động vật có vú khác (ví dụ, chuột nhắt), đã được ghép lên trên các trình tự FR của người.

Kháng thể của người có chiều dài đầy đủ kháng hANGPTL3 được mô tả ở đây có thể chứa một hoặc nhiều axit amin thay thế, axit amin thêm và/hoặc axit amin bị mất ở vùng khung và/hoặc vùng CDR của các vùng gấp biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng tế bào mầm tương ứng. Các đột biến này có thể dễ dàng được xác định bằng cách so sánh các trình tự axit amin được mô tả ở đây với các trình tự dòng tế bào mầm thu được từ cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế đề xuất kháng thể, và các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng, mà thu được từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được mô tả ở đây, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được gây đột

biến bằng (các) gốc tương ứng của trình tự dòng tế bào mầm mà thu được kháng thể, hoặc bằng (các) gốc tương ứng của trình tự dòng tế bào mầm khác của người, hoặc bằng cách thay thế axit amin bảo toàn các gốc dòng tế bào mầm tương ứng (nói chung các thay đổi trình tự này được dùng để chỉ ở đây là "các đột biến dòng tế bào mầm"). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu bằng các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được mô tả ở đây, có thể dễ dàng tổng hợp được nhiều kháng thể và đoạn gắn kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến ngược dòng tế bào mầm riêng biệt hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc khung và/hoặc CDR nằm trong các vùng gấp V_H và/hoặc V_L được gây đột biến ngược thành các gốc được tìm thấy ở trình tự dòng tế bào mầm ban đầu mà thu được kháng thể. Theo các phương án khác, chỉ các gốc nhất định được gây đột biến ngược thành trình tự dòng tế bào mầm ban đầu, ví dụ chỉ các gốc đột biến được tìm thấy ở 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc ở 8 axit amin cuối của FR4, hoặc chỉ các gốc đột biến được tìm thấy ở CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc trong khung và/hoặc CDR được gây đột biến thành các gốc tương ứng của trình tự dòng tế bào mầm khác (tức là, trình tự dòng tế bào mầm mà khác trình tự dòng tế bào mầm thu được kháng thể). Hơn thế nữa, kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng tế bào mầm trong vùng khung và/hoặc CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng rẽ nhất định được gây đột biến thành các gốc tương ứng của trình tự dòng tế bào mầm cụ thể, trong đó các gốc khác nhất định mà khác trình tự dòng tế bào mầm gốc được duy trì hoặc được gây đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng tế bào mầm khác. Một khi thu được, kháng thể và đoạn gắn kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng tế bào mầm có thể dễ dàng được thử nghiệm một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tính đặc hiệu gắn kết được cải thiện, ái lực gắn kết tăng, đặc tính sinh học chủ vận hoặc đối kháng được cải thiện hoặc được tăng cường (như trường hợp có thể), tính miễn dịch giảm, v.v..

Kháng thể và đoạn gắn kết kháng nguyên thu được theo cách chung này được mô tả trong sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng ANGPTL3 bao gồm các biến thể của trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả ở đây có một hoặc nhiều axit amin thay thế bảo toàn. Ví dụ, sáng chế mô tả kháng thể kháng ANGPTL3 có các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR, ví dụ, 10 hoặc ít hơn 10, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 2 hoặc 1, (các) axit amin thay thế bảo toàn so với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả ở đây. Theo một phương án, HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:487 với 10 hoặc ít hơn 10 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác, HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:487 với 8 hoặc ít hơn 8 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác, HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:487 với 6 hoặc ít hơn 6 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác, HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:487 với 4 hoặc ít hơn 4 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác nữa, HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:487 với 2 hoặc 1 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án, LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44 với 10 hoặc ít hơn 10 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác, LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44 với 8 hoặc ít hơn 8 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác, LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44 với 6 hoặc ít hơn 6 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác, LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44 với 4 hoặc ít hơn 4 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó. Theo một phương án khác nữa, LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44 với 2 hoặc 1 gốc axit amin thay thế bảo toàn trong đó.

Trừ khi được quy định theo cách khác, thuật ngữ "kháng thể," như được sử dụng ở đây, sẽ được hiểu là bao gồm các phân tử kháng thể chứa hai chuỗi nặng globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (tức là, "phân tử kháng thể đầy đủ ") cũng như là các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng. Thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, "đoạn gắn kết kháng nguyên" của kháng thể, và thuật ngữ tương tự, như được sử dụng ở đây, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có nguồn gốc trong tự nhiên, có thể thu được nhờ enzym, tổng hợp, hoặc được thao tác di truyền mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể thu được, ví dụ, phân tử kháng thể đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn thích hợp bất kỳ như các kỹ thuật thao tác di truyền tái tổ hợp hoặc phân cắt nhờ phân giải protein có liên quan đến việc thao tác và biểu hiện ADN mã hóa các vùng gấp cố định (tùy ý) và biến đổi của kháng thể. ADN này là đã biết và/hoặc dễ dàng thu được từ các nguồn trên thị trường, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện kháng thể biểu hiện trên thể thực khuẩn), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được giải trình tự và được thao tác bằng phương pháp hóa học hoặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng gấp biến đổi và/hoặc cố định thành cấu hình thích hợp, hoặc để đưa các codon vào, tạo các gốc xystein, cải biến, bổ sung hoặc loại bỏ axit amin, v.v..

Các ví dụ không giới hạn về các đoạn gắn kết với kháng nguyên bao gồm: (i) các đoạn Fab; (ii) các đoạn F(ab')₂; (iii) các đoạn Fd; (iv) các đoạn Fv; (v) các phân tử Fv mạch đơn (scFv); (vi) các đoạn dAb; và (vii) các đơn vị nhận biết tối thiểu chứa các gốc axit amin mà bắt chước vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định bổ sung được phân lập (complementarity determining region-CDR) như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc. Các phân tử được thao tác di truyền khác, như các kháng thể đặc hiệu vùng gấp, kháng thể vùng gấp đơn, kháng thể bị mất vùng gấp, kháng thể khảm, kháng thể được ghép CDR, đoạn kháng thể dime, đoạn kháng thể

trime, đoạn kháng thể tetrame, kháng thể có kích thước nhỏ, kháng thể có kích thước nano (ví dụ, kháng thể có kích thước nano hóa trị một, kháng thể có kích thước nano hóa trị hai, v.v.), protein được tạo thành từ globulin miễn dịch dùng làm được chất điều biến có kích thước nhỏ (small modular immunopharmaceutical-SMIP), và các vùng gấp IgNAR biến đổi của cá mập, cũng được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn gắn kết kháng nguyên," như được sử dụng ở đây.

Đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể thường chứa ít nhất một vùng gấp biến đổi. Vùng biến đổi này có thể có kích thước bất kỳ hoặc tổ hợp axit amin và thường chứa ít nhất một CDR mà nằm kề với hoặc trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong các đoạn gắn kết kháng nguyên có vùng gấp V_H được liên kết với vùng gấp V_L , thì các vùng gấp V_H và V_L có thể được đặt ở vị trí tương đối với nhau theo cách sắp xếp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là đối xứng hai bên và chứa các dime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Theo cách khác, đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa vùng gấp V_H hoặc V_L monome.

Theo các phương án nhất định, đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một vùng gấp biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một vùng gấp cố định. Các cấu hình được lấy làm ví dụ, không giới hạn của các vùng gấp cố định và biến đổi có thể được tìm thấy trong đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; và (xiv) V_L - C_L . Ở cấu hình bất kỳ của các vùng gấp biến đổi và cố định, bao gồm cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình được lấy làm ví dụ nêu trên đây, các vùng gấp biến đổi và cố định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết với nhau bằng vùng liên kết hoặc một phần bản lề hoặc toàn bộ bản lề. Vùng bản lề có thể gồm có ít

nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc hơn 60) axit amin mà tạo ra liên kết linh động hoặc bán linh động giữa vùng gấp biến đổi và/hoặc cố định trong phân tử polypeptit đơn. Hơn thế nữa, đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa đồng dime hoặc dị dime (hoặc multime khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình vùng gấp cố định và biến đổi nêu trên được kết hợp không cộng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều vùng gấp V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bằng liên kết disulfua).

Như với các phân tử kháng thể đầy đủ, các đoạn gắn kết kháng nguyên có thể là đặc hiệu đơn hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Đoạn gắn kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường chứa ít nhất hai vùng gấp biến đổi khác nhau, trong đó mỗi vùng gấp biến đổi có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên riêng biệt hoặc với epitop khác biệt trên cùng một kháng nguyên. Kiểu kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, bao gồm kiểu kháng thể đặc hiệu kép được lấy làm ví dụ được mô tả ở đây, có thể được thay đổi để sử dụng trong trường hợp đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp với gốc điều trị ("thể tiếp hợp miễn dịch"), như xytotoxin, dược chất hóa trị, chất ức chế miễn dịch hoặc đồng vị phóng xạ.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu," hoặc thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó tạo phức với kháng nguyên mà tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Gắn kết đặc hiệu có thể được xác định bằng hằng số phân ly cân bằng (K_D) bằng 1×10^{-6} M hoặc thấp hơn (tức là, K_D nhỏ hơn chứng tỏ gắn kết chặt hơn). Các phương pháp xác định liệu hai phân tử có gắn kết đặc hiệu với nhau hay không là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, phương pháp thẩm tách cân bằng, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và phương pháp tương tự.

Tuy nhiên, kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3 có thể thể hiện khả năng phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử ANGPTL3 từ loài khác, ví dụ, ANGPTL3 của khỉ cynomolgus, ANGPTL3 của chuột nhắt, ANGPTL3 của chuột cống, và/hoặc hANGPTL4 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:164. Hơn thế nữa, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) mà gắn kết với hANGPTL3 và một hoặc nhiều kháng nguyên khác dù sao vẫn được coi là kháng thể mà “gắn kết đặc hiệu với” hANGPTL3, như được sử dụng ở đây.

Thuật ngữ kháng thể “ái lực cao” được dùng để chỉ kháng thể có ái lực gắn kết với hANGPTL3, được biểu hiện ở dạng K_D , bằng $2 \times 10^{-9} M$ hoặc nhỏ hơn, $1,5 \times 10^{-9} M$ hoặc nhỏ hơn, $1 \times 10^{-9} M$ hoặc thấp hơn, $0,5 \times 10^{-9} M$ hoặc thấp hơn, $0,25 \times 10^{-9} M$ hoặc thấp hơn, $1 \times 10^{-10} M$ hoặc thấp hơn, hoặc $0,5 \times 10^{-10} M$ hoặc thấp hơn, như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™ hoặc ELISA ái lực dung dịch.

Thuật ngữ " K_D ", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ hằng số phân ly cân bằng của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ “tốc độ phân ly chậm”, “ K_{off} ” hoặc “ k_d ” có nghĩa là kháng thể mà phân tách khỏi hANGPTL3 với hằng số tốc độ bằng $4 \times 10^{-3} s^{-1}$ hoặc thấp hơn, $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ hoặc thấp hơn, $2 \times 10^{-3} s^{-1}$ hoặc thấp hơn, $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ hoặc thấp hơn, $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ hoặc thấp hơn, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Thuật ngữ “hằng số ái lực bên trong” hoặc “ k_a ” có nghĩa là kháng thể mà kết hợp với hANGPTL3 ở hằng số tốc độ bằng $1 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ hoặc cao hơn, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Thuật ngữ "kháng thể phân lập", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ kháng thể mà hầu như độc lập với các mAb khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với

hANGPTL3 hầu như độc lập với các mAb mà gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên ngoại trừ hANGPTL3). Tuy nhiên, kháng thể phân lập mà gắn kết đặc hiệu với hANGPTL3 có thể phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử ANGPTL3 từ loài khác, như protein của khỉ cynomolgus, chuột nhắt, chuột cống, và/hoặc protein có liên quan khác, như ANGPTL4 của người.

Thuật ngữ kháng thể "trung hòa", "phong bế" hoặc "phá hủy", như được sử dụng ở đây (hoặc kháng thể mà "trung hòa", "phong bế" hoặc "phá hủy" hoạt tính ANGPTL3), được dùng để chỉ kháng thể mà gắn kết với ANGPTL3 dẫn đến ức chế trực tiếp ít nhất một hoạt tính sinh học của ANGPTL3, như được đánh giá bằng các thử nghiệm *in vitro* chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây). Thuật ngữ, "trung hòa", "ức chế", "phong bế" và "phá hủy", có thể được sử dụng thay đổi cho nhau ở đây. Kháng thể "không phong bế" được dùng để chỉ kháng thể mà gắn kết với ANGPTL3 không phong bế trực tiếp hoạt tính đích của ANGPTL3 như được đánh giá bằng các thử nghiệm *in vitro* chuẩn, nhưng vẫn có thể là kháng thể "can thiệp" mà gắn kết với ANGPTL3 dẫn đến ức chế, làm giảm, làm yếu gián tiếp, hoặc can thiệp khác, ít nhất một hoạt tính sinh học của ANGPTL3 *in vivo*, ví dụ bằng cách làm tăng sự thanh thải ANGPTL3 khỏi hệ tuần hoàn. Sự thanh thải ANGPTL3 khỏi hệ tuần hoàn đặc biệt có thể được tăng lên bằng cách kết hợp ít nhất hai kháng thể không phong bế. Trung hòa, ức chế, phá hủy, làm giảm, làm yếu hoặc can thiệp, hoạt tính sinh học của ANGPTL3 có thể được đánh giá bằng cách đo một hoặc nhiều chỉ số của hoạt tính sinh học ANGPTL3 bằng một hoặc nhiều trong số một vài thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (cũng xem phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây).

Thuật ngữ "phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt", như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ hiện tượng quang học mà cho phép phân tích

các tương tác đặc hiệu kép thời gian thực nhờ phát hiện thấy các thay đổi về nồng độ protein trong cơ chất cảm biến sinh học, ví dụ bằng cách sử dụng hệ thống BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden và Piscataway, N.J.).

Thuật ngữ “epitop” là vùng kháng nguyên mà được gắn kết với kháng thể. Epitop có thể được định nghĩa là epitop cấu trúc hoặc epitop chức năng. Epitop chức năng thường là một nhóm nhỏ của các epitop cấu trúc và có các gốc mà trực tiếp gây ra ái lực tương tác. Epitop cũng có thể là epitop cấu hình, tức là, gồm có các axit amin không tuyến tính. Theo các phương án nhất định, epitop có thể bao gồm các quyết định mà là các nhóm phân tử trên bề mặt có hoạt tính hóa học như axit amin, các nhóm mạch bên của đường, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl, và, theo các phương án nhất định, có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều, và/hoặc các đặc điểm điện tích riêng.

Thuật ngữ "gần như đồng nhất" hoặc "hầu như đồng nhất," khi đề cập đến axit nucleic hoặc đoạn của nó, có nghĩa là nếu được sắp xếp thẳng hàng tối ưu có đoạn cài hoặc đoạn mất nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc mạch bổ sung của nó), thì mức đồng nhất trình tự nucleotit ít nhất là 90%, và tốt hơn nữa ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% bazơ nucleotit, như được đánh giá bằng thuật toán mức đồng nhất trình tự đã biết bất kỳ, như FASTA, BLAST hoặc GAP, như được mô tả dưới đây.

Nếu được áp dụng cho polypeptit, các thuật ngữ "hầu như tương đồng" hoặc “gần như tương đồng” có nghĩa là hai trình tự peptit, nếu được sắp xếp thẳng hàng tối ưu, như được sắp xếp thẳng hàng bằng các chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng lượng quãng cách mặc định, có chung ít nhất 90% mức đồng nhất trình tự, thậm chí tốt hơn nữa có chung ít nhất 95%, 98% hoặc 99% mức đồng nhất trình tự. Tốt hơn là, các vị trí gốc mà không giống nhau khác nhau ở các đoạn axit amin thay thế bảo toàn. Thuật ngữ "đoạn axit amin thay thế bảo toàn" là đoạn trong đó gốc axit amin được thay thế bởi gốc axit

amin khác có mạch bên (nhóm R) với các đặc tính hóa học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Nói chung, đoạn axit amin thay thế bảo toàn hầu như sẽ không thay đổi các đặc tính chức năng của protein. Trong trường hợp mà hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi các axit amin thay thế bảo toàn, thì phần trăm hoặc mức tương đồng có thể được điều chỉnh theo hướng hiệu chỉnh bản chất thay thế bảo toàn. Các biện pháp để tiến hành điều chỉnh này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem tài liệu, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Ví dụ về các nhóm axit amin mà có mạch bên có các đặc tính hóa học tương tự bao gồm 1) mạch bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) mạch bên hydroxyl-béo: serin và threonin; 3) mạch bên chứa amit: asparagin và glutamin; 4) mạch bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; 5) mạch bên bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) mạch bên axit: aspartat và glutamat, và 7) mạch bên chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm axit amin thay thế bảo toàn được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, thay thế bảo toàn là thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận hợp lệ log PAM250 được mô tả trong tài liệu Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45. Sự thay thế "bảo toàn vừa phải" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận hợp lệ log PAM250.

