



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



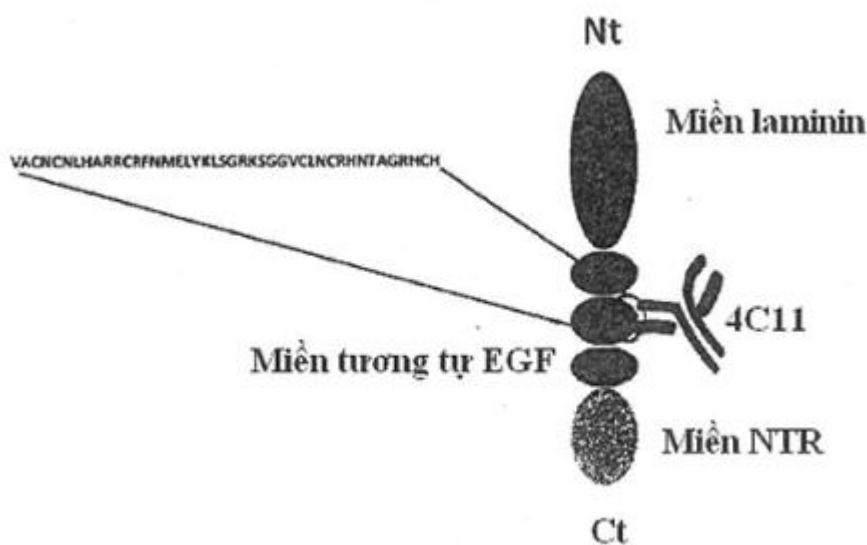
1-0031572

(51)<sup>7</sup> A61K 39/395; C07K 16/22; A61P 35/00; (13) B  
A61K 31/704

(21) 1-2016-02519 (22) 09/01/2015  
(86) PCT/EP2015/050306 09/01/2015 (87) WO2015/104360 16/07/2015  
(30) 14305034.2 10/01/2014 EP  
(45) 25/04/2022 409 (43) 25/10/2016 343A  
(73) NETRIS PHARMA (FR)  
28 rue Laennec Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France  
(72) DELCROS, Jean-Guy (FR); DEAN, Yann (FR).  
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) POLYPEPTIT PHÂN LẬP, KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GẮN KẾT NETRIN-1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit phân lập cấu thành từ trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc biến thể cấu thành từ mảnh có ít nhất 20 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc được mã hóa bởi ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, hoặc biến thể của nó do thoái hóa mã di truyền, hoặc ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4. Sáng chế đề cập đến ADN bổ sung; kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1; và dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng này.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến polypeptit phân lập cấu thành từ trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc biến thể cấu thành từ mảnh có ít nhất 20 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc được mã hóa bởi ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, hoặc biến thể của nó do thoái hóa mã di truyền, hoặc ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4. Sáng chế đề cập đến ADN bổ sung; kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1; và dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng này.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Netrin-1 là protein thuộc họ netrin và là tín hiệu vận chuyển trong sợi trục trong quá trình hút và đẩy sợi trục và đóng vai trò chính trong việc phát triển hệ thần kinh. Các thụ thể chính của netrin-1 là DCC (không có mặt trong bệnh ung thư trực tràng) và UNC5 (UNC5A, UNC5B, UNC5C, UNC5D ở người, UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, UNC5H4 ở chuột nhắt), tất cả các thụ thể này đều thuộc họ thụ thể phụ thuộc (Keino-Masu, 1996, Cell 87: 175-185 ; Ackermann, 1997, Nature 386: 838-842; Hong, 1999, Cell 97: 927-941; Mehlen, 1998, Nature 395: 801-804). Các thụ thể phụ thuộc đều có khả năng gây chết tế bào theo chương trình khi không có mặt các phối tử tương ứng của chúng, nhờ đó khả năng gây chết này bị phong bế trong quá trình gắn kết với phối tử tương ứng (Mehlen, 2004, Cell Mol Life Sci 61: 1854-1866; Bredesen, 2005, Gây chết tế bào Differ 12: 1031-1043).

Trong các bệnh ung thư khác nhau ở người, đã quan sát thấy việc giảm hoặc mất khả năng biểu hiện DCC, từ đó dẫn tới việc giảm hoặc mất khả năng gây chết tế bào theo chương trình do DCC gây ra (Kinzler, 1996, Proc Natl Acad Sci 100: 4173-4178). Hơn thế nữa, cũng đã quan sát được rằng các gen UNC5 được điều hòa giảm trong hầu hết các khối u trực tràng, chứng tỏ rằng việc mất thụ thể UNC5 phụ thuộc là tính hữu ích chọn lọc đối với các tế bào khối u (Bernet, 2007, Gastroenterology 133: 180-1848; Shin, 2007, Gastroenterology 133: 1849-1857). Tuy nhiên, quá trình điều hòa giảm thụ thể DCC và UNC5 phụ thuộc không những làm tăng cường khả năng sống sót của các tế bào khối u

khác nhau, mà còn quan sát được sự biểu hiện tự tiết của netrin-1 phôi tử của chúng. Đặc biệt là, đã nhận thấy rằng phần lớn các khối u ngực, tức là bệnh ung thư vú di căn, làm tăng mức biểu hiện của netrin-1 (Fitamant, 2008, Proc Natl Acad Sci 105: 4850-4855). Cho đến nay, đã chứng minh được rằng hai miền phụ globulin miễn dịch (Ig) của phân ngoại bào của UNC5 liên quan tới quá trình gắn kết của netrin-1, nhưng cũng chưa biết rõ rằng cả hai miền này có cần thiết để gắn kết hoàn toàn netrin-1 hay không (Geisbrecht, 2003, J. Biol. Chem. 278 : 32561-32568 ; Kruger, 2004, J. Neur. 24 : 10826-10834).

Như nêu trên, quá trình trung hoà netrin-1 bởi miền ngoại vi của DCC hoặc một phần của miền ngoại vi này (hoạt động như protein bẫy netrin-1) có thể gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào khối u biểu hiện các thụ thể phụ thuộc DCC và/hoặc UNC5 (EP-A1-1 989 546). Miền ngoại vi hoặc một phần của miền ngoại vi này có khả năng làm giảm quá trình di căn của các tế bào bệnh ung thư vú vào phổi (Fitamant và các đồng tác giả, 2008). Hơn thế nữa, miền ngoại vi này hoặc một phần của miền ngoại vi này cũng được chứng minh là làm tăng tỷ lệ phần trăm gây chết tế bào của các tế bào bệnh ung thư phổi tế bào nhỏ và tế bào u nguyên bào thần kinh biểu hiện netrin-1 ở mức cao (Delloye-Bourgeois, 2009, J Natl Cancer Inst 101 : 237-247 ; Delloye-Bourgeois, 2009, JEM 206 : 833-847). WO2012025618 bộc lộ protein dung hợp DCC có bẫy DCC cải tiến.

EP 1 989 546 (WO2007099133) bộc lộ các kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng hướng đích đặc hiệu netrin-1 hoặc thụ thể netrin-1, đặc biệt là hướng đích miền ngoại bào của thụ thể netrin-1 hoặc tới mảnh netrin-1 có khả năng tương tác với miền ngoại bào của thụ thể netrin-1 này, dùng làm thuốc. FR 2 878 165 mô tả trình tự (SEQ ID NO.164) tương ứng với các gốc 341-396 (56 axit amin) của netrin-1.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Các tác giả sáng chế hiện đã xác định được epitop mạch thẳng hoặc hầu như là tuyến tính trên netrin-1 có thể tương ứng với vùng gắn kết đặc hiệu của netrin-1 với các thụ thể, cụ thể là nhóm UNC5, nhất là UNC5B và UNC5A, hoặc theo cách khác tương ứng với vùng nằm gần vùng gắn kết đặc hiệu của netrin-1 với thụ thể mà khi gắn kết với kháng thể ngăn cản quá trình tương tác netrin-1/thụ thể. Việc xác định epitop mạch thẳng này cho phép các tác giả sáng chế tạo ra các kháng thể gắn kết netrin-1 và cản trở quá trình tương tác netrin-1/thụ thể, nhờ đó gây chết tế bào theo chương trình hoặc gây chết

tế bào khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức netrin-1 và ít nhất một thụ thể netrin-1, do trên thực tế quá trình tương tác này ức chế netrin-1 gắn kết với thụ thể và multimer hóa thụ thể này. Các tác giả sáng chế cũng đã tạo ra được kháng thể đơn dòng của chuột hướng đích epitop này và các dạng nhân tạo khác nhau của chúng.

Netrin-1 có trình tự axit amin đầy đủ như nêu trong SEQ ID NO.1 và mã hóa ADN bổ sung mã hóa có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2. Epitop mạch thẳng được đặc trưng ở miền tương tự EGF thứ hai của netrin-1 và có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 và cụ thể hơn có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35. ADN bổ sung mã hóa epitop này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, tương ứng với SEQ ID NO.36.

Mục đích thứ nhất của sáng chế là đề cập đến polypeptit phân lập cấu thành từ trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc biến thể cấu thành từ mảnh có ít nhất 20 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc được mã hóa bởi ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, hoặc biến thể của nó do thoái hóa mã di truyền, hoặc ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4. Polypeptit này có epitop mạch thẳng của netrin-1 hoặc mảnh hoặc biến thể của epitop mạch thẳng này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến:

- polypeptit phân lập hoặc tinh chế có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3,
- polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3,
- polypeptit biến thể có tối đa 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50 axit amin và bao gồm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc trình tự biến thể như mô tả nêu trên, như polypeptit biến thể cấu thành từ 22 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 từ vị trí 9 (A) đến vị trí 30 (C), kể cả các axit amin này, mà trình tự biến thể này được nêu trong SEQ ID NO.35,
- polypeptit biến thể cấu thành từ ít nhất 20, 25 hoặc 30 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 như polypeptit biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, hoặc trình tự biến thể như mô tả nêu trên,

- polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, hoặc trình tự biến thể như mô tả nêu trên,

- polypeptit phân lập hoặc tinh chế được mã hóa bởi ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.36.

Sáng chế cũng đề cập đến ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.36, hoặc biến thể của nó do thoái hóa mã di truyền, hoặc ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.36. ADN bổ sung này mã hóa polypeptit này có epitop mạch thẳng của netrin-1 hoặc mảnh hoặc biến thể của epitop mạch thẳng này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến:

- ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4,
- ADN bổ sung biến thể mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc biến thể của nó, do thoái hóa mã di truyền,
- ADN bổ sung biến thể mã hóa polypeptit biến thể như được nêu trên, đặc biệt là ADN bổ sung mã hóa polypeptit biến thể có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, như ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.36,
- ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.36.

Theo sáng chế, polypeptit biến thể có khả năng tạo ra kháng thể vẫn có khả năng giữ được gắn kết đặc hiệu với epitop mạch thẳng trên netrin-1 và ức chế quá tương tác của netrin-1 với thụ thể của nó, cụ thể là UNC5 hoặc DCC, đặc biệt là UNC5B và UNC5A, và gây chết tế bào theo chương trình hoặc gây chết tế bào khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức netrin-1 và thụ thể netrin-1. ADN bổ sung biến thể mã hóa polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35 hoặc polypeptit biến thể.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.35 hoặc biến thể của nó, để tạo ra kháng thể đơn dòng, và các kháng thể đơn dòng đã được tạo ra như vậy cũng là đối tượng của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng các phương pháp cho phép tạo ra các kháng thể đơn dòng, bằng cách sử dụng kỹ thuật dùng bạch cầu hoặc thể lai. Sáng chế

bao hàm việc sử dụng các phương pháp này để tạo ra các kháng thể hướng đích đặc hiệu polypeptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.35 hoặc biến thể của nó. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất polypeptit hoặc các kháng thể đơn dòng bằng kỹ thuật di truyền trên cơ sở trình tự axit nucleic mã hoá polypeptit hoặc kháng thể đặc hiệu, do cách xác định và bộc lộ các CDR của VH và VL. Sáng chế cũng đề cập đến mảnh kháng thể và/hoặc các kháng thể hoặc mảnh kháng thể nhân tạo có vùng biến đổi đặc hiệu với epitop mạch thẳng theo sáng chế, mảnh hoặc biến thể của nó. Thuật ngữ “polypeptit gắn kết” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể và biến thể kháng thể, mảnh và dạng kết hợp có khả năng duy trì chức năng gắn kết của kháng thể này.