Tính tương đồng trình tự của các polypeptit thường được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein so sánh các trình tự tương tự bằng cách sử dụng các số đo về tính tương đồng được quy định cho các thay thế, mất hoặc cải biến khác, kể cả các thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG chứa các chương trình như GAP và BESTFIT mà có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định mức tương đồng trình tự hoặc mức đồng nhất trình tự giữa các polypeptit có quan hệ gần, như các polypeptit tương đồng từ các loài vi sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu đại và thể đột biến của nó. Ví dụ, xem GCG phiên bản

6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh bằng cách sử dụng FASTA với các thông số mặc định; chương trình trong phần mềm GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) đưa ra các chương trình so sánh và phân trăm mức đồng nhất trình tự của các vùng có quãng lặp tốt nhất giữa trình tự nghi vấn và trình tự nghiên cứu (Pearson (2000) *supra*). Thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa một lượng lớn các trình tự từ các vi sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Ví dụ, xem tài liệu, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 410 và (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 402. Thuật ngữ “lượng hữu hiệu để điều trị” có nghĩa là lượng mà thu được tác dụng mong muốn khi lượng này được sử dụng. Lượng chính xác sẽ tùy thuộc vào mục đích điều trị, độ tuổi và khổ người của đối tượng được điều trị, đường dùng, và yếu tố khác, và sẽ được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết (ví dụ, xem tài liệu Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

Tổng hợp kháng thể của người

Phương pháp tạo ra kháng thể của người ở chuột chuyển gen là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp đã biết bất kỳ có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế để tạo ra kháng thể của người mà gắn kết đặc hiệu với ANGPTL3.

Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™ hoặc phương pháp đã biết khác bất kỳ để tạo ra kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm có ái lực cao kháng ANGPTL3 được phân lập ban đầu có vùng biến đổi của người và vùng cố định của chuột nhất. Như trong phần thử nghiệm dưới đây, kháng thể được xác định đặc điểm và được chọn lọc các đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, độ chọn lọc, epitop, và đặc tính tương tự.

Nói chung, kháng thể theo sáng chế có ái lực cao, thường có K_D nằm

trong khoảng từ 10^{-12} M đến 10^{-9} M, nếu được đo bằng cách gắn kết với kháng nguyên được cố định trên pha rắn hoặc trong pha dung dịch. Vùng cố định của chuột nhất được thay thế bằng vùng cố định mong muốn của người, ví dụ, IgG1 hoặc IgG4 kiểu dại, hoặc IgG1 hoặc IgG4 đã cải biến, để tạo ra kháng thể của người đầy đủ theo sáng chế. Trong khi vùng cố định được chọn có thể khác nhau tùy theo cách sử dụng riêng, thì các đặc tính gắn kết kháng nguyên có ái lực cao và tính đặc hiệu đích của kháng thể lại tùy thuộc vùng biến đổi.

Lập bản đồ epitop và các kỹ thuật có liên quan

Để sàng lọc kháng thể mà gắn kết với epitop cụ thể, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) có thể được tiến hành. Các phương pháp khác bao gồm đột biến sàng lọc sử dụng alanin, thẩm tách peptit (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), hoặc phân tích phân cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt epitop, chiết epitop và cải biến hóa học các kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496).

Thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà đáp ứng với các tế bào T và/hoặc tế bào B. Các epitop tế bào B có thể được tạo thành từ cả axit amin liên kế hoặc các axit amin không liên kế được đặt gần nhau bởi sự gấp bậc ba của protein. Epitop được tạo thành từ các axit amin liên kế thường được giữ lại khi tiếp xúc với các dung môi làm biến tính, trong khi đó epitop được tạo thành bằng cách gấp bậc ba thường bị mất đi khi xử lý bằng các dung môi làm biến tính. Epitop thường gồm ít nhất 3, và thông thường hơn nữa, gồm ít nhất 5 hoặc 8 đến 10 axit amin trong cấu hình không gian duy nhất.

Phương pháp lập profin nhờ cải biến (Modification-Assisted Profiling-MAP), cũng được biết đến là phương pháp lập profin kháng thể dựa vào cấu trúc kháng nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling-ASAP) là

phương pháp mà phân loại một số lượng lớn kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody-mAb) được định hướng chống lại cùng một kháng nguyên theo sự tương tự về profin gắn kết của mỗi kháng thể kháng bề mặt kháng nguyên đã cải biến bằng phương pháp hóa học hoặc đã cải biến nhờ enzym (US 2004/0101920). Mỗi loại có thể tương ứng với epitop duy nhất khác biệt rõ rệt so với hoặc chồng lên một phần epitop thuộc loại khác. Công nghệ này cho phép sàng lọc nhanh các mAb giống nhau về mặt di truyền, sao cho việc xác định chỉ tập trung vào các mAb khác biệt bề mặt di truyền. Nếu được áp dụng để sàng lọc các tế bào lai, MAP có thể dễ dàng xác định được các dòng tế bào lai hiếm mà tổng hợp mAb có các đặc tính mong muốn. MAP có thể được sử dụng để phân loại mAb kháng ANGPTL3 theo sáng chế thành các nhóm mAb gắn kết với các epitop khác nhau.

ANGPTL3 chứa vùng xoắn kép ở đầu amin và vùng giống fibrinogen ở đầu carboxyl (fibrinogen like domain-FD) và protein ANGPTL3 tạo oligome khi không có mặt các liên kết disulfua giữa các phân tử (Ge *et al.*, 2005, *J Lipid Res* 46:1484-1490). Đã được mô tả rằng vùng xoắn kép ở đầu N là quan trọng trong việc ức chế hoạt tính LPL (Ono *et al.*, 2003, *J Biol Chem* 278:41804-41809). Do đó, theo các phương án nhất định, kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể gắn kết với epitop trong vùng xoắn kép ở đầu N (các gốc 17-209) của hANGPTL3 (SEQ ID NO:161) và trung hòa ít nhất một hoạt tính của hANGPTL3 (ví dụ, ức chế hoạt tính LPL). Theo các phương án khác, kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với epitop ở vùng xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3 và trung hòa ít nhất một hoạt tính của hANGPTL3, miễn là kháng thể này hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:170. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc từ 17 đến 200, từ 17 đến 100, từ 17 đến 70, từ 17 đến 65, từ 17 đến 60, từ 17 đến 57, từ 17 đến 55, từ 17 đến 50, từ 17 đến 45, từ 17 đến 40, hoặc từ 17 đến 35, của hANGPTL3 (SEQ ID

NO:161), tùy ý với điều kiện là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:170. Theo một phương án khác, kháng thể hoặc đoạn của nó gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc từ 40 đến 200, từ 40 đến 100, từ 40 đến 70, từ 50 đến 200, từ 50 đến 100, từ 50 đến 70, từ 58 đến 200, từ 58 đến 100, từ 58 đến 70, từ 58 đến 68, hoặc từ 61 đến 66 (được biết đến là “môtip gắn kết heparin”) của hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), tùy ý với điều kiện là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:170. Theo một vài phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể gắn kết với epitop mà có thể bao gồm nhiều hơn một trong số các epitop được liệt kê hoặc các gốc nằm trong vùng xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3, tùy ý với điều kiện là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:170.

Theo các phương án khác, kháng thể hANGPTL3 hoặc đoạn của nó gắn kết với một hoặc nhiều đoạn của hANGPTL3, ví dụ, một đoạn gồm ít nhất 5 gốc, ít nhất 7 gốc, ít nhất 10 gốc, ít nhất 20 gốc, ít nhất 30 gốc, ít nhất 50 gốc, ít nhất 70 gốc, ít nhất 100 gốc, ít nhất 150 gốc, hoặc ít nhất 200 gốc, của hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), tùy ý với điều kiện là kháng thể hoặc đoạn của nó không gắn kết với peptit ANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:170.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 mà gắn kết với epitop giống epitop bất kỳ của các kháng thể được lấy làm ví dụ cụ thể được mô tả ở đây. Mặt khác, sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng hANGPTL3 mà cạnh tranh với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được lấy làm ví dụ cụ thể được mô tả ở đây để gắn kết với hANGPTL3 hoặc một đoạn hANGPTL3.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định được liệu kháng thể có gắn kết với cùng một epitop như, hoặc cạnh tranh để gắn kết với, kháng thể kháng hANGPTL3 đối chứng hay không bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, để xác định liệu kháng thể thử nghiệm có gắn kết với cùng một epitop như kháng

thể kháng hANGPTL3 đối chứng theo sáng chế hay không, thì kháng thể đối chứng được để gắn kết với protein hoặc peptit hANGPTL3 trong điều kiện bão hòa. Tiếp đó, đánh giá khả năng của kháng thể thử nghiệm gắn kết với phân tử hANGPTL3. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể gắn kết với hANGPTL3 sau khi bão hòa gắn kết kháng thể kháng hANGPTL3 đối chứng, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm gắn kết với một epitop khác so với kháng thể kháng hANGPTL3 đối chứng. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không thể gắn kết với phân tử hANGPTL3 sau khi bão hòa gắn kết kháng thể kháng hANGPTL3 đối chứng, thì kháng thể thử nghiệm có thể gắn kết với epitop giống như epitop được gắn kết bởi kháng thể kháng hANGPTL3 đối chứng theo sáng chế.

Để xác định liệu một kháng thể có cạnh tranh để gắn kết với kháng thể kháng hANGPTL3 đối chứng hay không, phương pháp gắn kết nêu trên được tiến hành theo hai hướng: theo hướng thứ nhất, kháng thể đối chứng được để gắn kết với phân tử hANGPTL3 trong điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá sự gắn kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử hANGPTL3. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được để gắn kết với phân tử hANGPTL3 trong điều kiện bão hòa sau đó đánh giá sự gắn kết của kháng thể đối chứng với phân tử hANGPTL3. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ kháng thể thử nghiệm (bão hòa) có thể gắn kết với phân tử hANGPTL3, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể đối chứng cạnh tranh để gắn kết với hANGPTL3. Như được đánh giá bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, kháng thể mà cạnh tranh với kháng thể đối chứng để gắn kết có thể không cần gắn kết với epitop giống như kháng thể đối chứng, nhưng có thể phong bế sự gắn kết của kháng thể đối chứng trong không gian bằng cách gắn kết với epitop chồng lên hoặc liền kề.

Hai kháng thể gắn kết với cùng một epitop hoặc epitop chồng lên nhau nếu mỗi kháng thể cạnh tranh ức chế (phong bế) sự gắn kết của kháng thể còn lại với kháng nguyên. Tức là, một kháng thể với lượng dư gấp 1, 5, 10, 20

hoặc 100 lần sẽ ức chế sự gắn kết của kháng thể còn lại ở mức ít nhất là 50%, tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% nếu được đo trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh (ví dụ, xem tài liệu, Junghans *et al.*, Cancer Res, 1990;50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể có cùng một epitop nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của một kháng thể làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của kháng thể còn lại. Hai kháng thể có các epitop chồng lên nhau nếu một vài đột biến axit amin mà làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của một kháng thể làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của kháng thể còn lại.

Thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, đột biến peptit và phân tích gắn kết) có thể được tiến hành để khẳng định liệu việc không có gắn kết của kháng thể thử nghiệm quan sát được thực tế có phải là do việc gắn kết với cùng một epitop như kháng thể đối chứng hay không hoặc liệu sự phong bế trong không gian (hoặc hiện tượng khác) có phải là nguyên nhân dẫn đến việc không có sự gắn kết quan sát được hay không. Các thử nghiệm về sự phân loại này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA, RIA, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, phương pháp đếm tế bào dòng chảy hoặc thử nghiệm gắn kết kháng thể định tính hoặc định lượng khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng kháng ANGPTL3 được tiếp hợp với gốc điều trị (“thể tiếp hợp miễn dịch”), như chất gây độc tế bào, dược chất hóa trị, chất ức chế miễn dịch hoặc đồng vị phóng xạ. Chất gây độc tế bào bao gồm chất bất kỳ mà có hại đối với tế bào. Ví dụ về các chất gây độc tế bào và chất hóa trị thích hợp để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ xem tài liệu, WO 05/103081.

Tính đặc hiệu kép

Kháng thể theo sáng chế có thể có tính đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. mAb đa đặc hiệu có nghĩa là đặc hiệu với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có nghĩa là chứa các vùng gấp gấu kết với kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một polypeptit đích. Ví dụ, xem tài liệu, Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147:60-69. mAb kháng hANGPTL3 của người có thể được liên kết với hoặc được đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn của nó có thể được liên kết chức năng (ví dụ, bằng cách liên kết hóa học, dung hợp di truyền, liên kết không cộng hóa trị hoặc cách liên kết khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử khác, như kháng thể khác hoặc đoạn kháng thể, để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu có tính đặc hiệu gắn kết thứ hai.

Dạng kháng thể đặc hiệu kép được lấy làm ví dụ mà có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế có liên quan đến việc sử dụng vùng gấp C_H3 globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và vùng gấp C_H3 Ig thứ hai, trong đó các vùng gấp C_H3 Ig thứ nhất và thứ hai khác nhau bởi ít nhất một axit amin, và trong đó sự khác nhau ít nhất một axit amin làm giảm khả năng gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác nhau về axit amin. Theo một phương án, vùng gấp C_H3 Ig gắn kết với protein A và vùng gấp C_H3 Ig thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc phá hủy sự gắn kết với protein A như cải biến H95R (theo cách đánh số exon IMGT; H435R theo cách đánh số EU). C_H3 thứ hai có thể còn chứa cải biến Y96F (nhờ IMGT; Y436F nhờ EU). Các cải biến khác mà có thể được tìm thấy trong C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo cách IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo cách EU) trong trường hợp các kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I theo cách EU) trong trường hợp các kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo cách IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I theo cách EU) trong trường hợp kháng thể IgG4. Các cải biến trên dạng kháng thể đặc

hiệu kép được mô tả trên đây được bao gồm trong phạm vi sáng chế.

Sự tương đương sinh học

Kháng thể kháng hANGPTL3 và các đoạn kháng thể theo sáng chế bao gồm các protein có các trình tự axit amin mà khác so với các trình tự của các mAb được mô tả, nhưng vẫn giữ được khả năng gắn kết với ANGPTL3 của người. Các mAb biến thể này và các đoạn kháng thể chứa một hoặc nhiều axit amin thêm, mất hoặc thay thế khi so sánh với trình tự gốc, nhưng có hoạt tính sinh học mà gần như tương đương với hoạt tính sinh học của các mAb được mô tả. Mặt khác, các trình tự ADN mã hóa kháng thể kháng hANGPTL3 theo sáng chế bao gồm các trình tự mà chứa một hoặc nhiều nucleotit thêm, mất hoặc thay thế so với trình tự được mô tả, nhưng mã hóa kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn kháng thể mà về cơ bản tương đương sinh học với kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế. Ví dụ về các trình tự ADN và trình tự axit amin biến thể này được mô tả trên đây.

Hai protein gắn kết kháng nguyên, hoặc kháng thể, được coi là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là các chất tương đương về mặt dược học hoặc là các chất thay thế lẫn nhau trong dược học mà tỷ lệ và mức hấp thu của chúng không thể hiện sự chênh lệch đáng kể nếu được sử dụng ở cùng một liều phân tử gam trong các điều kiện thử nghiệm tương tự, hoặc liều đơn hoặc liều đa. Một vài kháng thể sẽ được coi là các chất tương đương hoặc các chất thay thế lẫn nhau trong dược học nếu chúng tương đương nhau về mức hấp thu nhưng không tương đương nhau về tỷ lệ hấp thu và còn được coi là tương đương sinh học vì mức chênh lệch về tỷ lệ hấp thu là có dự tính trước và được phản ánh trên nhãn, là không cần thiết để đạt được nồng độ dược chất trong cơ thể hiệu quả, ví dụ, sử dụng mạn tính, và được coi là không có ý nghĩa trong y học đối với sản phẩm dược chất cụ thể được nghiên cứu. Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu không có sự khác nhau có ý nghĩa trong lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết

và hiệu quả.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân được dùng chuyển đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm đối chứng và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ các tác dụng có hại, bao gồm sự thay đổi có ý nghĩa về mặt lâm sàng về tính sinh miễn dịch, hoặc hiệu lực giảm, so với liệu pháp liên tục mà không dùng chuyển đổi này.

Theo một phương án, hai protein gắn kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng đều có tác dụng theo cơ chế chung hoặc cơ chế tác dụng đối với một hoặc nhiều điều kiện sử dụng, trong phạm vi mà các cơ chế này là đã biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Các phương pháp đánh giá tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc các chất chuyển hóa của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác ở dạng hàm thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà có liên quan đến và là dự đoán hợp lý của số liệu sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó tác dụng dược học nhạy thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đánh giá ở dạng hàm thời gian; và (d) thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát tốt mà xác minh độ an toàn, hiệu quả, hoặc sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng hANGPTL3 theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, thay thế các gốc hoặc các trình tự hoặc loại bỏ các gốc ở đầu hoặc bên trong hoặc loại bỏ các trình tự không cần cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc xystein không cần cho hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay thế bằng các axit amin khác để ngăn ngừa sự tạo thành các cầu disulfua giữa các phân tử không cần thiết

hoặc không chính xác sau khi chuyển đổi về dạng nguyên thể.