Do đó, sáng chế cũng đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1, trong đó kháng thể đơn dòng này có các đặc tính sau :

(i) gắn kết đặc hiệu với polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.35 hoặc polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.35, hoặc polypeptit biến thể cấu thành từ mảnh có ít nhất 20 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 ; hoặc

(2i) chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, và vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, vùng xác định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong YAS và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 ; hoặc

(3i) chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.28, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30, và vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.31, vùng xác định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.32 và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 ;

trong đó kháng thể đơn dòng này có đặc tính gắn kết netrin-1 và gây chết tế bào hoặc gây chết tế bào khối u theo chương trình thông qua thụ thể UNC5 hoặc thụ thể DCC.

Trên thực tế, netrin-1 tự do hoặc hoạt động không tồn tại hoặc có mặt với lượng không đủ, sao cho quá trình truyền tín hiệu gây chết tế bào theo chương trình của thụ thể netrin-1 được hoạt hóa.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1 được đặc trưng bởi các vùng xác định bổ sung của nó (complementarity-determining region-CDR), trong đó kháng thể đơn dòng gắn kết này có đặc tính gắn kết netrin-1 và gây chết tế bào hoặc gây chết tế bào theo chương trình của tế bào khối u thông qua thụ thể UNC5 hoặc DCC.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết epitop của nó.

Bằng cách sử dụng hệ thống đánh số thứ tự IMGT, sáng chế đề cập đến polypeptit gắn kết netrin-1 bao gồm một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (CDR) có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 (CDR3-H), SEQ ID NO.9 (CDR3-L), và tốt hơn nếu cả hai trình tự này.

Cụ thể hơn, polypeptit có thể còn được xác định bởi sự có mặt bổ sung của CDR1, vùng xác định bổ sung CDR2 hoặc CDR1 và vùng xác định bổ sung CDR2 của VH và/hoặc VL. Do đó, polypeptit có thể chứa một hoặc nhiều vùng CDR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.5; SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.6; SEQ ID NO.9 và trình tự YAS; và/hoặc SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.8.

Sáng chế đề cập đến polypeptit chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7.

Sáng chế đề cập đến polypeptit chứa vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, vùng xác định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong YAS và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9.

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, vùng xác

định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong YAS và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9.

Bằng cách sử dụng hệ thống đánh số thứ tự Kabat, sáng chế đề cập đến polypeptit gắn kết netrin-1 bao gồm một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (CDR) có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.30 (CDR3-H), SEQ ID NO.9 (CDR3-L), và tốt hơn nếu cả hai trình tự này.

Cụ thể hơn, polypeptit này có thể còn được xác định bởi sự có mặt bổ sung của vùng xác định bổ sung CDR1, vùng xác định bổ sung CDR2 hoặc vùng xác định bổ sung CDR1 và vùng xác định bổ sung CDR2 của VH và/hoặc VL. Do đó, polypeptit này có thể chứa một hoặc nhiều vùng CDR có các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.28; SEQ ID NO.30 và SEQ ID NO.29; SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.32; và/hoặc SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.31.

Sáng chế đề cập đến polypeptit chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.28, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30.

Sáng chế đề cập đến polypeptit chứa vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.31, vùng xác định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.32 và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9.

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.28, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30, vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.31, vùng xác định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.32 và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9.

Các polypeptit này là polypeptit gắn kết netrin-1, trong đó polypeptit gắn kết này có đặc tính gắn kết netrin-1 và gây chết tế bào hoặc gây chết tế bào khối u theo chương trình thông qua thụ thể UNC5 hoặc DCC. Tốt hơn nếu các polypeptit này là kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng. Các dạng khác nhau của các polypeptit hoặc kháng thể gắn kết (bao gồm mảnh và dạng kết hợp của chúng) sẽ được mô tả dưới đây.

### Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm gắn kết ELISA của kháng thể 4C11 của chuột với Netrin-1 của người. Các nồng độ khác nhau của kháng thể 4C11 được ủ trên đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được phủ bằng Netrin-1 được đánh dấu FLAG (APOTECHE). 4C11 gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể của dê kháng IgG của chuột nhất được tiếp hợp với peroxidaza của cây củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch) và cơ chất phát quang hóa học (cơ chất thẩm tách Western PIERCE ECL). Cường độ phát quang được đọc trên phát quang kế Tecan Infinite F-500.

Fig.2 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế gắn kết của netrin-1 vào UNC5B-Fc của kháng thể 4C11. Netrin-1 được đánh dấu FLAG (APOTECHE) khi có mặt kháng thể 4C11 với các nồng độ khác nhau đã được ủ trên đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được phủ bằng UNC5B-Fc (Netris). Netrin-1 đã được gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng FLAG được tiếp hợp với peroxidaza của cây củ cải ngựa (Sigma) và cơ chất phát quang hóa học (cơ chất thẩm tách Western PIERCE ECL). Cường độ phát quang được đọc trên phát quang kế Tecan Infinite F-500.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện quá trình lập bản đồ epitop mạch thẳng của kháng thể 4C11 được thực hiện bằng cách sử dụng mảng chứa 590 peptit tuyến tính gồm 15 axit amin bao phủ toàn bộ trình tự của Netrin-1 của người với peptit-peptit chồng lặp 14 axit amin. Quá trình gắn kết 4C11 trên peptit được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng IgG của chuột nhất được đánh dấu peroxidaza (POD) và cơ chất phát quang hóa học.

Fig.4 là sơ đồ thể hiện trình tự axit amin của epitop của Netrin-1 (nằm ở miền laminin tương tự EGF thứ hai) được nhận diện bởi kháng thể 4C11 của chuột.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện mức độ cảm ứng caspaza 3 ở các tế bào biểu mô nền phôi nang của người bị bệnh ung thư biểu mô tuyến A549 khi có mặt kháng thể 4C11 của chuột.

Fig.6 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của mảnh dị ghép của người ở chuột nhắt tủy lông đã được điều trị bằng kháng thể 4C11 của chuột. Tế bào bệnh ung thư biểu mô tuyến phổi của người A549 được tiêm dưới da vào chuột không có tuyến ức (tức là thiếu hụt miễn dịch). Ngay khi khối u đạt kích thước xấp xỉ 100 mm<sup>3</sup>, chuột nhắt

(n=10 chuột/nhóm) được tiêm màng bụng bằng 5mg/kg một lần một tuần bằng kháng thể 4C11 hoặc chất đối chứng isotyp (MOPC21),.

Fig.7 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của mảnh dị ghép của người ở chuột nhắt trụi lông đã được điều trị bằng kháng thể 4C11 của chuột. Các tế bào u bạch huyết vỏ não người GRANTA-519 được tiêm dưới da vào chuột không có tuyến ức (tức là thiếu hụt miễn dịch). Ngay khi khối u đạt tới kích thước xấp xỉ 100 mm<sup>3</sup>, chuột nhắt (n=10 chuột/nhóm) được tiêm màng bụng bằng 2mg/kg một lần một tuần hoặc hai lần một tuần bằng kháng thể 4C11 hoặc bằng chất dẫn thuốc (PBS).

Fig.8 là biểu đồ thể hiện hoạt tính *in vivo* của kháng thể 4C11 nhân tạo (hum03) trong sự phát triển của bệnh ung thư biểu mô xương có thể cấy ghép được của chuột. Các khối u biểu mô xương của chuột được cấy ghép vào vị trí đối diện xương chày sau khi bóc màng xương (n=7). Các con chuột được điều trị hai lần một tuần bằng cách tiêm màng bụng 4,4mg/kg 4C11 hum03 nhân tạo hoặc chất đối chứng isotyp có hoặc không có doxorubixin (2mg/kg) hoặc bằng PBS. Hình vẽ này thể hiện mức tăng kích thước khối u ở ngày thứ 17.

Fig.9 là đồ thị thể hiện kết quả phân tích Pepscan của miền gắn kết NET1 của kháng thể đơn dòng 4C11 nhân tạo kháng netriline-1 (NET1-H-mAb) HUM03. Dữ liệu Pepscan thô thu được bằng cách sàng lọc kháng thể đơn dòng 4C11 nhân tạo đối với thư viện peptit chồng lặp gồm 590 peptit tuyến tính (trục x). Cường độ truyền tín hiệu của quá trình tương tác này được quan sát trên trục y. Pic tương ứng với trình tự axit amin sau: ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC (SEQ ID NO.35).

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Theo các phương án thứ nhất, polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12 hoặc SEQ ID NO.13. Thông thường, nó bao gồm cả hai trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11, hoặc SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13.

Theo các phương án thứ hai, polypeptit hoặc kháng thể là polypeptit hoặc kháng thể nhân tạo và bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.19 và/hoặc nhóm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20 đến SEQ ID NO.27. Thông thường, polypeptit hoặc kháng thể là polypeptit hoặc kháng thể nhân tạo và bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm trình tự như nêu trong

SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.19 và trình tự axit amin được chọn từ nhóm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20 đến SEQ ID NO.27.

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến các kháng thể nhân tạo sau đây. Trước tiên, các kháng thể đã được liệt kê trong bảng này tương ứng với việc ghép CDR của chuột với IgG1 của người. Các kháng thể khác được gọi là HUM, là các kháng thể đơn dòng có các vùng khung biến đổi của người. Bảng này cũng đưa ra sự tham khảo đối với CH và CL của IgG1 của người. Các alotyp khác có thể cũng được sử dụng.

|                                                       | VH<br>SEQ ID NO. | Chuỗi nặng<br>hằng định                                 | VL<br>SEQ ID NO. | Chuỗi nhẹ<br>hằng định               |
|-------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| Ghép CDR (CDR của chuột được ghép vào IgG1 của người) | 27               | IgG1 của người (GenBank: AEL33691.1 R97K được cải biến) | 19               | IgG1 của người (GenBank: CAC20459.1) |
| HUM01                                                 | 20               | IgG1 của người                                          | 14               | IgG1 của người                       |
| HUM02                                                 | 21               | IgG1 của người                                          | 15               | IgG1 của người                       |
| HUM03                                                 | 22               | IgG1 của người                                          | 16               | IgG1 của người                       |
| HUM04                                                 | 23               | IgG1 của người                                          | 17               | IgG1 của người                       |
| HUM05                                                 | 24               | IgG1 của người                                          | 17               | IgG1 của người                       |
| HUM06                                                 | 25               | IgG1 của người                                          | 16               | IgG1 của người                       |
| HUM07                                                 | 26               | IgG1 của người                                          | 17               | IgG1 của người                       |
| HUM08                                                 | 22               | IgG1 của người                                          | 17               | IgG1 của người                       |
| HUM09                                                 | 25               | IgG1 của người                                          | 18               | IgG1 của người                       |
| HUM10                                                 | 21               | IgG1 của người                                          | 16               | IgG1 của người                       |

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa ít nhất một polypeptit hoặc kháng thể gắn kết netrin-1 theo sáng chế và chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng. Theo một phương án, polypeptit hoặc kháng thể là polypeptit hoặc kháng thể nhân tạo.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư trong đó đối tượng cần điều trị được dùng lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm chứa ít nhất một polypeptit hoặc kháng thể gắn kết netrin-1 theo sáng chế và chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng. Theo một phương án, polypeptit hoặc kháng thể là polypeptit hoặc kháng thể nhân tạo.

Do đó, chế phẩm và phương pháp này có thể chứa dấu hiệu hoặc dạng kết hợp bất kỳ của một trong số các dấu hiệu hoặc dạng kết hợp của các dấu hiệu này như được bộc lộ đối với polypeptit hoặc kháng thể nêu trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, bệnh ung thư là bệnh trong đó các tế bào khối u biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức thụ thể netrin-1, cụ thể là nhóm UNC5, đặc biệt là UNC5B và/hoặc UNC5A, và/hoặc DCC. Thông thường, các tế bào khối u thoát ra khỏi thụ thể netrin-1 liên quan tới việc gây chết tế bào theo chương trình do khả năng gắn kết của

netrin-1 với thụ thể này, cụ thể là nhóm UNC5, đặc biệt là UNC5B và/hoặc UNC5A, và/hoặc DCC, với sự có mặt của netrin-1. Theo một khía cạnh, bệnh ung thư là bệnh trong đó các tế bào khối u hoặc tế bào đệm biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức netrin-1.

Theo một số phương án, bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư vú di căn, bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ, u nguyên bào thần kinh xâm lấn, bệnh ung thư biểu mô tuyến tụy, u melanin nguyên phát, u melanin di căn, bệnh ung thư buồng trứng, u nguyên bào xốp, bệnh ung thư bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh ung thư bạch cầu lympho bào mạn tính, u bạch huyết tế bào B xâm lấn, bệnh ung thư mô liên kết, bệnh ung thư biểu mô tuyến thận, bệnh ung thư đầu và cổ, bệnh ung thư tinh hoàn (ví dụ, bệnh ung thư biểu mô phôi thai, u quái, khối u bao noãn hoàng), bệnh ung thư thận, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tử cung.

Các phương pháp xác định xem liệu tế bào nhất định biểu hiện thụ thể netrin-1 phụ thuộc DCC và/hoặc UNC5 trên bề mặt hoặc có khả năng điều hòa giảm đáng kể mức biểu hiện gen netrin-1 đã biết trong lĩnh vực này hay không và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IHC (Hóa mô miễn dịch) của FACS (Phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang), PCR định lượng (ví dụ, bằng ADN bổ sung được môi bởi hexamer) hoặc theo cách khác kỹ thuật thẩm tách Western kèm theo kỹ thuật phát hiện protein trên cơ sở thuốc nhuộm sinh màu (như nhuộm bạc hoặc xanh coomassie) hoặc phương pháp phát hiện trên cơ sở phát huỳnh quang và phát quang đối với các protein trong các dung dịch và trên gel, vết và vi mảng, như nhuộm miễn dịch, cũng như kết tủa miễn dịch, ELISA, vi mảng, và phổ khối. Theo sáng chế, ví dụ về bệnh ung thư cần điều trị được nêu trong bản mô tả này bao gồm các dạng bệnh ung thư dai dẳng bất kỳ trong số các bệnh ung thư đã nêu. Do đó, mức biểu hiện quá mức netrin-1 có thể được xác định bằng cách RT-PCR nhờ sử dụng các đoạn môi thích hợp như được bộc lộ và đưa ra trong bản mô tả này, đối với mô khỏe mạnh hoặc bệnh ung thư tương tự mà không biểu hiện quá mức netrin-1.

Theo một phương án, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh ung thư biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức netrin-1, trong đó sự biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức này liên quan đến chính bệnh ung thư, hoặc được gây ra bởi việc điều trị được chất hóa trị liệu riêng lẻ, hoặc cả hai.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh ung thư kết hợp bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh cần điều trị sử dụng được chất hóa trị liệu và polypeptit hoặc

kháng thể theo sáng chế. Dược chất hóa trị liệu và polypeptit hoặc kháng thể có mặt với lượng hữu hiệu.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế để sử dụng làm thuốc điều trị bệnh ung thư được sử dụng kết hợp với dược chất hóa trị liệu ở đối tượng bị bệnh. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế để sử dụng làm thuốc điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bị bệnh được điều trị bằng dược chất hóa trị liệu.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa dược chất hóa trị liệu để sử dụng làm thuốc điều trị bệnh ung thư cần dùng cho đối tượng bị bệnh kết hợp với polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa dược chất hóa trị liệu để sử dụng làm thuốc điều trị bệnh ung thư ở đối tượng bị bệnh mà được điều trị bằng polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm hoặc kit bao gồm các phần chứa dược chất hóa trị liệu và polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế, để sử dụng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt cho đối tượng bị bệnh.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm hoặc kit bao gồm các phần chứa dược chất hóa trị liệu và polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế, để sử dụng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt cho đối tượng bị bệnh, để sử dụng làm thuốc điều trị bệnh ung thư hoặc điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa dược chất hóa trị liệu và polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế, trong chất mang dược dụng hoặc chất dẫn thuốc.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa dược chất hóa trị liệu và polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế, trong chất mang dược dụng hoặc chất dẫn thuốc, để sử dụng làm thuốc điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng việc sử dụng polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư được dự định để điều trị kết hợp cho đối tượng bị bệnh bằng dược chất hóa trị liệu.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng dược chất hóa trị liệu để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư được dự định để điều trị kết hợp cho đối tượng bị bệnh bằng polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế và được chất hóa trị liệu để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư kết hợp.

Sáng chế cũng mô tả sử dụng polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế và được chất hóa trị liệu để bào chế thuốc điều trị bệnh ung thư kết hợp chế phẩm hoặc kit chứa các phần, để sử dụng đồng thời, riêng rẽ hoặc lần lượt cho đối tượng bị bệnh.

Theo một khía cạnh của sáng chế và như được giải thích tiếp dưới đây, được chất hóa trị liệu là được chất gây biểu hiện quá mức netrin-1 ở các tế bào bệnh ung thư và polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế thúc đẩy quá trình gây chết tế bào theo chương trình hoặc gây chết tế bào do thụ thể netrin-1 gây ra mặc dù biểu hiện quá mức.

Cụ thể là, được chất hóa trị liệu là được chất gây biểu hiện quá mức netrin-1 ở các tế bào bệnh ung thư. Việc xác định rằng được chất gây biểu hiện quá mức netrin-1 có thể được tiến hành một cách dễ dàng trên tế bào bệnh ung thư bất kỳ, như dòng tế bào hoặc các tế bào từ việc sinh thiết. Theo một phương án, thử nghiệm được thực hiện trên các tế bào lấy từ đối tượng bị bệnh ung thư cần điều trị, ví dụ từ việc sinh thiết. Theo một phương án khác, thử nghiệm được thực hiện trên tế bào, như dòng tế bào, là tế bào đại diện cho bệnh ung thư cần điều trị. Theo một phương án khác, thử nghiệm được thực hiện trên dòng tế bào A549 hoặc H460. Thử nghiệm có thể bao gồm việc so sánh mức biểu hiện gen netrin-1 giữa các tế bào đã được điều trị bằng được chất hóa trị liệu và các tế bào không được điều trị. Mức biểu hiện có thể xác định được bằng PCR, đặc biệt là RT-PCR định lượng, ví dụ bằng cách sử dụng các đoạn mồi đã bộc lộ và đưa ra trong bản mô tả này (SEQ ID NO.33 và 34) như được mô tả trong WO2014/041088, được hết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Việc phân loại được chất trong họ gồm các chất gây biểu hiện quá mức này có thể được tiến hành một cách đơn giản theo phương pháp được mô tả trong phần Nguyên liệu và Phương pháp sau trên dòng tế bào A549 hoặc H460, như được mô tả trong WO2014/041088.

Đặc biệt, được chất hóa trị liệu là được chất gây độc tế bào. Theo một số phương án ưu tiên, được chất này là doxorubixin, 5-fluorouracil (5FU), paclitaxel (ví dụ, Taxol), hoặc cisplatin.

Theo một phương án, được chất này là kháng sinh gây độc tế bào. Kháng sinh gây độc tế bào này có thể là actinomycin, antraxycilin, bleomycin, plicamycin hoặc

mitomycin. Antraxyclin có thể là doxorubixin, daunorubicin, valrubicin, idarubicine hoặc epirubicine.

Theo một phương án, dược chất này là dược chất alkyl hóa. Dược chất alkyl hóa có thể là dẫn xuất platin, như cisplatin, carboplatin, oxaliplatin hoặc dược chất alkyl hóa khác như xyclophosphamid, ifosfamid, melphalan, thiotepa. Các nhóm khác bao gồm epipodophylotoxin, ví dụ etoposide, chất ức chế topoisomeraza (camptotecine), ví dụ irinotecan, topotecan, dược chất alkyl hóa rãnh nhỏ của ADN, ví dụ trabectedine (YONDELIS), metotrexate, pemetrexed, raltitrexed.

Theo một phương án, dược chất này là taxan hoặc dược chất hướng đích tubulin khác. Taxan có thể là paclitaxel hoặc doxetaxel, hoặc eribuline (gần đây được chấp thuận để điều trị bệnh ung thư vú).

Theo một phương án, dược chất này là dược chất điều trị bệnh ung thư như:

- dược chất điều trị bệnh ung thư vú bằng hormon: ví dụ, tamoxifene, letrozole, anastrozole, exemestane, faslodex;
- dược chất điều trị bệnh ung thư tuyến tiền liệt bằng hormon: ví dụ, các chất chủ vận LHRH, bicalutamit, abiraterone;
- kháng thể đơn dòng: ví dụ, cetuximab, panitumumab, bevacizumab;
- dược chất ức chế kinaza: ví dụ, imatinib, nilotinib, dasatinib, erlotinib, gefitinib, afatinib, sunitinib, sorafenib, pazopanib, crizotinib, axitinib.

Định nghĩa và các phương án, biến thể và thay đổi khác theo sáng chế:

Như được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự có “ít nhất 85% giống với trình tự so sánh” là trình tự có, trên toàn bộ chiều dài của nó, 85%, hoặc lớn hơn, cụ thể là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100% trình tự tương đồng với toàn bộ độ dài của trình tự so sánh.

Tỷ lệ phần trăm của “độ tương đồng trình tự” có thể được xác định bằng cách so sánh hai trình tự, được sắp hàng tối ưu trong cửa sổ so sánh, trong đó phần của trình tự polypeptit trong cửa sổ so sánh có thể chứa đoạn chèn hoặc đoạn khuyết (*tức là* các khe hở) so với trình tự so sánh (không chứa đoạn chèn hoặc đoạn khuyết) để sắp hàng tối ưu giữa hai trình tự này. Tỷ lệ phần trăm này được tính bằng cách xác định số vị trí tại đó gốc axit amin giống nhau xuất hiện ở cả hai trình tự để tạo ra số vị trí khớp với nhau, chia

số vị trí khớp với nhau này cho tổng số vị trí trong cửa sổ so sánh và nhân kết quả này với 100 để thu được tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự. Sự sắp hàng trình tự tối ưu dùng để so sánh được tiến hành bằng cách sắp hàng theo cặp chung, ví dụ sử dụng thuật toán của Needleman và Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443. Tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự có thể được xác định một cách dễ dàng, ví dụ bằng cách sử dụng chương trình Needle, với ma trận BLOSUM62, và các thông số sau khe hở (gap-open)=10, khe hở kéo dài (gap-extend)=0,5.

Theo sáng chế, “gốc thay thế axit amin bảo thủ” là gốc thay thế trong đó gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin khác có nhóm mạch bên với các đặc tính hóa học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Nhìn chung, gốc thay thế axit amin bảo thủ hầu như là thay đổi các đặc tính chức năng của protein. Ví dụ về các nhóm chứa axit amin có mạch bên với các đặc tính hóa học tương tự bao gồm 1) chuỗi mạch bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin; 2) chuỗi mạch bên béo-hydroxyl: serin và threonin; 3) chuỗi mạch bên chứa amit: asparagin và glutamin; 4) chuỗi mạch bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; 5) chuỗi mạch bên có tính bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) chuỗi mạch bên có tính axit: axit aspartic và axit glutamic; và 7) chuỗi mạch bên chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm thế axit amin bảo thủ là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin-tryptophan, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat và asparagin-glutamin.

Thuật ngữ “bao gồm” cần được giải thích là bao hàm toàn bộ các dấu hiệu được đề cập cụ thể như các dấu hiệu tùy ý, bổ sung, không cụ thể. Như được sử dụng trong bản mô tả này, việc sử dụng thuật ngữ “bao gồm” cũng bộc lộ phương án trong đó không có mặt các dấu hiệu khác so với các dấu hiệu được đề cập cụ thể (tức là “cấu thành từ”).