Sử dụng để điều trị và chế phẩm

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế và các phương pháp điều trị sử dụng được phẩm này. Được phẩm theo sáng chế sẽ được sử dụng với các chất mang, tá dược, và các chất khác thích hợp mà được đưa vào được phẩm để thu được sự vận chuyển, phân phối, dung nạp và mục đích tương tự tốt hơn. Một tập hợp được phẩm thích hợp có thể được tìm thấy trong công thức pha chế đã biết đối với các chuyên gia hóa dược: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các được phẩm này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, chất đông, sáp, dầu, lipid, túi chứa lipid (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™), thể tiếp hợp ADN, bột nhão hấp thu khan, nhũ tương dầu trong nước hoặc nước trong dầu, carbovac nhũ tương (polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa carbovac. Cũng xem tài liệu Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

Liều có thể khác nhau tùy thuộc vào độ tuổi và khổ người được điều trị, bệnh đích, mục đích điều trị, tình trạng bệnh, đường dùng, và yếu tố khác. Nếu kháng thể theo sáng chế được dùng để điều trị các bệnh hoặc tình trạng bệnh khác nhau trực tiếp hoặc gián tiếp có liên quan đến ANGPTL3, bao gồm tăng cholesterol huyết, bệnh có liên quan đến LDL và apolipoprotein B, và rối loạn chuyển hóa lipid, và bệnh tương tự, ở người lớn, thuận lợi là sử dụng kháng thể theo sáng chế qua đường tĩnh mạch hoặc dưới da ở liều đơn nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20mg/kg thể trọng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,02 đến 7, từ 0,03 đến 5, hoặc từ 0,05 đến 3mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn gắn kết

kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng liều đầu với lượng ít nhất nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 800mg, từ 1 đến 500mg, từ 5 đến 300mg, hoặc từ 10 đến 200mg, đến 100mg, hoặc đến 50mg. Theo các phương án nhất định, sau liều đầu có thể sử dụng liều thứ hai tiếp theo hoặc nhiều liều tiếp theo của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó với lượng mà có thể gần bằng hoặc thấp hơn lượng liều đầu, trong đó các liều tiếp theo được dùng cách nhau ít nhất là 1 ngày đến 3 ngày; ít nhất là một tuần, ít nhất là 2 tuần; ít nhất là 3 tuần; ít nhất là 4 tuần; ít nhất là 5 tuần; ít nhất là 6 tuần; ít nhất là 7 tuần; ít nhất là 8 tuần; ít nhất là 9 tuần; ít nhất là 10 tuần; ít nhất là 12 tuần; hoặc ít nhất là 14 tuần.

Nhiều hệ thống phân phối khác nhau là đã biết và có thể được dùng để sử dụng được phẩm theo sáng chế, ví dụ bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện các virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (ví dụ, xem tài liệu, Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Các phương pháp phân phối bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường trong da, trong bắp, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, ngoài màng cứng, và đường miệng. Dược phẩm này có thể được sử dụng bằng đường thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng cách truyền hoặc tiêm tĩnh mạch nhanh, bằng cách hấp thu thông qua các đường biểu mô hoặc da niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Sử dụng có thể là toàn thân hoặc khu trú.

Dược phẩm cũng có thể được phân phối ở dạng túi, cụ thể là liposom (xem tài liệu, Langer (1990) Science 249:1527-1533; Treat *et al.* (1989) in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; nói chung xem cùng đoạn đó).

Theo các phương án nhất định, dược phẩm có thể được phân phối trong

hệ giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng (xem tài liệu, Langer, *supra*; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Theo một phương án khác, các nguyên liệu polyme có thể được sử dụng; xem tài liệu, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974). Theo một phương án khác nữa, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở gần đích của dược phẩm, do đó chỉ cần một phần liều toàn thân (ví dụ, xem tài liệu, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138, 1984).

Các chế phẩm tiêm được có thể bao gồm các dạng liều để tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm trong da và tiêm bắp, các chế phẩm truyền nhỏ giọt, v.v.. Các chế phẩm tiêm được này có thể được bào chế bằng phương pháp đã biết. Ví dụ, các chế phẩm tiêm được có thể được bào chế, ví dụ bằng cách hòa tan, tạo huyền phù hoặc nhũ hóa kháng thể hoặc muối của nó được mô tả trên đây trong môi trường chứa nước vô trùng hoặc môi trường có dầu thường được dùng cho thuốc tiêm. Ở dạng môi trường chứa nước dùng để bào chế thuốc tiêm, có dung dịch nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và chất bổ trợ khác, ví dụ, mà có thể được sử dụng cùng với chất hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ, polysorbat 80, HCO-50 (sản phẩm cộng polyoxyetylen (50mol) của dầu thầu dầu đã hydro hóa)], v.v.. Ở dạng môi trường có dầu, được sử dụng là, ví dụ, dầu vừng, dầu đậu nành, v.v., mà có thể được sử dụng cùng với chất hòa tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Do đó, tốt hơn là thuốc tiêm đã bào chế được nạp vào ống thuốc tiêm thích hợp. Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối qua đường dưới da hoặc qua đường tĩnh mạch bằng kim tiêm và bơm tiêm chuẩn. Ngoài ra, liên quan đến sự phân phối dưới da, thiết bị phân phối dạng bút dễ dàng có các ứng dụng trong việc phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể dùng lại được hoặc dùng một lần. Thiết bị phân phối dạng bút có thể dùng lại được thường sử dụng hộp có

thể thay thế được mà chứa được phẩm. Một khi toàn bộ được phẩm trong hộp này được sử dụng và hộp này không còn được phẩm nữa, thì hộp này có thể dễ dàng được tháo ra và thay bằng hộp mới mà chứa được phẩm. Sau đó, thiết bị phân phối dạng bút có thể được sử dụng lại. Trong thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần, không có hộp có thể thay thế được. Dĩ nhiên là, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần được nạp trước được phẩm đựng trong bình chứa trong thiết bị. Một khi bình chứa này không còn được phẩm, thì toàn bộ thiết bị này được bỏ đi.

Nhiều thiết bị phân phối tiêm tự động và thiết bị dạng bút có thể dùng lại được có các ứng dụng trong việc phân phối được phẩm theo sáng chế qua đường dưới da. Ví dụ về các thiết bị này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), chỉ liệt kê một số. Ví dụ về thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần có các ứng dụng trong việc phân phối được phẩm theo sáng chế qua đường dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly).

Thuận lợi là, được phẩm để dùng qua đường miệng hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa được mô tả trên đây được bào chế thành dạng liều ở dạng liều đơn vị thích hợp để điều chỉnh liều hoạt chất. Các dạng liều này ở dạng liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v.. Lượng kháng thể nêu trên chứa trong dạng liều này

thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 800mg mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng thuốc tiêm, kháng thể nêu trên được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 500mg, từ 5 đến 300mg, từ 8 đến 200mg, và từ 10 đến 100mg đối với các dạng liều khác.

Liệu pháp kết hợp

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều trị để điều trị bệnh hoặc rối loạn, mà có liên quan trực tiếp hoặc gián tiếp đến hANGPTL3, bằng cách sử dụng kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn của nó theo sáng chế cùng với một hoặc nhiều chất điều trị khác. Chất điều trị khác có thể là một hoặc nhiều chất mà được kết hợp có lợi với một hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn của nó theo sáng chế, bao gồm chất ức chế HMG-CoA reductaza, như xerovastatin, atorvastatin, simvastatin, pitavastatin, rosuvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, và chất tương tự; niacin; fibrat khác, như fenofibrat, bezafibrat, xiprofibrat, clofibrat, gemfibrozil, và chất tương tự; chất hoạt hóa yếu tố phiên mã LXR, và chất tương tự. Hơn thế nữa, kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn của nó theo sáng chế có thể được đồng sử dụng với chất ức chế ANGPTL3 khác cũng như là chất ức chế các phân tử khác, như ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6 và proprotein convertaza subtilisin/kexin typ 9 (PCSK9), mà có liên quan đến sự chuyển hóa lipid, cụ thể là, nội cân bằng cholesterol và/hoặc triglycerit. Chất ức chế các phân tử này bao gồm các phân tử nhỏ và kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với các phân tử này và phong bế hoạt tính của chúng (ví dụ, kháng thể kháng PCSK9 được mô tả trong U.S. 2010/0166768 A1).

Hơn thế nữa, chất điều trị khác có thể là một hoặc nhiều chất chống ung thư, như chất hóa trị liệu, chất chống tạo mạch, chất ức chế phát triển, chất độc tế bào, chất gây chết theo chương trình, và các chất khác đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này để điều trị bệnh ung thư hoặc các bệnh hoặc rối loạn tăng sinh khác. Ví dụ về chất chống ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới

hạn ở, chất chống gián phân, như docetaxel, paclitaxel, và chất tương tự; hợp chất hóa trị liệu dựa trên platin, như xisplatin, carboplatin, iproplatin, oxaliplatin, và chất tương tự; hoặc chất gây độc tế bào thông thường khác, như 5-flouraxil, capexitabin, irinotecan, leucovorin, gemxitabin, và chất tương tự, và chất chống tạo mạch, bao gồm chất đối kháng yếu tố phát triển nội mạc mạch (vascular endothelial growth factor-VEGF), như kháng thể kháng VEGF, ví dụ, bevacizumab (AVASTIN®, Genentech) và chất phong bế VEGF dựa trên thụ thể, ví dụ, “bẫy VEGF” được mô tả trong patent Mỹ số 7,070,959, chất đối kháng phối tử giống delta 4 (Dll4), như kháng thể kháng Dll4 như được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0181899, và protein dung hợp chứa vùng ngoại bào của Dll4, ví dụ, Dll4-Fc như được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0107648; chất ức chế thụ thể tyrosin kinaza và/hoặc sự tạo mạch, bao gồm sorafenib (NEXAVAR® của Bayer Pharmaceuticals Corp.), sunitinib (SUTENT® của Pfizer), pazopanib (VOTRIENT™ của GlaxoSmithKline), toceranib (PALLADIA™ của Pfizer), vandetanib (ZACTIMA™ của AstraZeneca), cediranib (RECENTIN® của AstraZeneca), regorafenib (BAY 73-4506 của Bayer), axitinib (AG013736 của Pfizer), lestaurtinib (CEP-701 của Cephalon), erlotinib (TARCEVA® của Genentech), gefitinib (IRESSA™ của AstraZeneca), BIBW 2992 (TOVOK™ của Boehringer Ingelheim), lapatinib (TYKERB® của GlaxoSmithKline), neratinib (HKI-272 của Wyeth/Pfizer), và chất tương tự, và muối được dụng, axit hoặc dẫn xuất của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên. Ngoài ra, các chất điều trị khác, như chất giảm đau, chất chống viêm, bao gồm dược chất chống viêm không steroid (non-steroidal anti-inflammatory drug-NSAID), như các chất ức chế Cox-2, và chất tương tự, cũng có thể được đồng sử dụng với kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn của nó theo sáng chế để làm thuyên giảm và/hoặc làm giảm các triệu chứng đi kèm với bệnh ung thư/khối u.

Kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn của nó theo sáng chế và (các)

chất điều trị khác có thể được đồng sử dụng cùng với nhau hoặc sử dụng riêng rẽ. Nếu các chế phẩm dạng liều riêng biệt được sử dụng, thì kháng thể hoặc đoạn của nó theo sáng chế và các chất khác có thể được sử dụng đồng thời, hoặc riêng biệt ở các thời điểm ngắt quãng, tức là liên tiếp theo thứ tự thích hợp.

Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán

Kháng thể kháng ANGPTL3 theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo lường ANGPTL3 trong mẫu, ví dụ nhằm mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng ANGPTL3 hoặc đoạn của nó, có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng bệnh được đặc trưng bởi sự biểu hiện bất thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện, v.v.) của ANGPTL3. Các thử nghiệm chẩn đoán được lấy làm ví dụ đối với ANGPTL3 có thể bao gồm, ví dụ cho mẫu thu được từ bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể kháng ANGPTL3 theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng ANGPTL3 được đánh dấu bằng chất đánh dấu để phát hiện hoặc phân tử tín hiệu hoặc được sử dụng để bắt giữ chọn lọc và phân lập protein ANGPTL3 từ các mẫu của bệnh nhân. Theo cách khác, kháng thể kháng ANGPTL3 không được đánh dấu có thể được sử dụng để chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai mà được đánh dấu để phát hiện. Chất đánh dấu để phát hiện hoặc phân tử tín hiệu có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{131}I hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc gốc quang hóa, như florescein isothiocyanat, hoặc rhodamin; hoặc enzym như phosphatasa kiềm, β -galactosidaza, peroxidaza cây củ cải cay, hoặc luxiferaza. Các thử nghiệm mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc đo lường ANGPTL3 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch có gắn enzym (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay-RIA), phân loại tế bào hoạt hóa có đánh dấu huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting-FACS), và thử nghiệm tương tự.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đề xuất nhằm mục đích cung cấp cho chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sự mô tả đầy đủ cách tạo ra và sử dụng các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các nỗ lực được đưa ra nhằm đảm bảo tính chính xác của các con số được sử dụng nhưng một vài sai số thử nghiệm và độ lệch chuẩn cũng cần được tính đến. Trừ khi có quy định khác, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là độ C và áp suất là tại áp suất khí quyển hoặc gần áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Tổng hợp kháng thể của người kháng ANGPTL3 của người

Chuột VELOCIMMUNE™ được gây miễn dịch bằng ANGPTL3 của người, và đáp ứng miễn dịch kháng thể được kiểm soát bởi thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên bằng cách sử dụng huyết thanh thu được từ các con chuột này. Tế bào B biểu hiện kháng thể kháng hANGPTL3 được lấy từ lách của chuột đã gây miễn dịch được thể hiện là có hiệu giá kháng thể kháng hANGPTL3 cao và được dung hợp với các tế bào u tủy của chuột để tạo thành tế bào lai. Các tế bào lai được sàng lọc và được chọn để xác định các dòng tế bào biểu hiện kháng thể đặc hiệu hANGPTL3 bằng cách sử dụng các thử nghiệm được mô tả dưới đây. Các thử nghiệm này xác định một vài dòng tế bào mà tổng hợp kháng thể kháng hANGPTL3 khả năng, ví dụ, H1M896N.

Kháng thể đặc hiệu với ANGPTL3 của người cũng được phân lập trực tiếp từ các tế bào B đã gây miễn dịch kháng nguyên mà không dung hợp với các tế bào u tủy, như được mô tả trong đơn số U.S. 2007/0280945 A1. Các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng để tạo ra kháng thể kháng hANGPTL3 của người của isotyp IgG4 được gọi là H4H1248P, H4H1250P, H4H1263S, H4H1268S, H4H1276S, H4H1279P, H4H1282P, H4H1292P, H4H1295P và H4H1296P. Các dòng tế bào CHO biểu hiện kháng thể tái tổ hợp ổn định được tạo ra.

Ví dụ 2. Phân tích sử dụng gen biến đổi

Để phân tích cấu trúc của các kháng thể được tổng hợp, axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của kháng thể được tách dòng và được giải trình tự. Từ trình tự axit nucleic và trình tự axit amin dự đoán của kháng thể, đoạn gen sử dụng được xác định đối với mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ. Bảng 1 thể hiện đoạn gen sử dụng của các kháng thể được chọn theo sáng chế.

Bảng 1

Kháng thể	HCVR			LCVR	
	V _H	D _H	J _H	V _K	J _K
H4H1248P	3-30	1-26	6	1-12	3
H4H1250P	3-30	1-7	6	1-5	1
H4H1263S	3-30	3-10	6	1-12	3
H4H1268S	6-1	6-6	4	1-5	1
H4H1276S	3-43	3-3	3	1-5	2
H4H1279P	3-11	1-1	4	1-39	4
H4H1282P	1-18	3-10	4	1-9	4
H4H1292P	3-11	1-1	4	1-39	4
H4H1295P	1-18	6-25	4	2-30	2
H4H1296P	3-11	1-1	4	1-39	4
H1M896N	3-23	3-10	4	1-5	1

Bảng 2 thể hiện cặp trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng hANGPTL3 được chọn và ký hiệu nhận dạng của kháng thể tương ứng. Các ký hiệu N, P và S được dùng để chỉ kháng thể có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ với các trình tự CDR giống nhau nhưng có các thay đổi trình tự ở các vùng mà nằm ngoài các trình tự CDR (tức là, ở vùng

khung). Do đó, các biến thể N, P và S của kháng thể cụ thể có các trình tự CDR giống nhau nằm trong vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nhưng có các cải biến ở vùng khung.