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể tự nhiên hoặc kháng thể thông thường trong đó hai chuỗi nặng được liên kết với với nhau bởi liên kết disulfua và mỗi chuỗi nặng này được liên kết với chuỗi nhẹ bởi liên kết disulfua. Có hai loại chuỗi nhẹ, lambda ( $\lambda$ ) và kappa ( $\kappa$ ). Có năm nhóm chuỗi nặng chính (hoặc isotyp) xác định hoạt tính chức năng của phân tử kháng thể: IgM, IgD, IgG, IgA và IgE. Mỗi chuỗi này chứa các miền trình tự riêng biệt. Chuỗi nhẹ bao gồm hai miền hoặc vùng, miền biến đổi (VL) và miền ổn định (CL). Chuỗi nặng bao gồm bốn miền - miền biến đổi (VH) và ba miền hừng định (CH1, CH2 và CH3, thường được gọi là CH). Các vùng biến

đôi của cả chuỗi nhẹ (VL) và chuỗi nặng (VH) xác định tính nhận diện gắn kết và tính đặc hiệu tới kháng nguyên. Miền vùng ổn định của chuỗi nhẹ (CL) và chuỗi nặng (CH) có các đặc tính sinh học quan trọng như liên kết chuỗi, tiết, tính lưu động qua nhau, khả năng gắn kết bổ sung kháng thể, và gắn kết với các thụ thể Fc (FcR). Mảnh Fv là một phần có đầu N của mảnh Fab của globulin miễn dịch và cấu thành từ các phần biến đổi của một chuỗi nhẹ và một chuỗi nặng. Tính đặc hiệu của các gốc kháng thể trong khi bổ sung cấu trúc giữa vị trí kết hợp kháng thể và yếu tố quyết định kháng nguyên. Vị trí kết hợp kháng thể được tạo ra từ các gốc chủ yếu là từ vùng xác định siêu biến hoặc bổ sung (CDR). Đôi khi, các gốc từ vùng không siêu biến hoặc vùng khung (FR) ảnh hưởng tới toàn bộ cấu trúc miền và từ đó ảnh hưởng tới vị trí kết hợp.

Thuật ngữ “vùng xác định bổ sung” hoặc “CDR” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các trình tự axit amin cùng xác định ái lực gắn kết và tính đặc hiệu của vùng Fv tự nhiên của vị trí gắn kết globulin miễn dịch tự nhiên. Chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của mỗi globulin miễn dịch có ba CDR, lần lượt được ký hiệu là CDR1-L, vùng xác định bổ sung CDR2-L, vùng xác định bổ sung CDR3-L và vùng xác định bổ sung CDR1-H, vùng xác định bổ sung CDR2-H, vùng xác định bổ sung CDR3-H. Do đó, vị trí gắn kết kháng thể kháng nguyên thông thường, bao gồm sáu CDR, bao gồm bộ CDR từ mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của vùng V.

Thuật ngữ “vùng khung” (FR) được dùng để chỉ trình tự axit amin nằm giữa các CDR, tức là các vị trí của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch được tương đối bảo thủ trong số các globulin miễn dịch khác nhau trong một loài duy nhất. Chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của mỗi globulin miễn dịch có bốn FR, lần lượt được ký hiệu là FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, và FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Thuật ngữ “vùng khung của người” là vùng khung hầu như là giống (khoảng 85%, hoặc lớn hơn, cụ thể là 90%, 95%, 97%, 99% hoặc 100%) với vùng khung của kháng thể của người xuất hiện trong tự nhiên.

Theo sáng chế, định nghĩa về CDR/FR trong chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của globulin miễn dịch cần được xác định trên cơ sở hệ thống đánh số thứ tự IMGT (Lefranc *et al.* (2003) *Dev Comp Immunol.* 27(1):55-77; [www.imgt.org](http://www.imgt.org)).

Thuật ngữ “kháng thể” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể thông thường và các mảnh của nó, cũng như kháng thể miền đơn và các mảnh của nó, cụ thể là

chuỗi nặng biến đổi của kháng thể miền đơn, và kháng thể thể khảm, nhân tạo, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, kháng thể hoặc globulin miễn dịch cũng bao gồm “kháng thể miền đơn” gần đây được mô tả và là các kháng thể mà vùng xác định bổ sung là một phần của polypeptit miền đơn. Ví dụ về kháng thể miền đơn bao gồm kháng thể chuỗi nặng, các kháng thể tự nhiên không có chuỗi nhẹ, kháng thể miền đơn có nguồn gốc từ kháng thể có bốn chuỗi thông thường, kháng thể miền đơn được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền. Kháng thể miền đơn có thể có nguồn gốc từ các loài bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột nhắt, người, lừa, lạc đà không bướu, dê, thỏ và bò. Kháng thể miền đơn có thể là kháng thể miền đơn xuất hiện trong tự nhiên đã biết là kháng thể chuỗi nặng không có chuỗi nhẹ. Cụ thể, các loài lừa (Camelidae), ví dụ lừa, lạc đà một bướu, lạc đà không bướu, anpaca (lạc đà không bướu Nam Mỹ) và lạc đà hoang guanaco, sản sinh kháng thể chuỗi nặng tự nhiên không có chuỗi nhẹ. Kháng thể chuỗi nặng của lừa cũng thiếu miền CH1.

Chuỗi nặng biến đổi của các kháng thể miền đơn không có chuỗi nhẹ này là đã biết trong lĩnh vực này là “VHH” hoặc “thể nano”. Tương tự với miền VH thông thường, VHH chứa bốn FR và ba CDR. Các thể nano có ưu điểm hơn so với kháng thể thông thường: chúng có kích thước nhỏ hơn khoảng mười lần so với các phân tử IgG, và kết quả là các thể nano của chức năng gấp nếp thích hợp có thể được sản sinh bằng cách biểu hiện in vitro đồng thời thu được hiệu suất cao hơn. Hơn thế nữa, các thể nano là rất ổn định, và bền với tác động của proteaza. Các đặc tính và quá trình sản xuất các thể nano được xem xét bởi Harmsen và De Haard (Harmsen và De Haard (2007) Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:13-22).

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” hoặc “mAb” trong bản mô tả này được dùng để chỉ phân tử kháng thể có một thành phần axit amin hướng đích kháng nguyên đặc hiệu, và không cần giải thích là cần sản sinh ra kháng thể bởi phương pháp cụ thể bất kỳ. Kháng thể đơn dòng có thể được sản sinh bởi một dòng của các tế bào B hoặc thể lai, nhưng cũng có thể là tái tổ hợp, tức là được sản sinh bởi kỹ thuật protein.

Thuật ngữ “mảnh” của kháng thể (thông thường) bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn, cụ thể vùng gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của kháng thể nguyên vẹn. Ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, (dsFv)<sub>2</sub>, scFv,

sc(Fv)<sub>2</sub>, kháng thể chứa mảnh globulin miễn dịch dime, kháng thể đặc hiệu kép và đa đặc hiệu được tạo ra từ mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể thông thường cũng có thể là kháng thể miền đơn, như kháng thể chuỗi nặng hoặc VHH.

Thuật ngữ “Fab” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh kháng thể có phân tử lượng khoảng 50.000 Da và hoạt tính gắn kết kháng nguyên, trong đó khoảng một nửa bên có đầu N của chuỗi H và toàn bộ chuỗi L, trong số các mảnh thu được bằng cách xử lý IgG với proteaza, papain, được gắn kết với nhau qua liên kết disulfua.

Thuật ngữ “F(ab')<sub>2</sub>” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh kháng thể có phân tử lượng khoảng 100.000 Da và hoạt tính gắn kết kháng nguyên, có kích thước lớn hơn không đáng kể so với Fab được gắn kết thông qua liên kết disulfua của vùng bản lề, trong số các mảnh thu được bằng cách xử lý IgG với proteaza, pepsin.

Polypeptit chuỗi đơn Fv (“scFv”) được liên kết cộng hóa trị dime khác loại VH::VL thường được biểu hiện từ dạng dung hợp gen bao gồm VH và VL mã hóa gen liên kết bởi liên kết mã hóa peptit. Mảnh scFv của người theo sáng chế bao gồm CDR được duy trì ở cấu dạng thích hợp, cụ thể bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Mảnh kháng thể hóa trị hai và đa hóa trị có thể tùy ý tạo ra bằng cách liên kết các scFv hóa trị một, hoặc có thể được tạo ra bằng cách ghép cặp scFv hóa trị một bởi liên kết peptit, như sc(Fv)<sub>2</sub> hoá trị hai.

Thuật ngữ “dsFv” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ dime khác loại VH::VL được ổn định bởi liên kết disulfua.

Thuật ngữ “(dsFv)<sub>2</sub>” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ hai dsFv được ghép cặp bởi liên kết peptit.

Thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” hoặc “BsAb” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể kết hợp vị trí gắn kết với kháng nguyên của hai kháng thể trong một phân tử. Do đó, BsAbs có khả năng gắn kết đồng thời hai kháng nguyên kháng nhau. Phương pháp kỹ thuật di truyền được sử dụng với tần suất tăng dần để thiết kế, cải biến và sản sinh các kháng thể hoặc dẫn xuất kháng thể với bộ đặc tính gắn kết và chức năng tác động mong muốn như mô tả, ví dụ trong EP 2 050 764 A1.

Thuật ngữ “kháng thể đa đặc hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể kết hợp vị trí gắn kết với kháng nguyên của hai hoặc nhiều kháng thể trong một phân tử.

Thuật ngữ “kháng thể chứa mảnh globulin miễn dịch dime” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ mảnh kháng thể nhỏ có hai vị trí gắn kết với kháng nguyên, mà các mảnh này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) liên kết với miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong cùng một chuỗi polypeptit (VH-VL). Bằng cách sử dụng liên kết ngắn đến mức để cho phép cặp đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, miền bắt buộc phải cặp đôi với miền bổ sung của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí gắn kết với kháng nguyên.

Theo một phương án cụ thể, mảnh gắn kết epitop được chọn từ nhóm bao gồm Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, (dsFv)<sub>2</sub>, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, kháng thể chứa mảnh globulin miễn dịch dime và VHH.

Thuật ngữ “kháng thể thể khảm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể trong đó vùng ổn định, hoặc một phần của nó, được biến đổi, thay thế, hoặc mang điện tích, sao cho vùng biến đổi được liên kết với vùng ổn định của các loài khác nhau, hoặc thuộc nhóm hoặc nhóm phụ kháng thể khác. “Kháng thể thể khảm” cũng được dùng để chỉ kháng thể trong đó vùng biến đổi, hoặc một phần của nó, được biến đổi, thay thế, hoặc mang điện tích, sao cho vùng ổn định được gắn kết với vùng biến đổi của các loài khác nhau, hoặc thuộc nhóm hoặc nhóm phụ kháng thể khác.

Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể ban đầu có nguồn gốc hoàn toàn hoặc một phần không phải từ người và cải biến để thay thế các axit amin nhất định, cụ thể trong vùng khung của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, để tránh hoặc làm giảm đến mức tối thiểu đáp ứng miễn dịch ở người. Miền ổn định của kháng thể nhân tạo là hầu hết các miền của miền CH và CL của người theo thời gian. Theo một phương án, kháng thể nhân tạo có miền ổn định có nguồn gốc của người. Thuật ngữ “kháng thể nhân tạo” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ kháng thể thể khảm chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người, ví dụ vùng xác định bổ sung CDR.

Thuật ngữ “polypeptit” hoặc “polypeptit gắn kết netrin-1” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các loại kháng thể, mảnh hoặc dạng kết hợp của nó.

Mục đích của việc nhân tạo là nhằm làm giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể mang gen lạ, như kháng thể của chuột, để đưa vào người, đồng thời duy trì được ái lực gắn kết kháng nguyên đầy đủ và tính đặc hiệu của kháng thể. Các kháng thể nhân tạo, hoặc các kháng thể phù hợp với việc không đào thải bởi các động vật có vú khác, có thể

được sản sinh bằng cách sử dụng một vài kỹ thuật như làm lại bề mặt và ghép CDR. Như được sử dụng trong bản mô tả này, kỹ thuật làm lại bề mặt sử dụng dạng kết hợp của việc tạo mẫu phân tử, phân tích thống kê và tạo đột biến để thay đổi bề mặt không chứa CDR của vùng biến đổi kháng thể để làm giống các bề mặt của kháng thể đã biết của vật chủ đích.

Các kháng thể có thể nhân tạo bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật khác bao gồm ghép CDR (EP0239400; WO91/09967; các Patent Mỹ số 5,530,101 và 5,585,089), kỹ thuật bọc hoặc làm lại bề mặt (EP0592106; EP0519596; Padlan (1991) *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.* (1994) *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 91:969-973), và xê dịch chuỗi (patent Mỹ số 5,565,332). Các kháng thể của người có thể được tạo ra bởi nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này bao gồm phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Cũng xem các Patent Mỹ số 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806, và 5,814,318; và Đơn quốc tế yêu cầu cấp patent WO98/46645, WO98/50433, WO98/24893, WO98/16654, WO96/34096, WO96/33735, và WO91/10741.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp đảo chiều, giảm nhẹ, ức chế sự tiến triển của, hoặc ngăn ngừa rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà thuật ngữ này được dùng, hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn hoặc tình trạng bệnh này.

Thuật ngữ “điều trị bệnh ung thư” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ phương pháp ức chế sinh trưởng của các tế bào ác tính của khối u và/hoặc sự tiến triển của quá trình di căn từ khối u này. Việc điều trị như vậy có thể cũng làm thoái biến sự phát triển của khối u, nghĩa là làm giảm kích thước khối u đo được. Theo một phương án cụ thể, việc điều trị này dẫn tới sự thoái biến một phần khối u hoặc di căn. Theo một phương án khác, việc điều trị này làm thoái biến hoàn toàn khối u hoặc di căn.

Thuật ngữ “đối tượng bị bệnh” hoặc “đối tượng cần điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ người hoặc động vật có vú không phải người có hoặc có thể có khối u ác tính.

Theo một phương án cụ thể, đối tượng bị bệnh cần điều trị đã được điều trị trước đó bằng dược chất điều trị bệnh ung thư khác. Cụ thể, đối tượng bị bệnh cần điều trị có

thể đã được điều trị trước đó bằng phác đồ trên cơ sở oxaliplatin, cisplatin, carboplatin, và/hoặc paclitaxel, doxorubicin.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu điều trị” của polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế có nghĩa là lượng đủ của nó để điều trị bệnh ung thư này, với tỷ lệ lợi ích/rủi ro thích hợp có thể áp dụng cho việc điều trị bằng dược chất thích hợp. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng việc sử dụng toàn bộ polypeptit hoặc kháng thể hằng ngày theo sáng chế sẽ được quyết định bởi bác sĩ điều trị nằm trong quyết định đúng đắn trong y khoa. Liều dùng hữu hiệu điều trị cụ thể đối với bệnh nhân cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm rối loạn cần điều trị và mức độ trầm trọng của rối loạn; hoạt tính của polypeptit hoặc kháng thể cụ thể được sử dụng; chế phẩm cụ thể được sử dụng, tuổi tác, thể trọng, sức khỏe tổng thể, giới tính và chế độ ăn uống của đối tượng bị bệnh; thời điểm dùng thuốc, đường đưa thuốc thuốc, và tốc độ bài tiết của polypeptit hoặc kháng thể cụ thể được sử dụng; thời gian điều trị; thuốc được sử dụng ở dạng kết hợp hoặc trùng khớp với polypeptit hoặc kháng thể cụ thể được sử dụng; và các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực y khoa. Theo một phương án cụ thể, lượng hữu hiệu trị liệu này của polypeptit hoặc kháng thể được dùng cho đối tượng bị bệnh là liều nằm trong khoảng từ 5 mg/m<sup>2</sup> đến 500 mg/m<sup>2</sup>, cụ thể hơn nằm trong khoảng từ 150 mg/m<sup>2</sup> đến 450 mg/m<sup>2</sup> diện tích bề mặt cơ thể.

Theo một phương án khác, polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế được dùng lặp lại theo quy trình tùy thuộc vào đối tượng bị bệnh cần điều trị (tuổi tác, trọng lượng, việc tiền sử điều trị, v. v...), có thể được xác định bởi bác sĩ có chuyên môn.

Thuật ngữ “dược dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ phân tử và chế phẩm không tạo ra tác dụng phụ, dị ứng hoặc phản ứng không mong muốn khác khi được dùng cho động vật có vú, đặc biệt là người, nếu thích hợp. Chất mang hoặc tá dược được dùng được dùng để chỉ chất độn, chất pha loãng, nguyên liệu tạo nang hoặc chất bổ sung loại bất kỳ không độc dạng rắn, bán rắn hoặc lỏng.

Các dạng dược phẩm chứa polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế và đường đưa thuốc thuốc phụ thuộc một cách tự nhiên vào tình trạng bệnh cần điều trị, mức độ trầm trọng của bệnh, tuổi tác, trọng lượng, và giới tính của đối tượng bị bệnh, v. v...

Polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế để sử dụng qua đường khu trú, đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, qua mũi, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp,

tiêm dưới da hoặc trong mắt và đường đưa thuốc tương tự. Theo một phương án cụ thể, polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế được sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch.

Cụ thể, dược phẩm chứa polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế có thể chứa chất dẫn thuốc được dụng đối với dược phẩm có thể tiêm được. Cụ thể, các dược phẩm này có thể là các dung dịch đẳng trương, vô trùng, nước muối (mononatri hoặc đinatri phosphat, natri, kali, canxi hoặc magie clorua và dạng tương tự hoặc hỗn hợp của các muối này), hoặc dược phẩm khô, đặc biệt là đông khô trong quá trình bổ sung, tùy thuộc vào từng trường hợp, là nước tiệt trùng hoặc nước muối sinh lý, cho phép tạo nên dung dịch tiêm.

Để bào chế dược phẩm, lượng hữu hiệu của polypeptit hoặc kháng thể theo sáng chế có thể được hòa tan hoặc phân tán trong chất mang được dụng hoặc môi trường nước.

Dạng dược phẩm thích hợp dùng để tiêm bao gồm các dung dịch nước vô trùng hoặc thể phân tán và bột vô trùng để bào chế tức thì các dung dịch hoặc thể phân tán dùng để tiêm vô trùng. Trong tất cả các trường hợp, dạng này cần phải vô trùng và là dạng lỏng đến mức dễ tiêm. Nó phải ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản và cần phải bảo quản chống lại tác động nhiễm vi sinh vật, như vi khuẩn và nấm.

Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường chứa, ví dụ nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và dạng tương tự) và hỗn hợp thích hợp của chúng. Độ lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ bằng cách sử dụng chất mang, như lexitin, bằng cách duy trì cỡ hạt cần thiết trong trường hợp thể phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt, chất làm ổn định, chất bảo vệ đông khô sâu hoặc chất chống oxy hoá. Việc ngăn ngừa tác động của vi sinh vật có thể thu được bởi các chất kháng khuẩn và chất kháng nấm. Trong một số trường hợp, tốt hơn nếu nó bao gồm chất đẳng trương, ví dụ đường hoặc natri clorua.

Các dung dịch tiêm vô trùng được bào chế bằng cách đưa hoạt chất với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một vài thành phần khác nêu trên, nếu cần, tiếp đó được lọc khử trùng. Nhìn chung, thể phân tán được bào chế bằng cách đưa các thành phần hoạt tính tiệt trùng khác nhau vào chất dẫn thuốc vô trùng chứa môi trường bazơ và các thành phần cần thiết khác như đã nêu trên. Trong trường hợp bột vô trùng để bào chế các dung dịch tiêm vô trùng, các phương pháp bào chế ưu tiên là kỹ thuật làm khô trong chân không và đông khô để tạo ra bột chứa thành phần có hoạt tính cùng với với thành phần mong muốn bổ sung từ dung dịch lọc vô trùng trước đó của nó.

Trong quá trình bào chế, các dung dịch được dùng theo cách tương hợp với chế phẩm dạng liều và với lượng này là có tác dụng điều trị bệnh. Chế phẩm được dùng một cách dễ dàng ở dạng liều khác nhau, như loại dung dịch tiêm nêu trên, nhưng viên nang giải phóng được chất và dạng tương tự cũng có thể được sử dụng.

Để sử dụng ngoài đường tiêu hóa trong dung dịch nước, ví dụ dung dịch cần được tạo đệm một cách thích hợp nếu cần và chất pha loãng lỏng trước tiên được giữ ở dạng đẳng trương với nước muối hoặc glucoza thích hợp. Các dung dịch nước cụ thể này đặc biệt là thích hợp để sử dụng theo đường tĩnh mạch, tiêm bắp, dưới da và trong màng bụng (IP). Liên quan tới vấn đề này, môi trường nước vô trùng có thể được sử dụng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này của sáng chế. Ví dụ, một liều có thể được hòa tan trong 1mL dung dịch NaCl đẳng trương và bổ sung đến 1000mL dịch truyền dưới da hoặc được tiêm dịch truyền vào vị trí gợi ý, (xem, ví dụ “Remington’s Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Một vài thay đổi về liều lượng là cần thiết tùy thuộc vào tình trạng của đối tượng cần điều trị bệnh. Trong mọi trường hợp, người có trách nhiệm trong việc dùng sẽ xác định được liều thích hợp đối với đối tượng cụ thể.

Bảng 1: Mô tả trình tự:

| SEQ ID NO. | Mô tả                                                                                                                                              | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | Trình tự (seq.) axit amin (aa) netrin-1 chứa peptit tín hiệu trong quá trình lập bản đồ epitop in đậm và tuyến tính ở trình tự in đậm và gạch chân | <b>MMRAVWEALAALAAVACLVGAVRGGPGLSMFAGQAAQPDP</b><br>CSDENGHPRRICIPDFVNAAFVKDVRVSSTCGRPPARYCVVSE<br>RGEERLRSCHLCNASDPKKAHPPAFLTDLNNPHNLTCWQSE<br>NYLQFPHNVTLTSLGKKFEVTYVSLQFCSPRPESMAIYKSM<br>DYGRTWVPFQFYSTQCRKMYNRPHPRAPITKQNEQEAVCTDS<br>HTDMRPLSGGLIAFSTLDGRPSAHDFDNSPVLQDWVTATDIR<br>VAFSRLHTFGDENEDDSELARDSYFYAVSDLQVGGRCCKCNG<br>HAARCVRDRDDSLVCDRHNTAGPECDRCKPFHYDRPWQR<br>ATAREANECVACNCNLHARRCFNMELYKLSGRKSGGVC<br><b>LNCRHNTAGRHCHYCKEGYYRDMGKPITHRKACKACDCH</b><br>PVGAAGKTCNQTTGQCCKDGVGTGTCNRCAKGYQQSRSPI<br>APCIKIPVAPPTTAASSVEEPEDCDSYCKASKGKLKINMKKY<br>CKKDYAVQIHILKADKAGDWWKFTVNIISVYKQGTSRIRRG<br>DQSLWIRSRDIACKCPKIKPLKKYLLGNAEDSPDQSGIVAD<br>KSSLVIQWRDTWARRLRKFQQREKKGKCKKA |
| 2          | Trình tự axit nucleic netrin-1                                                                                                                     | ATGATGCGCGCAGTGTGGGAGGCGCTGGCGGCGCTGGCG<br>GCGGTGGCGTGCCTGGTGGGCGCGGTGCGCGGCGGGCCC<br>GGGCTCAGCATGTTTCGCGGGCCAGGCGGCGCAGCCCGATC<br>CCTGCTCGGACGAGAACGGCCACCCGCGCCGCTGCATCCC<br>GGACTTTGTCAATGCGGCCTTCGGCAAGGACGTGCGCGTG<br>TCCAGCACCTGCGGCCGGCCCCGGCGCGCTACTGCGTGG<br>TGAGCGAGCGCGGCGAGGAGCGGCTGCGCTCGTGCCACCT<br>CTGCAACGCGTCCGACCCCAAGAAGGCGCACCCGCCCCGCC<br>TTCCTCACCGACCTCAACAACCCGCACAACCTGACGTGCT                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|   |                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |                                          | GGCAGTCCGAGAACTACCTGCAGTTCCCGCACAACGTCAC<br>GCTCACACTGTCCCTCGGCAAGAAGTTTCGAAGTGACCTAC<br>GTGAGCCTGCAGTTCTGCTCGCCGCGGCCCGAGTCCATGG<br>CCATCTACAAGTCCATGGACTACGGGCGCACGTGGGTGCC<br>CTTCCAGTTCTACTCCACGCAGTGCCGCAAGATGTACAAC<br>CGGCCGCACCGCGCGCCCATCACCAAGCAGAACGAGCAG<br>GAGGCCGTGTGCACCGACTCGCACACCGACATGCGCCCGC<br>TCTCGGGCGGCCTCATCGCCTTCAGCACGCTGGACGGGCG<br>GCCCTCGGCGCACGACTTCGACAACTCGCCCGTGCTGCAG<br>GACTGGGTACAGGCCACAGACATCCGCGTGGCCTTCAGCC<br>GCCTGCACACGTTTCGGCGACGAGAACGAGGACGACTCGG<br>AGCTGGCGCGCGACTCGTACTTCTACGCGGTGTCCGACCT<br>GCAGGTGGGCGGCCGGTGCAAGTGCAACGGCCACGCGGC<br>CCGCTGCGTGCGCGACCGCGACGACAGCCTGGTGTGCGAC<br>TGCAGGCACAACACGGCCGGCCCGGAGTGCGACCGCTGC<br>AAGCCCTTCCACTACGACCGGCCCTGGCAGCGCGCCACAG<br>CCCGCAAGCCAACGAGTGCGTGGCCTGTAAGTGCACCT<br>GCATGCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAG<br>CTTTCGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGCCTCAACTGTC<br>GCCACAACACCGCCGGCCGCACTGCCATTACTGCAAGGA<br>GGGCTACTACCGCGACATGGGCAAGCCCATCACCCACCGG<br>AAGGCCTGCAAAGCCTGTGATTGCCACCCTGTGGGTGCTG<br>CTGGCAAAACCTGCAACCAAACACCGGCCAGTGTCCCTG<br>CAAGGACGGCGTGACGGGTATCACCTGCAACCGCTGCGCC<br>AAAGGCTACCAGCAGAGCCGCTCTCCCATCGCCCCCTGCA<br>TAAAGATCCCTGTAGCGCCGCGGACGACTGCAGCCAGCAG<br>CGTGGAGGAGCCTGAAGACTGCGATTCTACTGCAAGGCC<br>TCCAAGGGGAAGCTGAAGATTAACATGAAAAAGTACTGC<br>AAGAAGGACTATGCCGTCCAGATCCACATCCTGAAGGCGG<br>ACAAGGCGGGGACTGGTGGAAGTTCACGGTGAACATCA<br>TCTCCGTGTATAAGCAGGGCACGAGCCGCATCCGCCGCGG<br>TGACCAGAGCCTGTGGATCCGCTCGCGGGACATCGCCTGC<br>AAGTGTCCCAAAATCAAGCCCCTCAAGAAGTACCTGCTGC<br>TGGGCAACGCGGAGGACTCTCCGGACCAGAGCGGCATCG<br>TGGCCGATAAAAGCAGCCTGGTGATCCAGTGGCGGGACA<br>CGTGGGCGCGGCGGCTGCGCAAGTTCAGCAGCGTGAGA<br>AGAAGGGCAAGTGCAAGAAGGCCTAGCG |
| 3 | Trình tự epitop aa của netrin-1.         | VACNCLHARRCRFNMELYKLSGRKSGGVCLNCRHNTAGR<br>HCH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4 | Trình tự ADN bổ sung epitop của netrin-1 | GTGGCCTGTAAGTGCACCTGCATGCCCGGCGCTGCCGCT<br>TCAACATGGAGCTCTACAAGCTTTCGGGGCGCAAGAGCGG<br>AGGTGTCTGCCTCAACTGTGCGCCACAACACCGCCGGCCG<br>CACTGCCAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 5 | trình tự aa của CDR1-H (IMGT)            | GYTFTSYN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 6 | trình tự aa của CDR2-H (IMGT)            | IYPGN GDT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 7 | trình tự aa của CDR3-H (IMGT)            | ARGGTGFAY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 8 | trình tự aa của CDR1-L (IMGT)            | QSVSND                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| - | trình tự aa của CDR2-L (IMGT)            | YAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 9 | trình tự aa của CDR3-L (IMGT) và         | QQDYSSPWT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