Bảng 2

Tên	HCVR/LCVR SEQ ID NO	Tên	HCVR/LCVR SEQ ID NO
H4H1248P	2/10	H4H1279P	82/90
H4H1250P	18/26	H4H1282P	98/106
H4H1263S	34/42	H4H1292P	114/122
H4H1268S	50/58	H4H1295P	130/138
H4H1276S	66/74	H4H1296P	146/154
H1M896N	180/188	-	-

Ví dụ 3. Các thông số động học của kháng thể kháng hANGPTL3 gắn kết với ANGPTL3

Tất cả các thử nghiệm gắn kết động học được tiến hành ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C trên thiết bị tương tác phân tử không chứa chất đánh dấu BIACORE™ T200 (GE Healthcare) sử dụng chip cảm biến CM5. Nói tóm lại là, bề mặt bất giữ kháng nguyên được tạo ra bằng cách liên kết cộng hóa trị kháng thể đặc hiệu kháng IgG của chuột nhắt (kháng mFc; GE Healthcare; catalog #BR-1008-38) hoặc kháng thể đặc hiệu kháng pentahistidin (Qiagen; catalog #34660) với bề mặt của chip cảm biến CM5 bằng cách sử dụng phương pháp liên kết với amin chuẩn. Sử dụng HBS-EP (HEPES 10mM, NaCl 150mM, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05%, pH=7,4) hoặc PBSP (natri phosphat 10mM, KCl 2,7mM, NaCl 137mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,025%, pH=7,2 hoặc 5,75) làm dung dịch đệm chạy, các biến thể của ANGPTL3 của người hoặc loài khác có đuôi oligohistidin được bất giữ trên bề mặt đã gắn kháng penta-histidin cho đến khi thu được đáp ứng gắn kết

bằng 4,4- 46,5 RU. Protein tái tổ hợp được bắt giữ là: ANGPTL3 của người trưởng thành có chiều dài đầy đủ (tức là, các gốc axit amin 17-460 nêu trong SEQ ID NO:161) có đuôi decahistidin ở đầu C [hANGPTL3(17-460)-His; R&D Systems, MN; catalog #3829-AN], vùng xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3 (tức là, các gốc axit amin 17-170 nêu trong SEQ ID NO:161) chứa đuôi hexahistidin ở đầu C [hANGPTL3(17-170)-His], vùng xoắn kép ở đầu N của ANGPTL3 có nguồn gốc từ *Macaca fascicularis* [tức là, các gốc axit amin 17-170 nêu trong SEQ ID NO:177 (một phần trình tự của ANGPTL3 *Macaca fascicularis*)] chứa đuôi myc-myc-hexahistidin [MfANGPTL3(17-170)-mmH; SEQ ID NO:167], ANGPTL3 trưởng thành có chiều dài đầy đủ từ *Mus musculus* (tức là, các gốc axit amin 17-455 nêu trong SEQ ID NO:163) có đuôi decahistidin ở đầu C [mANGPTL3(17-455)-His; R&D Systems, MN; catalog #136-AN], vùng xoắn kép ở đầu N của ANGPTL3 từ *Mus musculus* (tức là, các gốc axit amin 17-240 nêu trong SEQ ID NO:163) chứa đuôi hexahistidin [mANGPTL3(17-240)-His; SEQ ID NO:166], và vùng xoắn kép ở đầu N của ANGPTL3 từ *Rattus norvegicus* (tức là, các gốc axit amin 17-240 nêu trong SEQ ID NO:175) chứa đuôi myc-myc-hexahistidin [rANGPTL3(17-240)-mmH; SEQ ID NO:176]. Ngoài ra, vùng xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3 (tức là, các gốc axit amin 17-169 nêu trong SEQ ID NO:161) chứa thể dung hợp Fc của chuột ở đầu C [hANGPTL3(17-169)-mFc; SEQ ID NO:165] được bắt giữ trên bề mặt đã gắn kháng mFc cho đến khi đạt được đáp ứng gắn kết bằng $24,8 \pm 1,5$ RU. Để đánh giá tốc độ phân ly và liên kết để tạo thành phức hợp kháng thể/kháng nguyên, một (bảng 3 và 7) hoặc nhiều (bảng 4-6) nồng độ của kháng thể được tiêm dọc bề mặt protein được bắt giữ ở tốc độ dòng bằng 50 μ l/phút trong 3 phút và sự phân ly phức hợp được kiểm tra trong 20 phút. Số liệu gắn kết được xử lý và đưa vào mô hình gắn kết theo tỷ lệ 1:1 với sự vận chuyển chất bằng cách sử dụng phần mềm Scrubber phiên bản 2.0a (BioLogic Software). Thời gian bán thải động học ($t_{1/2}$) được tính toán từ hằng số tốc độ phân ly,

kd.

Bảng 3 thể hiện sự gắn kết của các kháng thể kháng ANGPTL3 khác nhau với hANGPTL3 ở nhiệt độ 25°C, pH=7,4, trong dung dịch đệm HBS-EP.

Bảng 3

Dòng kháng thể	Protein	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H1248P	hANGPTL3(17-169)-mFc	4,57E+05	2,72E-03	5,95	4
	hANGPTL3(17-460)-His	4,40E+05	2,47E-03	5,62	5
H4H1250P	hANGPTL3(17-169)-mFc	1,25E+06	6,51E-04	0,519	18
	hANGPTL3(17-460)-His	9,04E+05	6,57E-04	0,726	18
H4H1263S	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,77E+05	4,22E-03	6,23	3
	hANGPTL3(17-460)-His	5,08E+05	1,26E-03	2,47	9
H4H1268S	hANGPTL3(17-169)-mFc	1,16E+06	8,35E-04	0,721	14
	hANGPTL3(17-460)-His	1,29E+06	1,89E-03	1,47	6
H4H1276S	hANGPTL3(17-169)-mFc	5,82E+05	3,83E-04	0,659	30
	hANGPTL3(17-460)-His	3,44E+05	4,64E-04	1,35	25
H4H1279P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,58E+05	5,53E-06	0,00841	2088
	hANGPTL3(17-460)-His	2,88E+05	1,14E-04	0,394	102
H4H1282P	hANGPTL3(17-169)-mFc	1,28E+06	5,92E-05	0,0463	195
	hANGPTL3(17-460)-His	9,57E+05	9,26E-05	0,0968	125
H4H1292P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,86E+05	1,77E-04	0,257	65
	hANGPTL3(17-460)-His	3,41E+05	2,48E-04	0,727	47
H4H1295P	hANGPTL3(17-169)-mFc	3,52E+05	7,95E-05	0,226	145
	hANGPTL3(17-460)-His	3,73E+05	7,35E-05	0,197	157
H4H1296P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,41E+05	3,92E-05	0,0611	295
	hANGPTL3(17-460)-His	3,01E+05	4,12E-05	0,137	280

Như được thể hiện trong bảng 3, kháng thể kháng hANGPTL3 gắn kết với protein có chiều dài đầy đủ có đuôi decahistidin ở đầu C [hANGPTL3(17-460)-His] với hằng số phân ly cân bằng theo tính toán ($K_D = k_d/k_a$) nằm trong

khoảng từ 96,8pM đến 5,62nM và với vùng xoắn kép ở đầu N có thể dung hợp Fc ở đầu C [hANGPTL3(17-169)-mFc] với K_D nằm trong khoảng từ 8,41pM đến 6,23nM.

Bảng 4 và 5 thể hiện sự gắn kết chéo loài của H4H1276S với ANGPTL3 ở nhiệt độ 25°C và 37°C, tương ứng, ở pH=7,4, trong dung dịch đệm HBS-EP. Bảng 6 thể hiện sự gắn kết của H4H1276S với ANGPTL3 của người và của khỉ cynomolgus, ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C, ở pH=5,75 hoặc pH=7,2, trong dung dịch đệm PBSP.

Bảng 4

Dòng kháng thể	Protein	25°C			
		k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H1276S	hANGPTL3(17-170)-His	9,73E+05	9,12E-04	0,938	12,7
	hANGPTL3(17-460)-His	5,88E+05	2,89E-04	0,491	40,0
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,35E+06	5,35E-04	0,396	21,6
	mANGPTL3(17-240)-His	6,70E+05	3,07E-04	0,458	37,6
	mANGPTL3(17-455)-His	1,29E+06	3,46E-04	0,268	33,4
	rANGPTL3(17-240)-mmH	1,35E+06	7,18E-04	0,530	16,1

Bảng 5

Dòng kháng thể	Protein	37°C			
		k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H1276S	hANGPTL3(17-170)-His	1,59E+06	2,41E-03	1,52	4,8
	hANGPTL3(17-460)-His	6,32E+05	8,12E-04	1,29	14,2
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,87E+06	1,17E-03	0,625	9,9
	mANGPTL3(17-240)-His	8,19E+05	9,64E-04	1,18	12,0
	mANGPTL3(17-455)-His	1,94E+06	7,91E-04	0,408	14,6
	rANGPTL3(17-240)-mmH	2,05E+06	1,93E-03	0,940	6,0

Bảng 6

Dòng kháng thể	Protein	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H1276S pH=7,2 25°C	hANGPTL3(17-170)-His	1,00E+06	1,10E-03	1,09	10,5
	hANGPTL3(17-460)-His	5,99E+05	4,02E-04	0,670	28,8
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,45E+06	5,38E-04	0,370	21,5
H4H1276S pH=5,75 25°C	hANGPTL3(17-170)-His	2,80E+05	6,72E-03	24,0	1,7
	hANGPTL3(17-460)-His	7,32E+04	4,94E-03	67,5	2,3
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	2,06E+05	4,32E-03	21,0	2,7
H4H1276S pH=7,2 37°C	hANGPTL3(17-170)-His	1,57E+06	2,73E-03	1,74	4,2
	hANGPTL3(17-460)-His	6,67E+05	1,18E-03	1,76	9,8
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,94E+06	1,36E-03	0,700	8,5
H4H1276S pH=5,75 37°C	hANGPTL3(17-170)-His	1,22E+06	3,24E-02	26,7	0,4
	hANGPTL3(17-460)-His	4,71E+04	1,07E-02	227	1,1
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	2,78E+05	5,21E-03	18,8	2,2

Như được thể hiện trong các bảng 4-6, kháng thể H4H1276S thể hiện sự gắn kết với ANGPTL3 có nguồn gốc từ khỉ, chuột nhắt, và chuột cống với ái lực gắn kết và hằng số động học tương tự với ái lực gắn kết và hằng số động học để gắn kết với ANGPTL3 của người.

Bảng 7 thể hiện sự gắn kết của kháng thể kháng ANGPTL3 đã chọn với hANGPTL3 và mANGPTL3 ở nhiệt độ 37°C, pH=7,4, trong dung dịch đệm HBS-EP. NB: không gắn kết.

Bảng 7

Dòng kháng thể	Protein	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	$t_{1/2}$ (phút)
H1M896N	hANGPTL3(17-460)-His	3,36E+06	5,30E-04	1,58E-10	22
	mANGPTL3(17-455)-His	3,62E+06	2,47E-03	6,82E-10	5

H4H1248P	hANGPTL3(17-460)-His	1,96E+06	1,93E-03	9,86E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	NB	NB	NB	NB
H4H1250P	hANGPTL3(17-460)-His	3,50E+06	1,13E-03	3,24E-10	10
	mANGPTL3(17-455)-His	3,18E+06	1,55E-03	4,86E-10	7
H4H1263S	hANGPTL3(17-460)-His	4,74E+06	1,81E-03	3,81E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	NB	NB	NB	NB
H4H1279P	hANGPTL3(17-460)-His	4,74E+06	1,81E-03	3,81E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	2,15E+06	3,59E-04	1,67E-10	32
H4H1292P	hANGPTL3(17-460)-His	1,89E+06	1,94E-03	1,02E-09	6
	mANGPTL3(17-455)-His	3,92E+06	1,49E-03	3,80E-10	8

Như được thể hiện trong bảng 7, kháng thể kháng hANGPTL3 gắn kết với protein có chiều dài đầy đủ có đuôi decahistidin ở đầu C [hANGPTL3(17-460)-His] ở pH=7,4 và 37°C với hằng số phân ly cân bằng theo tính toán ($K_D = k_d/k_a$) nằm trong khoảng từ 158pM đến 1,02nM và với ANGPTL3 của chuột nhắt [mANGPTL3(17-455)-His] với K_D nằm trong khoảng từ 167pM đến 682pM, ngoại trừ H4H1248P và H4H1263S, không thể hiện sự gắn kết với mANGPTL3 dễ phát hiện. Cũng được thể hiện là thời gian bán thải động học ($t_{1/2}$).

Ví dụ 4. Nghiên cứu sự cạnh tranh chéo Biacore đối với kháng thể kháng ANGPTL3

Các thử nghiệm cạnh tranh chéo được tiến hành ở nhiệt độ 25°C trên Biacore về cơ bản như được mô tả trong ví dụ 3 trên đây. Nói tóm lại, sử dụng HBS-EP làm dung dịch đệm chạy, hANGPTL3 có chiều dài đầy đủ (tức là, các gốc axit amin 17-460 nêu trong SEQ ID NO:161) có đuôi decahistidin ở đầu C [hANGPTL3(17-460)-His; R&D Systems, MN; catalog #3829-AN] được bắt giữ trên bề mặt đã gắn kháng penta-histidin cho đến khi đạt được đáp ứng gắn kết bằng 64RU. Để xác định liệu hai kháng thể có gắn kết đồng thời với ANGPTL3 bị bắt giữ hay không, cặp kháng thể được tiêm liên tục, mỗi kháng thể ở nồng độ 167nM ở tốc độ dòng bằng 4µl/phút trong 15 phút, qua bề mặt, và tín hiệu đáp ứng gắn kết tối đa (RU) được đo đối với mỗi biến cố gắn kết. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8 với đáp ứng gắn kết đối

với kháng thể thứ nhất (mAb1), sau đó là đáp ứng gắn kết của kháng thể thứ hai (mAb2) trên bề mặt ANGPTL3 đã nạp trước kháng thể thứ nhất. Các con số in đậm có nghĩa là cặp kháng thể có khả năng gắn kết với hANGPTL3 đồng thời. Các con số in nghiêng thể hiện cặp kháng thể có thể gắn kết đồng thời với hANGPTL3 nếu được tiêm liên tiếp theo một chiều nhưng không gắn kết nếu tiêm theo chiều ngược lại. Các con số trong dấu ngoặc vuông thể hiện sự tự cạnh tranh gắn kết của các kháng thể.

Bảng 8

Các dòng kháng thể	hANGPTL3 (17-460)-His được bắt giữ (RU)	Đáp ứng gắn kết với mAb1 25µg/ml (RU)	Đáp ứng gắn kết với mAb2 25µg/ml (RU)			
			H1M896N	H4H1250P	H4H1279P	H4H1292P
H1M896N	64 ± 4	171 ± 1,8	[-4]	-4	47	50
H4H1250P		210 ± 8,3	-4	[13]	9	8
H4H1279P		45 ± 1,8	186	213	[-3]	-1
H4H1292P		48 ± 0,7	182	220	-3	[-2]
Đối chứng âm		81 ± 1,8	149	187	47	48

Như được thể hiện trong bảng 8, cặp kháng thể H1M896N/H4H1279P và H1M896N/H4H1292P có khả năng gắn kết đồng thời với ANGPTL3 cố định, không kể thứ tự bổ sung kháng thể. H4H1250P gắn kết với ANGPTL3 đã gắn kết trước với H4H1279P; tuy nhiên, khi thứ tự bổ sung kháng thể được đảo ngược, H4H1279P thể hiện tín hiệu gắn kết xấp xỉ bằng 24% so với đáp ứng tối đa kỳ vọng sau khi ANGPTL3 được gắn kết trước với H4H1250P. Tương tự, H4H1250P gắn kết với ANGPTL3 đã gắn kết trước với H4H1292P; tuy nhiên, khi thứ tự bổ sung kháng thể bị đảo ngược, H4H1292P thể hiện tín hiệu đáp ứng xấp xỉ bằng 20% so với đáp ứng tối đa kỳ vọng sau khi ANGPTL3 được gắn kết trước với H4H1250P.

Ví dụ 5. Kháng thể kháng hANGPTL3 gắn kết với peptit xoắn kép ở đầu N ANGPTL3

Để đánh giá sự gắn kết của kháng thể kháng ANGPTL3 H4H1276S

kháng các peptit thu được từ vùng xoắn kép ở đầu N của ANGPTL3, thử nghiệm gắn kết cảm biến sinh học không có chất đánh dấu được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống OCTET[®] RED (FortéBio, Inc.). Để cố định trên cảm biến, các peptit được đánh dấu bằng đuôi biotin ở đầu N [cách nhau bởi một đoạn liên kết linh động, các axit amin “AGSSPGG” (SEQ ID NO:171), đối với peptit 1 và peptit 2; và các axit amin “GGGGS” (SEQ ID NO:172) đối với peptit 3], hoặc đoạn biotin ở đầu C [cách nhau bởi một đoạn liên kết linh động, các axit amin “GPSSGAPPPK” (SEQ ID NO:173), đối với peptit 1 và peptit 2; và các axit amin “GGGGSK” (SEQ ID NO:174) đối với peptit 3]. Các trình tự peptit được thử nghiệm là: peptit đối chứng âm tính, peptit 1 được gắn đuôi biotin ở đầu N (SEQ ID NO:168; các gốc Arg34 đến Leu66 của ANTGPTL4 của người nêu trong SEQ ID NO:164); và các peptit thu được từ vùng xoắn kép ở đầu N của ANGPTL3, tức là, peptit 2 được gắn đuôi biotin ở đầu N (SEQ ID NO:169; các gốc Arg36 đến Leu68 của hANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:161); peptit 2 được gắn đuôi biotin ở đầu C; peptit 3 được gắn đuôi biotin ở đầu N (SEQ ID NO:170; tương ứng với các gốc Glu32 đến Leu57 của hANGPTL3 nêu trong SEQ ID NO:161); và peptit 3 được gắn đuôi biotin ở đầu C. Các trình tự peptit cũng được thể hiện trong Fig.1. Các đầu cảm biến sinh học đã phủ streptavidin được phủ các peptit đã biotinyl hóa thu được 1,22-2,26nm đơn vị đáp ứng gắn kết tùy thuộc vào peptit. Sau đó, các đầu cảm biến sinh học đã phủ peptit được nhúng vào lỗ chứa 1 μ M kháng thể kháng ANGPTL3 H4H1276S hoặc kháng thể đối chứng âm phù hợp isotyp, và sự gắn kết được kiểm tra trong 2,5 phút. Đáp ứng gắn kết của H4H1276S và kháng thể đối chứng isotyp kháng mỗi trong số các peptit được thể hiện tóm tắt ở Fig.2. Quan sát thấy rằng H4H1276S gắn kết với trình tự tuyến tính ANGPTL3 được xác định bởi peptit 2 nhưng không gắn kết với trình tự chồng lên nhau nhưng khác biệt được xác định bởi peptit 3 (cũng xem Fig.1). Kháng thể đối chứng isotyp cũng được dùng làm đối chứng dương để nạp peptit 1 (tức là, peptit hANGPTL4) vào cảm biến sinh học, do kháng thể

đối chứng isotyp này nhận diện đặc hiệu hANGPTL4. Như được thể hiện trong Fig.2, việc gắn kết kháng thể đối chứng với peptit 1 chứng tỏ rằng peptit 1 có mặt trên bề mặt cảm biến và các peptit khác cũng như vậy.