|    |                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | Kabat)                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 10 | trình tự aa của kháng thể 4C11 VH của chuột nhắt                     | QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ<br>TPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY<br>MQLSSLTSEDSAVYFCARGGTGFAYWGQGLTVTSA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 11 | trình tự aa của kháng thể 4C11 VL của chuột nhắt                     | SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPG<br>QSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLA<br>VYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 12 | Trình tự aa đầy đủ của kháng thể 4C11 (VH + IgG1 CH của chuột nhắt)  | QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQ<br>TPRQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY<br>MQLSSLTSEDSAVYFCARGGTGFAYWGQGLTVTSAAKTT<br>PPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS<br>LSSGVHTFPAVLESPLYTLSSSVTPSSRPSETVTCNVAHPA<br>SSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITL<br>TPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQF<br>NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK<br>KGRĐộ<br>PKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN<br>GQPAENYKNTQPMINTNGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTC<br>SVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK |
| 13 | Trình tự aa đầy đủ của kháng thể 4C11 (VL + Kappa CL của chuột nhắt) | SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPG<br>QSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLA<br>VYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS<br>GGASVVCFLNFPKDKINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS<br>KDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFR<br>NEC                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14 | trình tự aa VL của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCCKASQSVSNDVAWYQQKPG<br>KAPKLLIYYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAY<br>YFCQQDYSSPWTFGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 15 | trình tự aa VL của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNDVAWFQQRPGQ<br>SPRRLIYYASNRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTFITISLEAEDAATY<br>YCQQDYSSPWTFGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 16 | trình tự aa VL của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPG<br>QAPRLIYYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAY<br>YFCQQDYSSPWTFGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 17 | trình tự aa VL của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNDVAWYLQKPG<br>QSPQLIYYASNRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTFITISLEAEDAAT<br>YYCQQDYSSPWTFGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 18 | trình tự aa VL của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | DIVMTQTPSLPVTTPGEPASISCKASQSVSNDVAWYQQKPGQ<br>APRLIYYASNRYTGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYY<br>FCQQDYSSPWTFGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 19 | trình tự aa VL của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNDVAWYQQKPG<br>QAPRLIYYASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDAV<br>YYCQQDYSSPWTFGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 20 | trình tự aa VH của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFTSYNMHWVRQ<br>ATGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTA<br>YMELSSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 21 | trình tự aa VH của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYTFTSYNMHWIRQPPG<br>KGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMEL<br>SSLRSEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 22 | trình tự aa VH của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGYTFTSYNMHWVRQAT<br>GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTISKDTSKNQVVL<br>TMTNMDPVDATATYYCARGGTGFAYWGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 23 | trình tự aa VH của biến thể nhân tạo của kháng thể 4C11              | EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYFTSYNMHWVRQAT<br>GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISRDDSKNTAYL<br>QMNSLKTEDTAVYYCARGGTGFAYWGQG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

|    |                                                               |                                                                                                                                                          |
|----|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 24 | trình tự aa VH của<br>biến thể nhân tạo của<br>kháng thể 4C11 | QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYFTFSYNMHWVRQAP<br>GQGLEWMGAIY <b>PGNGD</b> TSYNQKFKGRVTISVDTSKNQFSLK<br>LSSVTAADTAVYYC <b>CARGGTGFAYWGQG</b>                  |
| 25 | trình tự aa VH của<br>biến thể nhân tạo của<br>kháng thể 4C11 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC <b>KASGYFTFSYNMHWVRQ</b><br>ATGQGLEWMGAIY <b>PGNGD</b> TSYNQKFKGRVTITADKSTSTA<br>YME <b>LSLR</b> SEDTAVYYC <b>CARGGTGFAYWGQG</b>  |
| 26 | trình tự aa VH của<br>biến thể nhân tạo của<br>kháng thể 4C11 | QVQLQQSGPGGLVKPSQTLSTCAIS <b>GYFTFSYNMHWVRQAT</b><br>GQGLEWMGAIY <b>PGNGD</b> TSYNQKFKGRVTITADKSTSTAYM<br>EL <b>SSLR</b> SEDTAVYYC <b>CARGGTGFAYWGQG</b> |
| 27 | trình tự aa VH của<br>biến thể nhân tạo của<br>kháng thể 4C11 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC <b>KASGYFTFSYNMHWVRQ</b><br>APGQGLEWMGAIY <b>PGNGD</b> TSYAQKFKGRVTMTTRDTSTSTV<br>YME <b>LSLR</b> SEDTAVYYC <b>CARGGTGFAYWQG</b>  |
| 28 | trình tự aa của<br>CDR1-H (Kabat)                             | SYNMH                                                                                                                                                    |
| 29 | trình tự aa của<br>CDR2-H (Kabat)                             | AIY <b>PGNGD</b> TSYNQKFKG                                                                                                                               |
| 30 | trình tự aa của<br>CDR3-H (Kabat)                             | GGTGFAY                                                                                                                                                  |
| 31 | trình tự aa của<br>CDR1-L (Kabat)                             | KASQSVSNDVA                                                                                                                                              |
| 32 | trình tự aa của<br>CDR2-L (Kabat)                             | YASNRYT                                                                                                                                                  |
| 33 | Đoạn mỗi xuôi                                                 | aaaagtactgcaagaaggactatgc                                                                                                                                |
| 34 | Đoạn mỗi ngược                                                | ccctgcttatacacggagatg                                                                                                                                    |
| 35 | Trình tự epitop aa của<br>netrin-1.                           | ARRCRFNMELYKL <b>SGRKSGGVC</b>                                                                                                                           |
| 36 | Trình tự ADN bổ<br>sung epitop của<br>netrin-1                | GCCCGGCGCTGCCGCTTCAACATGGAGCTCTACAAGCTTT<br>CGGGGCGCAAGAGCGGAGGTGTCTGC                                                                                   |

CDR theo IMGT được nhấn mạnh ở dạng in đậm trong bảng 1 nếu thích hợp.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng cách sử dụng các ví dụ được coi là các phương án không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Thiết kế, sàng lọc kháng thể và nhân tạo

Chuột nhắt HTP™ được tiêm 8 lần (mỗi ngày trong hai ngày; lần tiêm thứ nhất khi có mặt chất bổ sung Freund hoàn toàn, lần tiêm thứ hai có mặt chất bổ sung không hoàn toàn) là 100µg Netrin 1-Fc (Adipogen). Tiến hành dung hợp lai 2 tuần sau khi gây miễn dịch lần thứ nhất (Abpro, Lexington, MA). Dịch nổi tiếp tục được sàng lọc đối với các kháng thể kháng Netrin-1 đơn dòng đặc hiệu bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA kháng nguyên kép (Netrin 1-Fc và protein khảm Fc không liên quan). Thử nghiệm kiểu ELISA thứ cấp được sử dụng để lựa chọn các kháng thể đơn dòng có khả năng phong bế quá trình tương tác của Netrin 1 với DCC hoặc UNC5h2. Kháng thể đơn dòng của chuột

(sau đó, 4C11 của chuột hoặc NET1-M-mAb được chọn. Kháng thể này được tạo ra có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13.

Quá trình nhân tạo được thực hiện như sau: mảnh ADN sợi kép mã hoá trình tự CDR chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể 4C11 của chuột được kết hợp với bề của khung người. Sau đó, miền biến đổi có chiều dài đầy đủ được thành dòng thành vector biểu hiện của động vật có vú. Miền biến đổi chuỗi nhẹ được tách dòng trong khung với tín hiệu tiết và miền ổn định kappa của người. Miền biến đổi chuỗi nặng được tách dòng trong khung với trình tự dẫn đầu và Miền ổn định của IgG1 của người. Tính đa dạng của thư viện và tính toàn vẹn của các khung đọc LC và HC được kiểm tra bằng cách sắp trình tự. Các dòng đơn lẻ được sắp xếp ở dạng 96 giếng và ADN plasmit được chuẩn bị để chuyển nhiễm vào các tế bào CHO. Thư viện nhân tạo được chuyển nhiễm vào các tế bào CHO ở dạng 96 giếng. Dịch nổi từ các tế bào CHO đã được chuyển nhiễm sau đó được thu gom ở 48 giờ sau khi chuyển nhiễm và sàng lọc bởi thử nghiệm gắn kết Netrin-1 và thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của 10 so khớp đầu tiên được sắp trình tự, sắp hàng và phân tích. Các kháng thể nhân tạo HUM01-10 như mô tả nêu trên được tạo ra.

#### Ví dụ 2: Sản xuất kháng thể đơn dòng và tinh chế protein A

Các phương pháp sản xuất các kháng thể đơn dòng trên cơ sở trình tự axit nucleic mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Dựa trên các trình tự đã nêu, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sản xuất các kháng thể của chuột, nhân tạo và hoàn toàn nhân tạo khác nhau hướng đích epitop mạch thẳng có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.35 hoặc biến thể bất kỳ của nó, như 4C11 của chuột, và HUM1-10 nhân tạo và kháng thể HUM1'-10'.

Các tế bào của động vật có vú được ưu tiên là các tế bào chủ để sản xuất glycoprotein trị liệu, do khả năng tương hợp nhất với protein glycosylat đối với các ứng dụng trên người (*Jenkins et al., Nat Biotech. 1996; 14:975-81*). Các tế bào chủ của động vật có vú có thể được sử dụng bao gồm, các tế bào Hela, 283, H9 và Jurkat của người, các tế bào NIH3T3 và C127 của chuột nhắt, tế bào của khỉ xanh châu Phi Cos 1, Cos 7 và CV1, các tế bào QC1-3 của chim cú, tế bào L của chuột nhắt và các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc. Protein glycosylat rất hiếm gặp của vi khuẩn, và các loại

tương tự khác của các vật chủ thông thường, như nấm men, nấm sợi, các tế bào của côn trùng và thực vật tạo ra các kiểu glycosyl hoá có liên quan tới sự thanh thải nhanh ra khỏi dòng máu.

Tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (CHO) cho phép tạo ra đồng nhất các dòng tế bào có năng suất cao, ổn định về mặt di truyền. Chúng có thể được nuôi cấy với mật độ lớn trong các thiết bị phản ứng sinh học đơn giản bằng cách sử dụng môi trường không chứa huyết thanh, và cho phép phát triển các quy trình sinh học an toàn và có khả năng lặp lại. Các tế bào động vật đã dùng thông thường khác bao gồm các tế bào thận của chuột đồng non (BHK), Tế bào u tủy NSO và SP2/0 của chuột nhắt. Quy trình sản sinh từ các động vật chuyển gen cũng được thử nghiệm (*Jenkins et al., Nat Biotech. 1996; 14:975-81*).

Vectơ biểu hiện của động vật có vú thông thường chứa vùng khởi đầu (vùng khởi đầu sớm và muộn từ SV40, đoạn lặp lại kết thúc kéo dài (LTR) từ các Retrovirut, ví dụ RSV, HTLV1, HIV1 và vùng khởi đầu sớm của cytomegalovirut (mCMV, hCMV), gây ra hoạt hóa quá trình phiên mã ARN thông tin, trình tự mã hóa protein, và các tín hiệu cần để kết thúc quá trình phiên mã và polyadenyl hóa bản sao (BGH polyA, Hecpet thimidin kinaza gen của virut polyA của bệnh hecpet thông thường (TKpa), SV40 polyA muộn và 3' UTR\_Beta\_Globin\_polyA). Các yếu tố bổ sung bao gồm các đoạn tăng cường ( $E_{\mu}$ , hIE1), trình tự Kozak, peptit tín hiệu và trình tự xen giữa nằm bên cạnh bởi các vị trí cho và nhận để ghép ARN. Các vectơ biểu hiện thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm, ví dụ các vectơ như pcDNA3,1, pcDNA3,3, pOptiVEC, pRSV, pE $\mu$ MCMV, pMCMVHE-UTR-BG, pHCMVHE-UTR-BG, pMCMV-UTR-BG, pHCMV-UTR-BG, pMCMVHE-SV40, pHCMVHE-SV40, pMCMV-SV40, pHCMV-SV40, pMCMVHE-TK, pHCMVHE-TK, pMCMV-TK, pHCMV-TK, pMCMVHE-BGH, pHCMVHE-BGH, pMCMV-BGH, pHCMV-UTR-BGH).

Các tế bào CHO Easy C rộng được chuyển nhiễm đồng thời với vectơ biểu hiện MAb đối với chuỗi nhẹ và chuỗi nặng theo quá trình chuyển nhiễm ổn định và nhanh chóng thông thường. Việc tiết chuỗi H và chuỗi L được thực hiện bởi trình tự dẫn đầu IgH tương ứng của người. Vùng mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được đưa vào the vectơ biểu hiện MAb ở nhiều vị trí tách dòng. Các thể biến nạp được phân tích theo hướng chính xác và khung đọc, vectơ biểu hiện có thể được chuyển nhiễm vào dòng tế bào CHO.

Dịch lỏng nuôi cấy tế bào thu được được tạo ra từ các tế bào CHO được đưa lên cột Hi Trap rProtein A (GE Healthcare, Saint Cyr au Mont d'Or, France) được làm cân bằng bằng nước muối đệm phosphat, độ pH = 7,2. Các protein không gắn kết được cho chảy qua và loại bỏ bằng cách rửa vài lần bằng dung dịch đệm PBS. MAb được rửa giải trên cột Protein A bằng cách sử dụng bước rửa giải bằng axit xitric 0,1M ở độ pH = 3,0. Dung môi rửa giải cột được kiểm tra bởi A280. Pic của MAb được gom lại.

Ví dụ 3: Thử nghiệm gắn kết kiểu ELISA của các kháng thể 4C11 với Netrin-1 (Fig.1)

Đĩa vi chuẩn độ 96 giếng màu trắng (Costar 3912 Corning) được ủ qua đêm ở 4°C với 100ng Netrin-1 được đánh dấu His (R&D 6419-N1) trong 100µL dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS). Sau khi rửa ba lần bằng 300µL PBS-0,05% Tween-20 (PBS-T), đĩa này được phong bế bằng 100µL PBS-3% BSA và ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa ba lần bằng 300µL PBS-T, đĩa này được ủ với các lượng khác nhau (10ng đến 1200ng) của kháng thể kháng netrin-1. Sau khi rửa ba lần bằng 300µL PBS-T, 100µL kháng thể thứ cấp liên quan được tiếp hợp với peroxidaza của cây củ cải ngựa (ví dụ, kháng thể của dê kháng IgG của người (Fc) Sigma A0170 hoặc chuỗi nhẹ đặc hiệu của kháng thể của dê kháng IgG của chuột nhắt (kappa) Jackson ImmunoResearch 115-035-174) được pha loãng theo tỷ lệ 1/10000 trong PBST-3% BSA được bổ sung và đĩa này được ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa ba lần bằng 300µL PBS-T, 100µL cơ chất phát quang HRP (cơ chất thấm tách Western ECL, PIERCE) được bổ sung. Sau từ 5 đến 10 phút, cường độ phát quang được đọc trên phát quang kế Tecan Infinite F-500.

Fig.1 thể hiện sự tương tác phụ thuộc liều thông thường của kháng thể 4C11 của chuột để hấp thụ netrin-1 trong thử nghiệm kiểu ELISA.

Nồng độ của các kháng thể này cho phép 50% gắn kết ( $EC_{50}$ ) được tính toán từ đường cong gắn kết xích-ma như được thể hiện ở Fig.1. Bảng 1 thể hiện các trị số  $EC_{50}$  (tính theo µg/mL và nM) của các kháng thể 4C11 của chuột (toàn bộ kháng thể 4C11 cũng như các mảnh Fab và Fab'2) và nhân tạo khác nhau.

Bảng 1: Khả năng gắn kết của các biến thể 4C11 khác nhau với netrin-1 (Ví dụ 3) hoặc để làm suy yếu khả năng gắn kết của netrin-1 trên UNC5B (Ví dụ 5):

|                                    | Dữ liệu về khả năng gắn kết |       |                               |       |
|------------------------------------|-----------------------------|-------|-------------------------------|-------|
|                                    | Khả năng gắn kết (EC50)     |       | Ức chế gắn kết phối tử (IC50) |       |
|                                    | ng/mL                       | pM    | ng/mL                         | pM    |
| IgG1 của kháng thể 4C11 của chuột  | 57                          | 380   | 75                            | 502   |
| IgG2a của kháng thể 4C11 của chuột | 63                          | 420   | 85                            | 567   |
| Fab của kháng thể 4C11             | 650                         | 13000 | 844                           | 16880 |
| Fab'2 của kháng thể 4C11           | 35                          | 350   | 89                            | 890   |
| HUM01                              | 134                         | 894   | 54                            | 360   |
| HUM03                              | 166                         | 1107  | 65                            | 434   |
| HUM09                              | 153                         | 1021  | 71                            | 474   |
| HUM08                              | 134                         | 894   | 77                            | 514   |
| HUM06                              | 139                         | 927   | 82                            | 547   |
| HUM05                              | 151                         | 1007  | 85                            | 567   |
| HUM07                              | 125                         | 834   | 89                            | 594   |
| HUM10                              | 211                         | 1407  | 110                           | 734   |
| HUM04                              | 198                         | 1321  | 199                           | 1327  |
| HUM02                              | 260                         | 1734  | 215                           | 1434  |

HUM03 được chọn để thử nghiệm tiếp. Đôi khi, HUM03 có thể được gọi là 4C11 nhân tạo dưới đây.

Ví dụ 4: Thử nghiệm gắn kết kháng thể bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Đặc tính gắn kết của các kháng thể được phân tích bằng cách sử dụng Biacore T 100 (GE Healthcare) với Phần mềm đánh giá Biacore T100 Control Biacore TI 00 Evaluation liên quan, và Chip:CM5-Chip làm dạng thử nghiệm.

Kháng thể 4C11 của chuột (IgG1) (SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13) được bắt giữ thông qua phân tử bắt giữ được ghép cặp với amin. Netrin-1 với nồng độ tăng dần theo bậc được tiêm vào. Bề mặt chip chỉ chứa phân tử bắt giữ được ghép cặp với amin được sử dụng làm bề mặt đối chứng so sánh để hiệu chỉnh tác dụng tạo đệm hoặc khả năng gắn kết không đặc hiệu của netrin-1.

Các phân tử bắt giữ: Các kháng thể của dê kháng IgG của chuột nhắt (Jackson Immuno Research).

Phân tử bắt giữ được ghép cặp với amin. Quá trình ghép cặp amin tiêu chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất: dung dịch đệm chạy: dung dịch đệm HBS- N, hoạt hóa bằng hỗn hợp chứa EDC/NHS, nhằm mục đích tạo ra mật độ phối tử 10000 RU; kháng thể bắt giữ được pha loãng trong dung dịch đệm ghép cặp 10mM NaAc, độ pH = 4,5, c =

30 $\mu$ g/mL; Cuối cùng nhóm carboxyl được hoạt hóa còn lại được phong bế bằng cách tiêm etanolamin 1M.

Kháng thể 4C11 bắt giữ: Bắt giữ kháng thể 4C11 trên các dòng tế bào từ 2 đến 4: tốc độ dòng 5 $\mu$ L/phút, thời gian tiếp xúc 72 giây, c(kháng thể kháng IgG của chuột nhắt) = 5nM. Dung dịch đệm bắt giữ: PBS (độ pH=7,4), 0,005% Tween 20

Mẫu phân giải: Dây nồng độ thông thường được đo với tốc độ dòng bằng 50 $\mu$ L/phút bằng cách tiêm liên tục dịch phân giải trong 5 hoặc 6 nồng độ tăng dần (nồng độ = 2-164 nM). Dung dịch đệm chạy: 20mM Hepes độ pH = 7,4, 600mM NaCl, 0,005% Tween 20. Dịch phân giải được tiêm trong 3 phút, tiếp đó là pha phân ly trong 90 giây.

Phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bán định lượng của động học gắn kết netrin-1 với kháng thể 4C11 đã được bắt giữ được thực hiện bằng cách sử dụng phân tích BIAcore về khả năng gắn kết kháng thể 4C11 của chuột như đã nêu và mô tả theo sáng chế với Netrin-1 của người. Kháng thể 4C11 được bắt giữ trên bề mặt chip thông qua các phân tử IgG(Fc) kháng người được ghép cặp với amin. Nồng độ tăng dần theo bậc của Netrin-1 của người được tiêm vào và khả năng gắn kết động học được kiểm tra bởi mức thay đổi SPR. Mức thay đổi là đơn vị tương đối (RU) so với chip đối chứng được ghi lại trên trục y theo thời gian (trục x). Đường cong gắn kết và phân ly đại diện của kháng thể 4C11 phân giải đã được bắt giữ ở các nồng độ khác nhau của Netrin-1 của người đã tiêm quan sát được.

Sau đó, các thông số động học được tính toán bằng cách sử dụng sự so sánh kép thông thường (so sánh đối chứng: gắn kết chất phân giải với phân tử bắt giữ; Dòng tế bào: nồng độ netrin-1 bằng "0" làm mẫu trống) và tính toán theo mô hình động học chuẩn độ 1: 1 khả năng gắn kết.