Ví dụ 6. Ức chế hANGPTL3 bằng kháng thể kháng hANGPTL3 trong thử nghiệm sinh học LPL

Lipoprotein Lipaza (LPL) đóng một vai trò quan trọng trong sự chuyển hóa lipid ở người. LPL xúc tác cho sự thủy phân các triglyxerit và giải phóng các axit béo được chuyển hóa. ANGPTL3 ức chế hoạt tính LPL dẫn đến lượng lipid tăng (Oike *et al.*, 2005, *Trends in Molecular Medicine* 11(10):473-479). Vùng xoắn kép ở đầu N của ANGPTL3 ức chế LPL nếu được biểu hiện mà không có vùng fibrinogen ở đầu C và do đó làm cho nó có chức năng ức chế. Thử nghiệm sinh học không tế bào được phát triển để xác định khả năng của kháng thể kháng ANGPTL3 ức chế sự giảm hoạt tính LPL do ANGPTL3 gây ra.

Ức chế hoạt tính hANGPTL3 bởi kháng thể kháng ANGPTL3 được xác định bằng thử nghiệm CONFLUOLIP™ Continuous Fluorometric Lipase (Progen, Germany) sử dụng ba protein hANGPTL3: hANGPTL3 trưởng thành có chiều dài đầy đủ (tức là, các gốc axit amin 17-460 nêu trong SEQ ID NO:161) có đuôi decahistidin ở đầu C [hANGPTL3(17-460)-His; R&D Systems, MN; catalog #3829-AN], vùng xoắn kép ở đầu N (tức là, các gốc axit amin 17-169 nêu trong SEQ ID NO:161) có dung hợp Fc của chuột nhắt ở đầu C [hANGPTL3(17-169)-mFc; SEQ ID NO:165], và vùng xoắn kép ở đầu N của hANGPTL3 (tức là, các gốc axit amin 17-170 nêu trong SEQ ID NO:161) chứa đuôi hexahistidin ở đầu C [hANGPTL3(17-170)-His].

Nói tóm lại, LPL của bò (nồng độ cuối bằng 2nM), ApoCII của người (đồng yếu tố của LPL, nồng độ cuối bằng 0,23μM), và BSA (nồng độ cuối bằng 2mg/ml) trong PBS được trộn sơ bộ. Các protein tái tổ hợp hANGPTL3 được bổ sung vào hỗn hợp Apo/LPL (nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 80

đến 100nM). Sau đó, hỗn hợp protein Apo/LPL/ANGPTL3 được bổ sung cùng với kháng thể kháng hANGPTL3 được pha loãng liên tiếp và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau khi ủ, 100µl cơ chất lipaza đã hoàn nguyên, 1-trinitrophenyl-amino-dodecanoyl-2-pyrendecanoyl-3-O-hexadecyl-sn-glycerol (LS-A, Progen), được bổ sung vào 25µl hỗn hợp kháng thể vào đĩa thử nghiệm có 96 lỗ và ủ ở nhiệt độ 37°C trong hai giờ. Sau đó, đo mức huỳnh quang ở bước sóng 342nm/400nm (kích thích/phát xạ) bằng cách sử dụng thiết bị đọc vi đĩa FLEXSTATION® 3 (Molecular Devices, CA). Mức huỳnh quang tỷ lệ thuận với hoạt tính LPL.

Kháng thể H4H1276S thể hiện sự ức chế hoạt tính ức chế của hANGPTL3 chống lại LPL. Đáp ứng liều đầy đủ sử dụng protein hANGPTL3 trong thử nghiệm LPL được tiến hành đầu tiên để xác định EC₅₀ ANGPTL3 đối với mỗi thử nghiệm, và sau đó tiến hành các phương pháp xác định IC₅₀ đối với kháng thể bằng cách sử dụng nồng độ protein ANGPTL3 cố định, như được thể hiện trong bảng 8. Các nồng độ kháng thể cần để ức chế tối đa 50% (IC₅₀) được xác định là 9,6nM đối với 80nM hANGPTL3(17-460)-His, 2,9nM đối với 100nM hANGPTL3(17-170)-His và 21nM đối với 80nM hANGPTL3(17-169)-mFc, tương ứng. Nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 0 đến 300nM để thử nghiệm các protein ANGPTL3 của người.

Tương tự, H4H1276S được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học LPL về khả năng ức chế các vùng cùng nguồn chéo loài: vùng đầu N của khỉ cynomolgus (các gốc axit amin 17-170 nêu trong SEQ ID NO:177) được biểu hiện với đuôi myc-myc-hexa-histidin ở đầu C [MfANGPTL3(17-170)-mmH; SEQ ID NO:167], các gốc axit amin 17-240 ở vùng đầu N cùng nguồn của chuột nêu trong SEQ ID NO:163 với đuôi hexa-histidin ở đầu N [mANGPTL3(17-240)-His; SEQ ID NO:166], và ANGPTL3 trưởng thành có chiều dài đầy đủ từ *Mus musculus* (tức là, các gốc axit amin 17-455 nêu trong SEQ ID NO:163) có đuôi decahistidin ở đầu C [mANGPTL3(17-455)-His;

R&D Systems, MN; catalog #136-AN]. IC₅₀ được xác định là 10nM đối với 500nM MfANGPTL3(17-170)-mmH cố định, 14nM đối với 80nM mANGPTL3(17-455)-His cố định, và 31nM đối với 500nM mANGPTL3(17-240)-His cố định. Nồng độ kháng thể nằm trong khoảng từ 0 đến 600nM để thử nghiệm các protein ANGPTL3 của khỉ và của chuột nhắt. Các kết quả được thể hiện tóm tắt trong bảng 9.

Kháng thể chống lại vùng đầu N của protein ANGPTL4 tương đồng cũng được thể hiện là phong bế chức năng ức chế của ANGPTL4 trên LPL (Lee et al., 2009, J. Biol. Chem. 284:13735-13745). Do đó, để đánh giá khả năng phản ứng chéo có thể có với ANGPTL4, kháng thể kháng ANGPTL3 H4H1276S cũng được thử nghiệm chống lại ANGPTL4 của người trong thử nghiệm LPL lipaza, được tiến hành như được mô tả trên đây đối với các protein ANGPTL3. Dạng tái tổ hợp của vùng xoắn kép của ANGPTL4 của người (các gốc 26-148 nêu trong SEQ ID NO:164) có dung hợp Fc IgG2a của chuột ở đầu C [hANGPTL4(26-148)-mFc, SEQ ID NO:178] thể hiện EC₅₀ trong thử nghiệm LPL bằng 0,2nM (bảng 9). H4H1276S, được thử nghiệm ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0 đến 600nM, không phong bế sự ức chế này (NB: không gắn kết; trong bảng 9).

Bảng 9

		ANGPT L3(17- 460)- His của người	ANGPT L3(17- 170)- His của người	ANGPT L3 (17- 169)- mFc của người	ANGPT L3 (17- 170)- mmH của khỉ	ANGPT L3(17- 455)- His của chuột nhắt	ANGPT L3(17- 240)- His của chuột nhắt	ANGP TL4(26 -148)- mFc của người
EC₅₀ (nM)		50	91	16	625	33	199	0,2
ANGPTL3 hoặc 4 của người (nM)		80	100	80	500	80	500	2
IC₅₀ (nM)	^{H4H} 1276S	9,6	2,9	21	10	14	31	NB
	IgG4 cont.	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Như được thể hiện trên đây, H4H1276S ức chế hoạt tính của ANGPTL3 của người (có chiều dài đầy đủ và ở đầu N), protein ANGPTL3 của khỉ (đầu N) và ANGPTL3 của chuột nhắt (có chiều dài đầy đủ và ở đầu N) ở mức tương đối với IC_{50} nằm trong khoảng từ 3 đến 31nM.

Một nhóm nhỏ kháng thể cũng được thử nghiệm để xác định liệu hỗn hợp của hai kháng thể không phong bế ANGPTL3 được bổ sung đồng thời có thể phong bế hoạt tính ức chế LPL của ANGPTL3 hay không. Cặp kháng thể được thử nghiệm để ức chế vùng đầu N của cả ANGPTL3 của chuột nhắt và của người, tức là, hANGPTL3(17-169)-mFc và mANGPTL3(17-240)-His, tương ứng. Đối với thử nghiệm này, các protein ANGPTL3 thể hiện giá trị IC_{50} để phong bế LPL bằng 47nM [đối với hANGPTL3(17-169)-mFc] và 341nM [đối với mANGPTL3(17-240)-His]. Các cặp dưới đây, nếu được bổ sung ở nồng độ cuối ít nhất là 200nM đối với mỗi kháng thể, thì sẽ không phong bế được sự ức chế LPL bởi hANGPTL3(17-169)-mFc ở nồng độ 80nM hoặc mANGPTL3(17-240)-His ở nồng độ 500nM: H1M896N + H4H1279P; H4H1250P + H4H1279P; H4H1248P + H4H1292P; và H4H1263S + H4H1292P. Trong thử nghiệm này, một mình H4H1276S phong bế ANGPTL3 của chuột nhắt và của người ở cùng một nồng độ cố định với IC_{50} bằng 33nM và 64nM, tương ứng.

Ví dụ 7.1. Tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 in vivo đến lượng lipid trong huyết thanh

Tác dụng của kháng thể kháng hANGPTL3 H4H1726S đến lượng lipid trong huyết thanh được xác định ở chuột C57Bl/6. Chuột được lấy máu trước thử nghiệm 7 ngày và được chia thành các nhóm gồm sáu con cho mỗi liều kháng thể được thử nghiệm. Kháng thể được sử dụng ở liều 5mg/kg (H4H1726S) và 10mg/kg [H4H1726S và đối chứng hIgG4(S108P) phù hợp isotyp với tính đặc hiệu không thích hợp] bằng cách tiêm dưới da vào ngày 0 của nghiên cứu. Chuột được lấy máu sau 4 giờ bị bỏ đói vào các ngày 1, 4, 7

và 12 sau khi tiêm kháng thể và lượng lipid trong huyết thanh (triglyxerit, tổng lượng cholesterol, cholesterol không HDL, cholesterol LDL và cholesterol HDL) được xác định trong huyết thanh nhờ ADVIA[®] 1800 Chemistry System (Siemens). Các giá trị trung bình được tính toán đối với mỗi thời điểm đối với mỗi kháng thể. Các kết quả của nồng độ lipid trong huyết thanh, được thể hiện ở dạng (giá trị trung bình $\pm$ SEM), được nêu trong bảng 10-14.

Bảng 10

Số ngày sau tiêm	Triglyxerit trong huyết thanh (mg/dL)					
	Ab đối chứng (10mg/kg)		H4H1276S (5mg/kg)		H4H1276S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	87,83	6,18	89,83	3,65	87,17	5,062
1	123,16	7,02	68,00	2,84	53,83	2,52
4	99,66	10,15	62,16	5,82	50,67	3,51
7	99,83	4,57	55,83	4,95	39,67	2,55
12	82,00	5,75	76,83	10,56	53,00	6,51

Bảng 11

Số ngày sau tiêm	Tổng lượng cholesterol (mg/dL)					
	Ab đối chứng (10mg/kg)		H4H1276S (5mg/kg)		H4H1276S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	82,50	2,11	80,33	1,15	81,33	2,14
1	87,83	1,87	71,50	5,48	63,67	3,38
4	75,00	2,58	59,50	3,51	51,00	2,98
7	83,50	1,77	67,00	1,79	61,33	2,33
12	87,83	1,82	83,00	4,30	69,33	3,22

Bảng 12

Số ngày sau tiêm	Cholesterol không HDL (mg/dL)					
	Ab đối chứng (10mg/kg)		H4H1276S (5mg/kg)		H4H1276S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	41,18	0,75	38,78	0,81	40,23	1,18
1	42,18	0,55	35,75	3,05	32,70	1,94
4	36,40	1,04	29,63	2,16	27,55	1,78
7	40,82	0,75	34,67	1,83	32,02	1,68
12	41,72	0,87	39,85	2,21	35,13	1,47

Bảng 13

Số ngày sau tiêm	Cholesterol LDL (mg/dL)					
	Ab đối chứng (10mg/kg)		H4H1276S (5mg/kg)		H4H1276S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	4,68	0,35	4,40	0,34	4,47	0,21
1	5,40	0,41	5,20	0,79	5,33	0,71
4	4,80	0,45	4,88	0,67	5,33	0,73
7	5,38	0,46	5,83	0,48	6,40	0,67
12	5,67	0,59	6,12	0,65	5,35	0,48

Bảng 14

Số ngày sau tiêm	Cholesterol HDL (mg/dL)					
	Ab đối chứng (10mg/kg)		H4H1276S (5mg/kg)		H4H1276S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	41,32	1,57	41,55	0,90	41,10	1,37
1	45,65	1,85	35,75	2,54	30,97	2,13
4	38,60	2,26	29,87	1,62	23,45	1,66
7	42,68	1,81	32,33	1,25	29,32	1,72
12	46,12	1,94	43,15	2,52	34,20	1,99

Lượng H4H1276S tuần hoàn (kháng thể trong huyết thanh) cũng được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA chuẩn. Nói tóm lại, các đĩa được phủ kháng thể của dê kháng Fc của người (Sigma-Aldrich) để bắt giữ kháng thể trong huyết thanh. Huyết thanh được bổ sung vào các đĩa và kháng thể của người đã bị bắt giữ được phát hiện bằng sự phát quang hóa học sử dụng kháng thể của dê kháng IgG của người được tiếp hợp peroxidaza cây củ cải cay (HRP) (Sigma-Aldrich). Kết quả được thể hiện ở dạng (giá trị trung bình $\pm$ SEM) được nêu trong bảng 15. Đối chứng: chuột được nhận kháng thể đối chứng phù hợp isotyp.

Bảng 15

Số ngày sau tiêm	Ab trong huyết thanh (μ g/mL)					
	Ab đối chứng (10mg/kg)		H4H1276S (5mg/kg)		H4H1276S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM

1	65,00	8,05	36,38	7,57	126,23	9,96
4	59,16	4,94	29,91	4,32	86,28	6,77
7	58,23	6,02	30,86	5,11	54,24	8,96
12	41,35	9,76	5,48	1,79	39,04	7,08

Sử dụng liều đơn H4H1276S cho chuột C57Bl/6 ở liều 10mg/kg dẫn đến làm giảm ~60% lượng triglyxerit trong hệ tuần hoàn 7 ngày sau khi sử dụng kháng thể (so với đối chứng isotyp). Sử dụng H4H1276S cũng dẫn đến làm giảm đáng kể tổng lượng cholesterol, cholesterol không HDL và cholesterol HDL và không có tác động đến lượng LDL. Lượng lipit cũng được quan sát thấy là giảm, nhưng không rõ rệt mấy, ở mức liều 5mg/kg so với mức liều 10mg/kg; ví dụ, lượng triglyxerit trong huyết thanh được giảm 44% (so với đối chứng isotyp) 7 ngày sau khi sử dụng kháng thể.

Ví dụ 7.2. Tác dụng của kháng thể kháng ANGPTL3 in vivo đến lượng lipit trong huyết thanh

Đánh giá tác dụng của kháng thể kháng hANGPTL3 H4H1276S in vivo và kháng thể so sánh 4.9.1 đến lượng lipit trong huyết thanh được tiến hành ở chuột C57Bl/6. Kháng thể 4.9.1 được tổng hợp dựa trên trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 24 (VH) và SEQID No: 32 (VL) như được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0177045 và ở dạng isotyp IgG1 của chuột nhắt. Chuột được lấy máu vào thời điểm 7 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm và được chia thành các nhóm, mỗi nhóm 6 con. Kháng thể H4H1276S, 4.9.1, và các đối chứng âm tính phù hợp isotyp (IgG4 của người và IgG1 của chuột nhắt, tương ứng) với tính đặc hiệu không thích hợp được sử dụng ở liều 10mg/kg bằng cách tiêm dưới da vào ngày 0 của nghiên cứu. Chuột được lấy máu sau 4 giờ để đổi vào các ngày 1, 7, 11 và 20 sau khi tiêm kháng thể, và lượng lipit trong huyết thanh (triglyxerit, tổng lượng cholesterol, cholesterol không HDL, cholesterol LDL và cholesterol HDL) được xác định trong huyết thanh bằng cách sử dụng ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Nồng độ lipit trung bình được tính toán ở mỗi thời điểm đối với mỗi kháng thể. Các kết quả của nồng độ lipit trong huyết

thanh, được thể hiện ở dạng (trung bình $\pm$ SEM), được thể hiện trong bảng 16-20.

Bảng 16

Số ngày sau tiêm	Triglyxerit trong huyết thanh (mg/dL)							
	Đối chứng (IgG4)		H4H1276S		Đối chứng (IgG1)		4.9.1	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M
- 7	109,16	9,05	109,16	6,44	112,80	6,87	109,17	7,24
1	81,67	6,76	46,00	3,59	95,20	8,92	41,83	2,42
7	95,67	5,42	49,67	3,86	101,80	7,55	96,00	3,70
11	100,83	6,20	51,00	5,89	117,00	6,00	92,00	4,50
20	82,17	4,36	72,67	3,47	79,40	6,59	73,83	5,03

Bảng 17

Số ngày sau tiêm	Tổng lượng cholesterol (mg/dL)							
	Đối chứng (IgG4)		H4H1276S		Đối chứng (IgG1)		4.9.1	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M
- 7	80,81	0,95	80,92	3,05	80,32	2,84	79,37	2,76
1	82,82	2,11	67,33	3,60	82,98	2,17	71,35	1,82
7	79,20	1,81	63,58	3,98	85,02	7,27	82,07	4,36
11	89,97	3,18	69,02	2,11	83,92	2,49	84,58	1,08
20	92,43	1,10	80,17	3,20	87,47	2,58	88,40	2,84

Bảng 18

Số ngày sau tiêm	Cholesterol không HDL (mg/dL)							
	Đối chứng (IgG4)		H4H1276S		Đối chứng (IgG1)		4.9.1	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M	Trung bình	SEM
- 7	42,44	1,18	42,87	1,03	43,20	2,44	41,73	1,40
1	40,85	1,48	35,33	1,79	40,68	0,87	36,97	1,49
7	39,03	1,04	33,72	2,86	43,30	4,35	40,47	2,35
11	44,68	1,93	35,18	1,64	40,28	0,95	41,38	1,05
20	47,40	0,67	42,10	1,51	44,72	1,66	44,40	1,57

Bảng 19

Số ngày sau tiêm	Cholesterol LDL (mg/dL)							
	Đối chứng (IgG4)		H4H1276S		Đối chứng (IgG1)		4.9.1	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M
- 7	3,93	0,07	4,20	0,26	4,38	0,26	4,20	0,18
1	3,95	0,28	4,25	0,37	3,92	0,17	4,62	0,37
7	3,75	0,14	5,25	1,08	5,76	1,61	4,57	0,73
11	5,05	0,26	5,47	0,23	4,88	0,27	4,78	0,23
20	5,72	0,34	4,95	0,32	4,97	0,28	5,65	0,46

Bảng 20

Số ngày sau tiêm	Cholesterol HDL (mg/dL)							
	Đối chứng (IgG4)		H4H1276S		Đối chứng (IgG1)		4.9.1	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M	Trung bình	SE M
- 7	38,37	0,95	38,00	2,27	37,12	1,88	37,63	1,52
1	41,97	1,32	32,00	1,89	42,30	2,09	34,38	0,85
7	40,17	0,93	29,87	1,23	41,72	2,97	41,60	2,47
11	45,28	1,80	33,83	1,15	43,64	1,70	43,20	1,57
20	45,03	0,75	38,07	1,79	42,75	1,69	44,00	1,83

Sử dụng liều đơn 10mg/kg H4H1276S ở chuột C57Bl/6 dẫn đến làm giảm lượng triglycerit trong huyết tương so với đối chứng isotyp vào các ngày 1, 7, 11 và 20 sau khi tiêm kháng thể; và tác dụng này được kéo dài hơn so với điều trị đơn bằng kháng thể so sánh 4.9.1 ở mức liều tương tự (bảng 16). Sử dụng H4H1276S cũng dẫn đến làm giảm tổng lượng cholesterol (bảng 17) và cholesterol HDL (bảng 20) ở chuột C57Bl/6.

Ví dụ 8. Tác dụng của H4H1276S in Vivo đến lượng lipid trong huyết thanh ở chuột ApoE^{-/-} bị tăng lipid huyết

Tác dụng của kháng thể kháng hANGPTL3 H4H1276S đến lượng lipid trong huyết thanh được xác định ở chuột apoE^{-/-}. Các con chuột này bị tăng lipid huyết và phần lớn cholesterol trong hệ tuần hoàn được tìm thấy ở dạng

VLDL và LDL. Chuột được lấy máu ở thời điểm 7 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm và được chia thành các nhóm, mỗi nhóm 6 con. Kháng thể, H4H1276S và đối chứng phù hợp isotyp (hIgG4) với tính đặc hiệu không thích hợp, được sử dụng ở liều 10mg/kg bằng cách tiêm dưới da vào ngày 0 của nghiên cứu. Chuột được lấy máu sau 4 giờ bị bỏ đói vào các ngày 1, 4, 7 và 11 sau khi tiêm kháng thể; và lượng lipid trong huyết thanh (triglyxerit, tổng lượng cholesterol, cholesterol không HDL, cholesterol LDL và cholesterol HDL) được xác định trong huyết thanh bằng cách sử dụng ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Nồng độ lipid trung bình được tính toán ở mỗi thời điểm đối với mỗi nhóm được điều trị bằng kháng thể. Kết quả của nồng độ lipid trong huyết thanh, được thể hiện ở dạng (trung bình $\pm$ SEM), được nêu trong bảng 21-25.

Bảng 21

Số ngày sau tiêm	Lượng triglyxerit trong huyết thanh (mg/dL)			
	Đối chứng (hIgG4)		H4H1276S	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	134,17	11,81	141,67	17,14
1	156,33	19,06	61,33	3,66
4	181,00	7,70	70,50	4,46
7	190,67	27,65	52,50	6,22
11	170,00	28,85	133,00	13,56

Bảng 22

Số ngày sau tiêm	Tổng lượng cholesterol (mg/dL)			
	Đối chứng (hIgG4)		H4H1276S	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	450,67	25,68	479,33	13,76
1	497,50	37,77	386,33	28,59
4	395,00	14,37	281,20	20,83
7	447,33	22,18	295,50	12,86
11	463,80	36,01	398,03	23,13

Bảng 23

Số ngày sau tiêm	Cholesterol không HDL (mg/dL)	
	Đối chứng (hIgG4)	H4H1276S

	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	435,87	25,59	464,53	13,97
1	476,30	37,29	371,25	28,65
4	375,61	14,51	266,26	21,19
7	427,66	21,45	280,75	12,55
11	442,27	34,19	379,55	22,31

Bảng 24

Số ngày sau tiêm	Cholesterol LDL (mg/dL)			
	Đối chứng (hIgG4)		H4H1276S	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	14,27	1,63	14,87	0,90
1	17,42	2,94	11,23	1,81
4	10,28	1,52	6,62	0,83
7	11,82	1,40	6,32	0,45
11	13,90	2,54	10,21	1,14

Bảng 25

Số ngày sau tiêm	Cholesterol HDL (mg/dL)			
	Đối chứng (hIgG4)		H4H1276S	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	14,80	0,37	14,80	0,54
1	21,20	1,00	15,08	0,53
4	19,33	0,94	14,53	0,75
7	19,77	0,78	14,58	0,72
11	21,53	1,89	18,48	1,00

Cho chuột apoE^{-/-} sử dụng một mình H4H1276S ở liều 10mg/kg dẫn đến làm giảm ~72% (trung bình) lượng triglyxerit trong hệ tuần hoàn (bảng 21) và làm giảm ~46% (trung bình) lượng cholesterol LDL (bảng 24) 7 ngày sau khi sử dụng kháng thể (so với đối chứng Ab phù hợp isotyp, tức là, hIgG4). Sử dụng H4H1276S cũng dẫn đến làm giảm tổng lượng cholesterol (bảng 22) và cholesterol không HDL (bảng 23).

Lượng H4H1276S trong hệ tuần hoàn (kháng thể trong huyết thanh) cũng được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA chuẩn. Nói tóm lại, các đĩa được phủ kháng thể của dê kháng Fc của người (Sigma-Aldrich) để bắt giữ Ab trong huyết thanh. Sau đó, huyết thanh được bổ sung vào đĩa và

kháng thể bị bắt giữ được phát hiện bằng sự phát quang hóa học bằng cách sử dụng kháng thể của dê kháng IgG của người được tiếp hợp peroxidaza cây củ cải cay (HRP) (Sigma-Aldrich). Kết quả, được thể hiện ở dạng (trung bình $\pm$ SEM), được thể hiện trong bảng 26 (đối chứng: chuột mà nhận đối chứng Ab phù hợp isotyp, tức là, hIgG4).

Bảng 26

Số ngày sau tiêm	Lượng Ab trong huyết thanh ($\mu\text{g/mL}$)			
	Đối chứng (hIgG4) (10mg/kg)		H4H1276S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
1	89,98	16,70	115,29	19,75
4	67,18	2,38	86,61	5,32
7	58,52	2,00	39,85	6,91
12	43,26	1,76	3,18	2,64

Ví dụ 9. Tác dụng của H4H1276S in vivo đến lượng lipid trong hệ tuần hoàn ở chuột *Ldlr^{-/-}* bị tăng lipid huyết

Tác dụng của kháng thể kháng hANGPTL3 H4H1726S đến lượng lipid trong huyết thanh được xác định ở chuột *Ldlr^{-/-}*. Chuột này bị tăng lipid huyết với phần lớn lượng cholesterol trong hệ tuần hoàn được tìm thấy ở dạng LDL do thiếu LDLR, thụ thể chính để hấp thu cholesterol LDL.

Chuột được lấy máu 7 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm và được chia thành các nhóm, mỗi nhóm 6 con. Kháng thể, H4H1726S và đối chứng âm phù hợp isotyp (hIgG4) được sử dụng ở liều 10mg/kg bằng cách tiêm dưới da vào ngày 0 của nghiên cứu. Chuột được lấy máu sau 4 giờ bị bỏ đói vào các ngày 1, 4, 7 và 11, sau khi tiêm kháng thể và lượng lipid trong huyết thanh (triglycerit, tổng lượng cholesterol, cholesterol không HDL, cholesterol LDL và cholesterol HDL) được xác định bằng cách sử dụng thiết bị phân tích hóa học lâm sàng ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Các giá trị trung bình được tính toán ở mỗi thời điểm đối với mỗi kháng thể. Kết quả của nồng độ lipid trong huyết thanh (triglycerit, tổng lượng cholesterol, cholesterol

không HDL, cholesterol LDL và cholesterol HDL), được thể hiện ở dạng (trung bình $\pm$ SEM), được nêu trong bảng 27-31, tương ứng. (Đối chứng = chuột được nhận kháng thể đối chứng phù hợp isotyp).

Bảng 27. Lượng triglyxerit trong huyết thanh (mg/dL)

Số ngày sau tiêm	Kháng thể			
	Đối chứng (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	114,50	11,08	110,83	6,89
1	131,50	6,18	74,17	3,30
4	112,67	8,94	68,00	3,91
7	136,67	11,55	92,67	12,16
11	142,33	7,10	95,83	8,67

Bảng 28. Tổng lượng cholesterol (mg/dL)

Số ngày sau tiêm	Kháng thể			
	Đối chứng (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	237,95	7,33	236,99	5,68
1	241,97	10,58	206,98	9,68
4	229,88	7,61	172,96	4,49
7	234,74	10,49	176,28	7,47
11	251,87	18,82	201,73	10,12

Bảng 29. Lượng cholesterol không HDL (mg/dL)

Số ngày sau tiêm	Kháng thể			
	Đối chứng (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	180,81	7,47	182,79	5,93
1	184,35	10,22	155,93	8,74
4	175,13	7,26	130,79	4,66
7	174,84	9,26	126,56	6,63
11	190,00	17,07	145,43	7,34

Bảng 30. Lượng cholesterol LDL (mg/dL)

Số ngày sau tiêm	Kháng thể			
	Đối chứng (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	62 ,75	2 ,18	62 ,75	1 ,81
1	63 ,25	2 ,40	53 ,82	4 ,09
4	60 ,97	3 ,14	49 ,65	2 ,72
7	59 ,52	2 ,99	46 ,05	2 ,13
11	63 ,23	3 ,07	54 ,28	1 ,67

Bảng 31. Lượng cholesterol HDL (mg/dL)

Số ngày sau tiêm	Kháng thể			
	Đối chứng (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
- 7	57 ,13	1 ,56	54 ,20	1 ,89
1	57 ,62	0 ,88	51 ,05	0 ,98
4	54 ,75	2 ,23	42 ,17	1 ,89
7	59 ,90	2 ,51	49 ,72	2 ,35
11	61 ,87	2 ,48	56 ,30	3 ,43

Như được thể hiện trong bảng 27-31, cho chuột *Ldlr*^{-/-} sử dụng H4H1726S dẫn đến làm giảm đáng kể lượng triglycerit trong huyết tương với mức giảm đối đa quan sát được là 44% (dựa trên giá trị trung bình). Các mức giảm đáng kể về lượng cholesterol LDL (lên đến 23%), cũng như là tổng lượng cholesterol, cholesterol không HDL và cholesterol HDL, cũng được quan sát thấy ở các con chuột được điều trị bằng H4H1726S. Giảm cholesterol LDL ở chuột bị thiếu thụ thể chính để hấp thu cholesterol LDL (LDLR) chứng tỏ cơ chế làm giảm cholesterol LDL không phụ thuộc vào LDLR là ức chế ANGPTL3.

Lượng H4H1726S trong hệ tuần hoàn (kháng thể trong huyết thanh) cũng được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA chuẩn. Nói tóm lại, các đĩa được phủ kháng thể của dê kháng Fc của người (Sigma-Aldrich) để bắt giữ Ab trong huyết thanh. Sau đó, huyết thanh được bổ sung vào các đĩa và kháng thể bị bắt giữ được phát hiện nhờ phát quang hóa học sử dụng

kháng thể của dê kháng IgG của người được tiếp hợp với peroxidaza cây củ cải cay (HRP) (Sigma-Aldrich). Kết quả, được thể hiện ở dạng (trung bình $\pm$ SEM) được nêu trong bảng 32. (Đối chứng = chuột mà được nhận kháng thể đối chứng phù hợp isotyp).

Bảng 32. Lượng kháng thể trong huyết thanh ($\mu\text{g/ml}$)

Số ngày sau tiêm	Kháng thể			
	Đối chứng (10mg/kg)		H4H1726S (10mg/kg)	
	Trung bình	SEM	Trung bình	SEM
1	44 ,59	1 ,95	58 ,79	5 ,95
4	42 ,28	6 ,12	47 ,21	10 ,24
7	41 ,76	3 ,87	28 ,88	5 ,97
11	37 ,25	6 ,85	21 ,02	4 ,86

Như được thể hiện trong bảng 32, lượng H4H1726S trong huyết thanh giảm đến $21\mu\text{g/ml}$ vào ngày 11 sau khi tiêm kháng thể ở liều 10mg/kg vào chuột.

Sáng chế không bị giới hạn ở phạm vi của các phương án cụ thể được mô tả ở đây. Quả thực, nhiều cải biến khác của sáng chế ngoài các cải biến được mô tả ở đây là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào phần mô tả trên đây và các hình vẽ đi kèm. Các cải biến này được dự định là thuộc phạm vi yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể của người được phân lập hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với protein giống angiopoietin 3 của người (human angiopoietin-like protein 3-hANGPTL3) nêu trong SEQ ID NO:161 và trung hòa, làm giảm, hoặc can thiệp vào, ít nhất một hoạt tính của hANGPTL3, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể này bao gồm:

a) bao gồm cặp trình tự HCVR và LCVR 1 nêu trong SEQ ID NO: 66/74;
 (b) bao gồm các trình tự vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR) chuỗi nặng, HCDR1, HCDR2 và HCDR3, và các CDR chuỗi nhẹ, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, nằm trong cặp trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region - HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) (HCVR/LCVR) nêu trong SEQ ID NO: 66/74, trong đó các CDR được xác định bằng định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia hoặc định nghĩa AbM;

hoặc

(c) bao gồm tổ hợp trình tự

HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 68/70/72/76/78/80.

2. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó:

(a) Kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này phản ứng chéo với ANGPTL3 ở khi đầu chó; và/hoặc

(b) Kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này phản ứng chéo với ANGPTL3 chuột nhắt hoặc chuột đồng; và/hoặc

(c) Kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên này phản ứng chéo với bất kỳ trong số ANGPTL3 ở khi đầu chó, ANGPTL3 chuột nhắt, và ANGPTL3 chuột đồng.

3. Kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:

(a) Kháng thể hoặc đoạn của nó là kháng thể mạch đơn, Fab, hoặc F(ab')₂;

và/hoặc

(b) Kháng thể hoặc đoạn của nó là kháng thể người dạng khảm hoặc kháng thể người hoàn toàn.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là IgG1 hoặc IgG4.

5. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc kháng thể theo điểm 4.

6. Vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo điểm 5.

7. Tế bào chủ phân lập chứa vector biểu hiện theo điểm 6.

8. Phương pháp tổng hợp kháng thể kháng hANGPTL3 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 7 trong các điều kiện cho phép tổng hợp kháng thể hoặc đoạn của nó, và thu hồi kháng thể hoặc đoạn của nó đã được tổng hợp.

9. Dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, hoặc một hoặc nhiều kháng thể theo điểm 4 và chất mang dược dụng.

10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó dược phẩm này còn chứa một hoặc nhiều chất điều trị khác được chọn từ nhóm bao gồm chất ức chế HMG-CoA reductaza; niacin; fibrat, 22-hydroxycholesterol, ezetimibe cộng simvastatin, statin cùng với nhựa mật, niacin cộng statin, niacin cộng este etyl của axit béo omega-3, statin, kháng thể kháng hANGPTL4 và kháng thể kháng PCSK9.

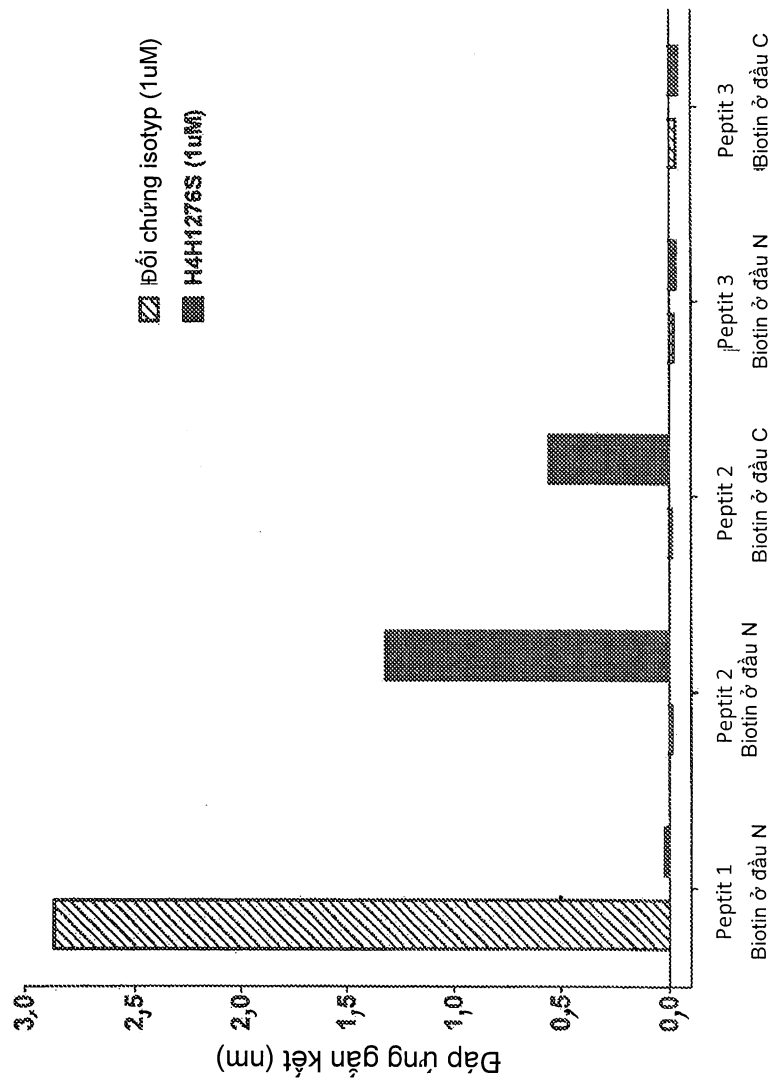


Fig. 2

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> KHÁNG THỂ CỦA NGƯỜI ĐƯỢC PHÂN LẬP KHÁNG PROTEIN GIỐNG ANGIOPOIETIN 3 CỦA NGƯỜI (hANGPTL3), PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP KHÁNG THỂ NÀY VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 6500A-WO

<140> được chuyển nhượng

<141> được nộp ở đây

<150> 61/498,518

<151> 2011-06-17

<150> 61/578,309

<151> 2011-12-21

<160> 194

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

```
cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagtggga 300
gctactactt tctactacta ctacgggtatg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca                                     369
```

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

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

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

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 ggattcacct tcagtagtta tggc

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5
 atatcatatg atggaagtaa taaa

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 6
 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 7
 gcgaaagtgg gagctactac tttctactac tactacggta tggacgtc 48

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 8
 Ala Lys Val Gly Ala Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 9
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ttgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtca ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaaaag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Phe Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Ala Asn Ser Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 11
 cagggtatta gcagctgg

18

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 12
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 13
 gctgcatcc

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 14
 Ala Ala Ser
 1

<210> 15
 <211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 15

caaaaggcta acagtttccc attcact

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 16

Gln Lys Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr

1

5

<210> 17

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 17

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcaaag atggaagtaa taaatactat 180
 gtagattccg tgaagggccg attcaccatg ggcagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctccaaatga acagcctgag agttgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaggggct 300
 ggaactcttt actactacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 18

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

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

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 19
 ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 21
 atatcaaatg atggaagtaa taaa

24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 22
 Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 23
 <211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 23

gcgaaagggg ctggaactct ttactactac tactacggta tggacgtc

48

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Ala	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10					15	

<210> 25

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 25

gacatccaga	tgacccagtc	tccttccacc	ctgtctgcat	ctgtaggaaa	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggccagtc	aagtattagt	agctgggttg	cctgggtatca	acaaaaacca	120
gggaaagccc	ctaagttcct	gatctataag	gcgtctagtt	tagaaagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagaa	ttcactctca	ccatcaccag	cctgcagcct	240
gatgattttg	caacttatta	ctgccaacag	tacaatat	attcgtggac	gttcggccaa	300
gggaccaagg	tggaatcaa	a				321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 26

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

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

<210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 27
 caaagtatta gtagctgg

18

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 28
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 29
 aaggcgtct

9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 30
 Lys Ala Ser
 1

<210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 31

caacagtaca atatattattc gtggacg

27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 32

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Ser Trp Thr

1

5

<210> 33

<211> 372

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 33

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg gatggcagtt atatcatttg atagaggtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagggggg 300
 gggttcgggga ctttctacta ctactacggt atggacgtct ggggcccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 34

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 34

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

		100						105			110
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120				

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggattcacct tcagtaccta tggc

24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 36
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
 1 5

<210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 37
 atatcatttg atagaggtaa taaa

24

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 38
 Ile Ser Phe Asp Arg Gly Asn Lys
 1 5

<210> 39
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 39

gcgaaagggg ggggttcggg gactttctac tactactacg gtatggacgt c 51

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 40

Ala	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp
1				5					10					15	
Val															

<210> 41

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 41

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctgtaggaaa	cagagtcacc	60
atcacttgtc	gggcgagtc	gggtattagc	agctggtag	cctggatatca	ccagaaacca	120
gggaaagtcc	ctaaggtcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttacta	ttgtcaacag	gctaacagtt	tcccattcac	tttcggccct	300
gggaccaaag	tgatatca	acga				324

<210> 42

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

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

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

<210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 43
 cagggtatta gcagctgg

18

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 44
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 45
 gctgcatcc

9

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 46
 Ala Ala Ser
 1

<210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 47

caacaggcta acagtttccc attcact

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 48

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr

1

5

<210> 49

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 49

```
caggtagcagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaaac cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtc ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggtat 180
aatgattatg cagtgtctgt gagaggtcga ataaccatca acccagacac atccaataac 240
cagttctccc tacatctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggcgatgta ttactgtgca 300
agagacaagg gtctaacagc tcgtccgacc tactttgact actggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctca 375
```

<210> 50

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 50

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

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 51
 ggggacagtg tctctagcaa cagtcctgct 30

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 52
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Pro Ala
 1 5 10

<210> 53
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 53
 acatactaca ggtccaagtg gtataat 27

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 54
 Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
 1 5

<210> 55
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 55

gcaagagaca aggggtctaac agctcgtccg acctactttg actac

45

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 56

Ala Arg Asp Lys Gly Leu Thr Ala Arg Pro Thr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 57

<211> 326

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 57

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagtattaat tactggttgg cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcccct tatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gacgatttta caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctccgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaac 326

<210> 58

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 59
 cagagtatta attactgg

18

<210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 60
 Gln Ser Ile Asn Tyr Trp
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 61
 aaggcgtct

9

<210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 62
 Lys Ala Ser
 1

<210> 63
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 63

caacagtata atagttattc tccgacg

27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Pro Thr
 1 5

<210> 65

<211> 378

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 65

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgatacagc ctgggggggct cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcgat gattatgcca tgaactgggt ccgtcaaggt 120
 ccaggggaagg gtctggagtg ggtctctgcc ataagtgggtg atggcggtag cacatactat 180
 gcagactcgg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acagcaaaaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgcctttt tttactgtgc aaaagatctc 300
 cgtaatacga tttttggagt gggtattccc gatgcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
 atgggtcaccg tctcttca 378

<210> 66

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Leu Arg Asn Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Pro Asp Ala
 100 105 110
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 67
 ggattcacct tcgatgatta tgcc

24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 69
 ataagtggtg atggcggtag caca

24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 70
 Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 71

gcaaaagatc tccgtaatac gatttttggga gtgggttattc ccgatgcttt tgatatac 57

<210> 72
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 72
 Ala Lys Asp Leu Arg Asn Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Pro Asp Ala
 1 5 10 15
 Phe Asp Ile

<210> 73
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 73
 gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gagcattagg agctgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaaactcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatatttg caacttatta ctgccaacaa tataatagtt attcgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acga 324

<210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 74
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 75
 cagagcatta ggagctgg

18

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 76
 Gln Ser Ile Arg Ser Trp
 1 5

<210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 77
 aaggcgtct

9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 78
 Lys Ala Ser
 1

<210> 79
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 79
 caacaatata atagttattc gtacact

27

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 80
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 81
 caggtgcagc tgggtggagtc gggggggaggc ttggtcaagc ctggaggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactactaca tgagctggat ccgtcaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attggtagta gtggtgtcaa catgtactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ttcattatat 240
 ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagactct 300
 tcccaactgg gttttgacta ctgggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 82
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 82
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Val Asn Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 83

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 83
 ggattcactt tcagtgacta ctac

24

<210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 84
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 85
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 85
 attggtagta gtggtgtcaa catg

24

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 86
 Ile Gly Ser Ser Gly Val Asn Met
 1 5

<210> 87
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 87
 gcgagagact cttcccaact gggttttgac tac

33

<210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 88
 Ala Arg Asp Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 89
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 89
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc ggacaagtca gaatattatc aactttttaa attggtatca acagaaacct 120
 gggaaggccc ctaaactcct gatctatact acttccactt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctct ccatcaatag tctacaacct 240
 gaagattttg caacttactt ctgtcaacag acttacagta atccactcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 91

cagaatatta tcaacttt

18

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 92

Gln Asn Ile Ile Asn Phe

1

5

<210> 93

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 93

actacttcc

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 94

Thr Thr Ser

1

<210> 95

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 95

caacagactt acagtaatcc actcact

27

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Thr Tyr Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 97

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 97

gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aattatggca tgcactgggt ccgccagggt 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt gtttggtatg atggagataa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatatt 300
atcacatctc gcccgacttt ggactactgg ggccagggaa ccctgggtcac tgtctcctca 360

<210> 98

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 98

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

<210> 99

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 99

ggattcacct tcagtaatta tggc

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1

5

<210> 101

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 101

gtttggtatg atggagataa taaa

24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 102

Val Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Lys

1

5

<210> 103

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 103

gcgagagata ttatcacatc tcgcccgcact ttggactac

39

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 104

Ala Arg Asp Ile Ile Thr Ser Arg Pro Thr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 105

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 105

gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggccagtc gggcattaac agttatttag cctgggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gtagattttg caacttatta ctgtcaacag cttaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 106

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 106

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

<210> 107

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 107
cagggcatta acagttat

18

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 108
Gln Gly Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 109
cctgcatcc

9

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 110
Pro Ala Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 111
caacagctta atagttaccc gctcact

27

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 112

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 113

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 113

caggtgcagc tgggtggagtc ggggggaggc ttggtcaagc ctggaggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccata tccagggaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagattct 300
tcccaactgg gttttgacta ctgggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 114

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 114

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys 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 Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 115

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 115
ggattcacct tcagtgacta ctac 24

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 116
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 117
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 117
attagtagta gtggtagtag cata 24

<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 118
Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile
1 5

<210> 119
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 119
gcgagagatt cttcccaact gggttttgac tac 33

<210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 120

Ala Arg Asp Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 121

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 121

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattatc agctttttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaggccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctacaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acttacagta atccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acga 324

<210> 122

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 122

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

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 123

cagagcatta tcagcttt

18

<210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 124
 Gln Ser Ile Ile Ser Phe
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 125
 actgcatcc

9

<210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 126
 Thr Ala Ser
 1

<210> 127
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 127
 caacagactt acagtaatcc gctcact

27

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 128
 Gln Gln Thr Tyr Ser Asn Pro Leu Thr

1

5

<210> 129

<211> 342

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 129

```

caggtgcagc tggtagcagc tggacctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaggggc 60
tcttgtaagg cttctgggta ccttagtgac tttattatca cctgggtgcg acaggcccct 120
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcacttaca gtggtgacac agactctgca 180
ccgaagtcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgactac agtcttcttg 240
gaactgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt attgtgagag agggcggtg 300
tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342

```

<210> 130

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 130

```

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

```

<210> 131

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 131

ggttacctta gtgactttat t

21

<210> 132

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 132
 Gly Tyr Leu Ser Asp Phe Ile
 1 5

<210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 133
 atcagcactt acagtgggtga caca

24

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 134
 Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 135
 gcgagaggggc ggctgttttga ctac

24

<210> 136
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 136
 Ala Arg Gly Arg Leu Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 137
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 137
 gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
 tttcaacaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggtag acactggccg 300
 tacactttttg gccaggggac caagctggag atcaaacga 339

<210> 138
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 138
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 139
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 139
 caaagcctcg tatacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 140
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 140
 Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 141
 aaggtttct

9

<210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 142
 Lys Val Ser
 1

<210> 143
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 143
 atgcaaggta cacactggcc gtacact

27

<210> 144
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 144
 Met Gln Gly Thr His Trp Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 145
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 145
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagtc tcggtcaagc ctggaggggtc cctgcgactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggcg 120
 ccagggaagg gactggagtg ggtttcgtac attggtagta gtggtactaa tgactactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 cttcaaattg acagcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc gagagattct 300
 tcccaaattg gttttgacta ctgggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 146
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 146
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Ser Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Thr Asn Asp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Gln Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 147
 ggattcacct tcagtgacta ctac

24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 148

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 149

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 149

attggtagta gtggtactaa tgac

24

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 150

Ile Gly Ser Ser Gly Thr Asn Asp
1 5

<210> 151

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 151

gcgagagatt cttcccaaatt gggttttgac tac

33

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 152

Ala Arg Asp Ser Ser Gln Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 153
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 153
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaacattatc aactttttaa attggtatca gcagagacca 120
 gggaaagccc ctcagctcct gatctatggt gcagccagct tgcagagtgg ggtcccatca 180
 aggtttactg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaggatttcg caacttacta ctgtcaacag acttacacta acccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

<210> 154
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 154
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ile Asn Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Ala Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Asn Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 155
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 155
 cagaacatta tcaacttt

18

<210> 156
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 156

Gln Asn Ile Ile Asn Phe
1 5

<210> 157

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 157

gttgcagcc

9

<210> 158

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 158

Val Ala Ala

1

<210> 159

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 159

caacagactt acactaaccc gctcact

27

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 160

Gln Gln Thr Tyr Thr Asn Pro Leu Thr

1

5

<210> 161

<211> 460

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 161

Met	Phe	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Ser		
1				5					10					15			
Ser	Arg	Ile	Asp	Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	Phe	Asp	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu		
			20					25					30				
Pro	Lys	Ser	Arg	Phe	Ala	Met	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Asn		
		35					40					45					
Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Asp	Phe	Val	His	Lys	Thr		
	50					55					60						
Lys	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Gln		
65				70						75					80		
Ser	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu		
			85						90					95			
Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu		
			100					105					110				
Val	Lys	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu		
		115					120					125					
Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Gln	Gln	Lys	Val	Lys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Gln		
	130					135					140						
Leu	Thr	Asn	Leu	Ile	Gln	Asn	Gln	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	His	Pro	Glu		
145					150					155					160		
Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Phe	Val	Glu	Lys	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Lys		
				165				170						175			
Asp	Leu	Leu	Gln	Thr	Val	Glu	Asp	Gln	Tyr	Lys	Gln	Leu	Asn	Gln	Gln		
			180					185					190				
His	Ser	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Ile		
		195					200					205					
Gln	Glu	Pro	Thr	Glu	Ile	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg		
	210					215					220						
Thr	Thr	Pro	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Glu	Ile	Arg	Asn	Val	Lys	His	Asp		
225					230					235					240		
Gly	Ile	Pro	Ala	Glu	Cys	Thr	Thr	Ile	Tyr	Asn	Arg	Gly	Glu	His	Thr		
				245					250					255			
Ser	Gly	Met	Tyr	Ala	Ile	Arg	Pro	Ser	Asn	Ser	Gln	Val	Phe	His	Val		
		260						265					270				
Tyr	Cys	Asp	Val	Ile	Ser	Gly	Ser	Pro	Trp	Thr	Leu	Ile	Gln	His	Arg		
	275						280					285					
Ile	Asp	Gly	Ser	Gln	Asn	Phe	Asn	Glu	Thr	Trp	Glu	Asn	Tyr	Lys	Tyr		
	290					295					300						
Gly	Phe	Gly	Arg	Leu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Ile		
305					310					315					320		
Tyr	Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Tyr	Val	Leu	Arg	Ile	Glu	Leu	Glu		
				325					330					335			
Asp	Trp	Lys	Asp	Asn	Lys	His	Tyr	Ile	Glu	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Leu	Gly		
			340					345					350				
Asn	His	Glu	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	His	Leu	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Asn		
		355					360						365				
Val	Pro	Asn	Ala	Ile	Pro	Glu	Asn	Lys	Asp	Leu	Val	Phe	Ser	Thr	Trp		
	370					375					380						
Asp	His	Lys	Ala	Lys	Gly	His	Phe	Asn	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ser	Gly		
385					390					395					400		
Gly	Trp	Trp	Trp	His	Asp	Glu	Cys	Gly	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Gly	Lys		
				405					410					415			
Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Ala	Lys	Ser	Lys	Pro	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Leu		
			420					425					430				
Ser	Trp	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ser	Ile	Lys	Ser	Thr	Lys		

435 440 445
 Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
 450 455 460

<210> 162
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<400> 162
 atgttcacaa ttaagctcct tcttttttatt gttcctctag ttattttcctc cagaattgat 60
 caagacaatt catcatttga ttctctatct ccagagccaa aatcaagatt tgctatgtta 120
 gacgatgtaa aaatttttagc caatggcctc cttcagttgg gacatgggtct taaagacttt 180
 gtccataaga cgaagggcca aattaatgac atattttcaaa aactcaacat atttgatcag 240
 tcttttttatg atctatcgct gcaaaccagt gaaatcaaag aagaagaaaa ggaactgaga 300
 agaactacat ataaactaca agtcaaaaaat gaagaggtaa agaatatgtc acttgaactc 360
 aactcaaaaac ttgaaagcct cctagaagaa aaaatttctac ttcaacaaaa agtgaaatat 420
 ttagaagagc aactaactaa cttaattcaa aatcaacctg aaactccaga acaccagaa 480
 gtaacttcac ttaaaacttt tgtagaaaaa caagataata gcatcaaaga ctttctccag 540
 accgtggaag accaatataa acaattaaac caacagcata gtcaaataaa agaaatagaa 600
 aatcagctca gaaggactag tattcaagaa cccacagaaa tttctctatc ttccaagcca 660
 agagcaccaa gaactactcc ctttcttcag ttgaatgaaa taagaaatgt aaaacatgat 720
 ggcattcctg ctgaatgtac caccatttat aacagagggtg aacatacaag tggcatgtat 780
 gccatcagac ccagcaactc tcaagttttt catgtctact gtgatgttat atcaggtagt 840
 ccatggacat taattcaaca tcgaatagat ggatcacaaa acttcaatga aacgtgggag 900
 aactacaaat atggtttttg gaggcttgat ggagaatttt ggttgggcct agagaagata 960
 tactccatag tgaagcaatc taattatggt ttacgaattg agttggaaga ctggaaagac 1020
 aacaaacatt atattgaata ttcttttttac ttgggaaatc acgaaaccaa ctatacgcta 1080
 catctagtgt cgattactgg caatgtcccc aatgcaatcc cggaaaacaa agatttggtg 1140
 ttttctactt gggatcacaa agcaaaaagga cacttcaact gtccagaggg ttattcagga 1200
 ggctggtggt ggcattgatga gtgtggagaa aacaacctaa atggtaaata taacaaacca 1260
 agagcaaaaat ctaagccaga gaggagaaga ggattatctt ggaagtctca aaatggaagg 1320
 ttatactcta taaaatcaac caaatgttg atccatccaa cagattcaga aagctttgaa 1380
 tga 1383

<210> 163
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 163
 Met His Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu Val Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45
 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 65 70 75 80
 Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 85 90 95
 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 100 105 110
 Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 115 120 125

Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu His Pro Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
 165 170 175
 Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
 180 185 190
 His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
 195 200 205
 Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg Ala Pro Arg
 210 215 220
 Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr Glu Gln Asp
 225 230 235 240
 Asp Leu Pro Ala Asp Cys Ser Ala Val Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
 245 250 255
 Ser Gly Val Tyr Thr Ile Lys Pro Arg Asn Ser Gln Gly Phe Asn Val
 260 265 270
 Tyr Cys Asp Thr Gln Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
 275 280 285
 Lys Asp Gly Ser Gln Asp Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Glu Lys
 290 295 300
 Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320
 Tyr Ala Ile Val Gln Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Leu Gln
 325 330 335
 Asp Trp Lys Asp Ser Lys His Tyr Val Glu Tyr Ser Phe His Leu Gly
 340 345 350
 Ser His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Ile Ala Gly Asn
 355 360 365
 Ile Pro Gly Ala Leu Pro Glu His Thr Asp Leu Met Phe Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asn His Arg Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys Pro Glu Ser Tyr Ser Gly
 385 390 395 400
 Gly Trp Trp Trp Asn Asp Ile Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
 405 410 415
 Tyr Asn Lys Pro Arg Thr Lys Ser Arg Pro Glu Arg Arg Arg Gly Ile
 420 425 430
 Tyr Trp Arg Pro Gln Ser Arg Lys Leu Tyr Ala Ile Lys Ser Ser Lys
 435 440 445
 Met Met Leu Gln Pro Thr Thr
 450 455

<210> 164

<211> 406

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 164

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

Gln Leu Ser Ala Leu Glu Arg Arg Leu Ser Ala Cys Gly Ser Ala Cys
 65 70 75 80
 Gln Gly Thr Glu Gly Ser Thr Asp Leu Pro Leu Ala Pro Glu Ser Arg
 85 90 95
 Val Asp Pro Glu Val Leu His Ser Leu Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln
 100 105 110
 Asn Ser Arg Ile Gln Gln Leu Phe His Lys Val Ala Gln Gln Arg
 115 120 125
 His Leu Glu Lys Gln His Leu Arg Ile Gln His Leu Gln Ser Gln Phe
 130 135 140
 Gly Leu Leu Asp His Lys His Leu Asp His Glu Val Ala Lys Pro Ala
 145 150 155 160
 Arg Arg Lys Arg Leu Pro Glu Met Ala Gln Pro Val Asp Pro Ala His
 165 170 175
 Asn Val Ser Arg Leu His Arg Leu Pro Arg Asp Cys Gln Glu Leu Phe
 180 185 190
 Gln Val Gly Glu Arg Gln Ser Gly Leu Phe Glu Ile Gln Pro Gln Gly
 195 200 205
 Ser Pro Pro Phe Leu Val Asn Cys Lys Met Thr Ser Asp Gly Gly Trp
 210 215 220
 Thr Val Ile Gln Arg Arg His Asp Gly Ser Val Asp Phe Asn Arg Pro
 225 230 235 240
 Trp Glu Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe Trp
 245 250 255
 Leu Gly Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn Ser Arg
 260 265 270
 Leu Ala Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu Leu Leu Gln
 275 280 285
 Phe Ser Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr Ser Leu Gln Leu
 290 295 300
 Thr Ala Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr Thr Val Pro Pro Ser
 305 310 315 320
 Gly Leu Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp Gln Asp His Asp Leu Arg
 325 330 335
 Arg Asp Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu Ser Gly Gly Trp Trp Phe Gly
 340 345 350
 Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro
 355 360 365
 Gln Gln Arg Gln Lys Leu Lys Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg
 370 375 380
 Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met
 385 390 395 400
 Ala Ala Glu Ala Ala Ser
 405

<210> 165

<211> 386

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 165

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn

			20					25					30				
Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Asp	Phe	Val	His	Lys	Thr		
		35					40					45					
Lys	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Gln		
	50					55					60						
Ser	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu		
65					70					75				80			
Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu		
			85					90					95				
Val	Lys	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu		
			100					105					110				
Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Gln	Gln	Lys	Val	Lys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Gln		
		115					120					125					
Leu	Thr	Asn	Leu	Ile	Gln	Asn	Gln	Pro	Glu	Thr	Pro	Glu	His	Pro	Glu		
	130					135					140						
Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Thr	Phe	Val	Glu	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile		
145					150					155					160		
Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly		
			165					170						175			
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile		
			180					185					190				
Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp		
	195						200					205					
Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His		
	210					215				220							
Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg		
225					230					235					240		
Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys		
			245					250						255			
Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
			260					265					270				
Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr		
	275						280					285					
Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu			
	290					295				300							
Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp		
305					310					315				320			
Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val		
			325					330					335				
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu		
			340					345					350				
Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His		
		355					360					365					
Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro		
	370					375					380						
Gly	Lys																
385																	

<210> 166

<211> 235

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 166

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

<210> 167

<211> 182

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 167

Ser	Arg	Ile	Asp	Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	Phe	Asp	Ser	Val	Ser	Pro	Glu	
1				5					10					15		
Pro	Lys	Ser	Arg	Phe	Ala	Met	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Asn	
			20					25					30			
Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Asp	Phe	Val	His	Lys	Thr	
		35					40					45				
Lys	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Gln	
50					55						60					
Ser	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu	
65					70				75					80		
Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	
				85				90						95		
Val	Lys	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu	
			100					105					110			
Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Gln	Gln	Lys	Val	Lys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Gln	
		115					120					125				
Leu	Thr	Asn	Leu	Ile	Gln	Asn	Gln	Pro	Ala	Thr	Pro	Glu	His	Pro	Glu	

130		135		140
Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser				
145		150		155
Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu				
	165		170	175
His His His His His				
	180			

<210> 168
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 168
Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Val Leu Ala His Gly Leu Leu
1 5 10 15
Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg Glu His Ala Glu Arg Thr Arg Ser Gln
20 25 30
Leu

<210> 169
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 169
Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu
1 5 10 15
Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln
20 25 30
Ile

<210> 170
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 170
Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala
1 5 10 15
Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
20 25

<210> 171
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 171
 Ala Gly Ser Ser Pro Gly Gly
 1 5

<210> 172
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 172
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 173
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 173
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Lys
 1 5 10

<210> 174
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 174
 Gly Gly Gly Gly Ser Lys
 1 5

<210> 175
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 175

Met	His	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Ser		
1				5					10					15			
Ser	Arg	Val	Asp	Pro	Asp	Leu	Ser	Pro	Phe	Asp	Ser	Val	Pro	Ser	Glu		
			20					25					30				
Pro	Lys	Ser	Arg	Phe	Ala	Met	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Asn		
		35					40					45					
Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Asp	Phe	Val	His	Lys	Thr		
	50					55					60						
Lys	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Gln		
65					70					75					80		
Cys	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Asn	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu		
				85					90					95			
Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu		
			100					105					110				
Val	Lys	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu		
		115					120					125					
Glu	Glu	Lys	Met	Ala	Leu	Gln	His	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Gln		
	130					135					140						
Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Gln	Asn	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Glu	His	Pro	Glu		
145					150					155					160		
Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Val	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Arg		
				165					170					175			
Glu	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Gln	Tyr	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln	Gln		
			180					185					190				
His	Ile	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Leu	Arg	Lys	Thr	Gly	Ile		
		195					200					205					
Gln	Glu	Pro	Thr	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Ser	Lys	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg		
	210					215					220						
Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	His	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Asn	Ile	Glu	Gln	Asp		
225					230					235					240		
Asp	Leu	Pro	Ala	Asp	Cys	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Arg	Gly	Glu	His	Thr		
				245					250					255			
Ser	Gly	Val	Tyr	Thr	Ile	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Gln	Val	Phe	Asn	Val		
			260					265					270				
Tyr	Cys	Asp	Thr	Gln	Ser	Gly	Thr	Pro	Arg	Thr	Leu	Ile	Gln	His	Arg		
	275						280					285					
Lys	Asp	Gly	Ser	Gln	Asn	Phe	Asn	Gln	Thr	Trp	Glu	Asn	Tyr	Glu	Lys		
	290					295					300						
Gly	Phe	Gly	Arg	Leu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Ile		
305					310					315					320		
Tyr	Ala	Ile	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln		
				325					330					335			
Asp	Trp	Lys	Asp	Ser	Lys	His	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Ser	Phe	His	Leu	Gly		
			340					345					350				
Asn	His	Glu	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn		
		355					360					365					
Ile	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Glu	His	Arg	Asp	Leu	Met	Phe	Ser	Thr	Trp		
	370					375					380						
Asp	His	Arg	Ala	Lys	Gly	Gln	Leu	Tyr	Cys	Pro	Glu	Ser	Tyr	Ser	Gly		
385					390					395					400		
Gly	Trp	Trp	Phe	Ser	Asp	Met	Cys	Gly	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Gly	Lys		
				405					410					415			
Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Ala	Lys	Ser	Lys	Pro	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Ile		
			420					425					430				
Ser	Trp	Arg	Pro	Arg	Gly	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Lys	Ser	Ser	Lys		
		435					440					445					
Met	Met	Leu	Gln	Pro	Thr	Thr											
	450					455											

<210> 176
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 176
 Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Pro Phe Asp Ser Val Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 20 25 30
 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 35 40 45
 Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 50 55 60
 Cys Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 65 70 75 80
 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 85 90 95
 Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 100 105 110
 Glu Glu Lys Met Ala Leu Gln His Arg Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln
 115 120 125
 Leu Thr Ser Leu Val Gln Asn Pro Pro Gly Ala Arg Glu His Pro Glu
 130 135 140
 Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ile Arg
 145 150 155 160
 Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu Ser Gln Gln
 165 170 175
 His Ile Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Lys Thr Gly Ile
 180 185 190
 Gln Glu Pro Thr Glu Asn Ser Leu Tyr Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
 195 200 205
 Thr Thr Pro Pro Leu His Leu Lys Glu Ala Lys Asn Ile Glu Gln Asp
 210 215 220
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu
 225 230 235 240
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 245 250

<210> 177
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<400> 177
 Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Val Ser Pro Glu
 20 25 30
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 35 40 45
 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr

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

<210> 178

<211> 356

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 178

Gly Pro Val Gln Ser Lys Ser Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met	
1	5
Asn Val Leu Ala His Gly Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg Glu	
	20
His Ala Glu Arg Thr Arg Ser Gln Leu Ser Ala Leu Glu Arg Arg Leu	
	35
Ser Ala Cys Gly Ser Ala Cys Gln Gly Thr Glu Gly Ser Thr Asp Leu	
	50
Pro Leu Ala Pro Glu Ser Arg Val Asp Pro Glu Val Leu His Ser Leu	
65	70
Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln Asn Ser Arg Ile Gln Gln Leu Phe His	
	85
Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg His Leu Glu Lys Gln His Leu Arg Ile	
	100
Gln His Leu Gln Ser Gln Phe Gly Leu Leu Asp Glu Pro Arg Gly Pro	
	115
Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu	
	130
Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu	
145	150
Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	
	165
Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu	
	180
Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr	
	195
	200
	205

Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser
210						215					220				
Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro
225					230					235					240
Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln
				245					250					255	
Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val
			260					265					270		
Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val
			275				280					285			
Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu
	290					295					300				
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg
305					310					315					320
Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val
				325					330					335	
Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg
			340					345					350		
Thr	Pro	Gly	Lys												
			355												

<210> 179

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 179

```

gaggtgcagc ttttggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc acctatgccg tgagctgggt cgcgcaggct 120
ccagggaagg ggctggaggg ggtctcaggt attagtggta ctgggttatag aacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa ctgcgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgg 300
ggcttactat ggttcgggga attaacctac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

```

<210> 180

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 180

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	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	Thr	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Gly	Val
		35					40					45			
Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Thr	Gly	Tyr	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	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	Lys	Asp	Arg	Gly	Leu	Leu	Trp	Phe	Gly	Glu	Leu	Thr	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 181
 ggattcacct ttagcaccta tgcc

24

<210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 182
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
 1 5

<210> 183
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 183
 attagtggtta ctggttatag aaca

24

<210> 184
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 184
 Ile Ser Gly Thr Gly Tyr Arg Thr
 1 5

<210> 185
 <211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 185

gcgaaagatc ggggcttact atggttcggg gaattaacct ac

42

<210> 186

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 186

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Thr Tyr
1 5 10

<210> 187

<211> 318

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 187

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagtattaat aactgggttg cctgggtatca acagaaacca 120
gggaaggccc ctaacctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacaa tataatgatt attggacggt cggccaaggg 300
accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 188

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 188

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 85 90 105

95

<210> 189
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 189
 cagagtatta ataactgg

18

<210> 190
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 190
 Gln Ser Ile Asn Asn Trp
 1 5

<210> 191
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 191
 aaggcgtct

9

<210> 192
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 192
 Lys Ala Ser
 1

<210> 193
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 193

caacaatata atgattattg gacg

24

<210> 194

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 194

Gln Gln Tyr Asn Asp Tyr Trp Thr

1

5