Bảng 2 thể hiện dữ liệu ái lực đo được bằng SPR (BIACORE® T100) ở nhiệt độ 25°C trong PBS:

|         | <b>Ka</b><br><b>(M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b> | <b>Kd</b><br><b>(s<sup>-1</sup>)</b> | <b>KD</b><br><b>(nM)</b> |
|---------|----------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| Ví dụ 1 | 1,4 x 10 <sup>5</sup>                              | 1,8 x 10 <sup>5</sup>                | 13,3                     |
| Ví dụ 2 | 1,4 x 10 <sup>5</sup>                              | 1,8 x 10 <sup>5</sup>                | 12,7                     |

Ví dụ 5: 4C11 ức chế khả năng gắn kết của Netrin-1 với UNC5B (Fig.2)

Đĩa vi chuẩn độ 96 giếng màu trắng (Costar 3912 Corning) được ủ qua đêm ở 4°C với 100ng UNC5B-Fc (R&D 1006-UN-050) hoặc DCC-Fc (R&D 844-DC-050) trong

100 $\mu$ L dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS). Sau khi rửa ba lần bằng 300 $\mu$ L PBS-0,05% Tween-20 (PBS-T), đĩa này được phong bế bằng 100 $\mu$ L PBS-2% BSA và ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa ba lần bằng 300 $\mu$ L PBS-T, đĩa này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, với 100 $\mu$ L PBS-1% BSA chứa 50ng/mL Netrin-1 được đánh dấu FLAG (Adipogen) và các lượng khác nhau (từ 0,2ng đến 3000ng) của kháng thể 4C11. Sau khi rửa ba lần bằng 300 $\mu$ L PBS-T, 100 $\mu$ L kháng thể đơn dòng kháng FLAG M2 được tiếp hợp với peroxidaza của cây củ cải ngựa (HRP) (Sigma A8592) được pha loãng theo tỷ lệ 1/5.000 trong PBST-1% BSA được bổ sung và đĩa này được ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa ba lần bằng 300 $\mu$ L PBS-T, 100 $\mu$ L cơ chất phát quang HRP (cơ chất thẩm tách Western ECL, PIERCE) được bổ sung. Sau từ 5 đến 10 phút, cường độ phát quang được đọc trên phát quang kế Tecan Infinite F-500.

Fig.2 thể hiện khả năng ức chế độc lập với liều thông thường của netrin-1 gắn kết với UNC5B bởi lượng tăng dần của kháng thể 4C11 của chuột của chuột trong thử nghiệm kiểu ELISA.

Nồng độ của các kháng thể cho phép ức chế 50% ( $IC_{50}$ ) được tính toán từ đường cong gắn kết xích-ma như được thể hiện ở Fig.5. Bảng 1 thể hiện các trị số  $IC_{50}$  (tính theo  $\mu$ g/mL và in nM) của các kháng thể 4C11 của chuột (toàn bộ kháng thể 4C11 cũng như Mảnh Fab và Fab'2) và nhân tạo khác nhau.

Ví dụ 6: Lập bản đồ epitop của netrin-1 của kháng thể 4C11 của chuột (Fig.3 và Fig.4)

Việc lập bản đồ epitop được thực hiện bằng cách sử dụng mảng chứa 590 peptit tuyến tính gồm 15 axit amin bao phủ toàn bộ trình tự của Netrin-1 của người (không có peptit tín hiệu) với mức chồng lặp peptit-peptit chứa 14 axit amin. Peptit tuyến tính được tổng hợp bằng cách sử dụng kỹ thuật hóa học Fmoc tiêu chuẩn và khử bảo vệ bằng cách sử dụng axit trifluoric. Các thẻ polypropylen dạng thẻ tín dụng có 455 giếng chứa các peptit liên kết cộng hóa trị được ủ 30 phút ở nhiệt độ 25°C trong PBST (PBS-1% Tween 80) chứa 5% SQ (SQ, Super-Q, 4% huyết thanh ngựa (thể tích/thể tích), 5% lòng trắng trứng (khối lượng/thể tích) trong PBST. Sau khi rửa, các peptit này được ủ với kháng thể 4C11 (1 $\mu$ g/mL) PBST-0,1% SQ. Sau khi rửa, các peptit này được ủ với dịch pha loãng theo tỷ lệ 1/1000 chứa thẻ tiếp hợp kháng thể peroxidaza kháng chuột nhất (SouthernBiotech) trong một giờ ở nhiệt độ 25°C. Sau khi rửa, cơ chất peroxidaza 2,2'-

azino-di-3-ethylbenzthiazolin sulfonat (ABTS) và 2µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% được bổ sung. Sau một giờ, sự phát triển màu được xác định bằng thiết bị ghép cặp điện tích (CCD) - máy quay phim và hệ thống xử lý ảnh.

Fig.3 thể hiện 4C11 của chuột tương tác đặc hiệu với peptit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3: VACNCNLHARRCRFNMELYKLSGRKSGGVCLNCRHN-TAGRHCH.

Fig.4 là hình ảnh thể hiện vị trí của epitop được nhận diện bởi kháng thể 4C11 của chuột. Epitop này được mang bởi miền tương tự EGF thứ hai của netrin-1.

Việc lập bản đồ epitop Pepscan có sử dụng mảng vết chứa 590 peptit tuyến tính gồm 15 axit amin bao phủ toàn bộ trình tự của NET1 người. Như được thể hiện trong Fig.9, kháng thể HUM03 gắn kết 8 peptit chồng lặp tương ứng với trình tự axit amin “ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC” (SEQ ID NO.35) có mặt trong miền V-2 của NET1. Do đó, epitop gắn kết của kháng thể chồng lặp với miền NET1 liên quan tới quá trình tương tác với UNC5B. Để khẳng định rằng miền V-2 của NET1 có vai trò trong việc tương tác với HUM03, các tác giả sáng chế tạo ra tổ hợp các thể đột biến và đã tiến hành thử nghiệm gắn kết in vitro của các thể đột biến này với kháng thể cũng như với UNC5B. Đột biến điểm K358L đủ để làm giảm mức độ tương tác với HUM03. Đột biến ba điểm R348A-R349A-R351A làm giảm mức độ tương tác.

Ví dụ 7: Caspaza-3 gây ra bởi 4C11 ở tế bào bệnh ung thư biểu mô tuyến phổi A549 của người (Fig.5)

Vào ngày 1, các tế bào được cho vào môi trường không chứa huyết thanh (1,8 x 10<sup>5</sup> tế bào/giếng trong đĩa 6 giếng với thể tích 1mL/giếng). Vào ngày 2, môi trường này được thay bằng 1mL môi trường mới không chứa huyết thanh chứa chất dẫn thuốc (Ctrl), kháng thể 4C11 của chuột nhất, hoặc IgG1 của chuột, kháng thể không liên quan k (Ab) (10µg/mL). Việc điều trị được tiến hành lặp lại hai lần. Vào ngày 3, các tế bào từ 2 giếng đã được xử lý giống nhau được thu gom và kết hợp vào một bể. Sau khi ly tâm, các hạt tế bào được tạo hỗn dịch lại trong 55µL dung dịch đệm rửa giải được cung cấp trong kit thử nghiệm xác định hàm lượng flo Caspaza 3/ CPP32 Fluorimetric (Gentaur Biovision, Brussels, Belgium). Sau đó, quá trình gây chết tế bào theo chương trình được kiểm tra bằng cách đo hoạt tính caspaza-3 bằng cách sử dụng kit nêu trên. Toàn bộ các trị số được chuẩn hóa theo mẫu đối chứng.

Fig.5 thể hiện kháng thể 4C11 của chuột tạo ra hoạt tính caspaza 3 ở tế bào bệnh ung thư biểu mô tuyến phổi A549 của người.

Ví dụ 8: Hoạt tính ức chế sinh trưởng của khối u gây ra bởi 4C11 in vivo của A549 (Tế bào bệnh ung thư biểu mô tuyến phổi của người) (Fig.6) và tế bào dị ghép GRANTA (tế bào u bạch huyết vỏ não người) (Fig.7).

Chuột nhắt cái không có tuyến giáp bảy tuần tuổi (20-22g thể trọng) thu được từ khu vực nuôi giữ động vật Charles River. Các con chuột này được nhốt trong lồng có máy lọc khử trùng đặt phía trên và giữ trong khu vực không có mầm bệnh. Toàn bộ các khối u được cấy bằng cách tiêm dưới da các tế bào khối u ( $10^7$  tế bào A549 hoặc  $10^6$  tế bào GRANTA) trong 200 $\mu$ L PBS vào sườn phải chuột nhắt. Bắt đầu điều trị bằng kháng thể 4C11 khi hình thành khối u ( $V \approx 100\text{mm}^3$ , xấp xỉ 15-20 ngày sau khi tiêm). Chuột nhắt được tiêm màng bụng kháng thể 4C11 (liều và liệu trình khác nhau), chất dẫn thuốc (PBS), hoặc chất đối chứng isotyp (MOPC21) (n=10 chuột). Kích thước khối u được đo bằng thước kẹp. Thể tích khối u được tính toán theo công thức  $v = 0,5 * (\text{chiều dài} * \text{chiều rộng}^2)$ .

Chuột nhắt có mảnh dị ghép A459 được điều trị bằng 5mg/kg 4C11 một lần một tuần, trong khi đó chuột nhắt có mảnh dị ghép GRANTA được nhận liều 4C11 thấp hơn (2mg/kg) một lần hoặc hai lần một tuần.

Các Fig.6 và 7 chỉ ra rằng có sự kìm hãm một cách đáng kể quá trình phát triển của khối u của tế bào bệnh ung thư biểu mô tuyến phổi A549 của người (A) và tế bào u bạch huyết vỏ não GRANTA người (B) đã được dị ghép ở chuột thiếu hụt miễn dịch.

Kháng thể 4C11 có khả năng ức chế sinh trưởng của khối u chứa A549 và GRANTA.

Ví dụ 9: Tác dụng hiệp đồng giữa 4C11 nhân tạo (hum03) và doxorubicine ở bệnh ung thư biểu mô xương chuột (Fig.8).

Bệnh ung thư biểu mô xương chuột gây ra do phóng xạ được biến nạp vào mô hình cấy ghép đã được ghép vào vị trí đối diện xương chày sau khi bóc màng xương (tài liệu tham khảo: Allouche M.et al. , 1980, *Int. J. Cancer* 26, 777-782). Nếu không biểu hiện netrin-1 trong khối u này, thì các tác giả sáng chế đã kích thích netrin-1 và mức biểu hiện thụ thể của nó bằng cách sử dụng chất hóa trị liệu (Dox, Dorubicin) như được công

bổ mới đây (*cf Paradisi et al. 2013 EMBO Mol Med (2013) 5, 1821-1834*). Chuột cống đã ghép bệnh ung thư biểu mô xương được nhận 4C11 nhân tạo hum03 (4,4mg/kg) hoặc chất dẫn thuốc (đối chứng) hai lần một tuần, bằng cách tiêm màng bụng. Một số chuột còn được nhận doxorubixin (2mg/kg) bằng cách tiêm màng bụng. Kích thước khối u được đo bằng thước kẹp. Thể tích khối u được tính toán theo công thức  $v = 0,5 * (\text{chiều dài} * \text{chiều rộng}^2)$ . Đồng thời, MRI được sử dụng cho mô hình phát triển.

Fig.8 thể hiện khả năng ức chế sinh trưởng của bệnh ung thư biểu mô xương ở các chuột được điều trị đồng thời bằng kháng thể 4C11 và doxorubixin.

Ví dụ 10: Hiệu quả của kháng thể 4C11 của chuột ở mô hình viêm ở bệnh ung thư ruột kết tự phát gây ra bởi quá trình viêm. (mô hình chuột nhất IBD (Bệnh viêm ruột) liên quan tới bệnh ung thư trực tràng) (*cf Ref Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Oct 6;106(40):17146-51*).

Chuột nhắt được điều trị bằng AOM + DSS và điều trị bằng PBS hoặc 4C11 trong màng bụng 2mg/kg hai lần một tuần (n=7) như mô tả trước đó (Ref : Neufert C et al (2007) Nat Protoc 2: 1998-2004). Tóm lại, chuột nhắt cái kiểu hoang Balb/C 8 tuần tuổi không bị bệnh được tiêm màng bụng 10 mg/kg thể trọng AOM hòa tan trong PBS. Vào ngày hôm sau, 2,5% DSS được đưa vào trong nước uống trong một tuần, tiếp đó là 2 tuần với nước bình thường. Chuột nhắt được điều trị bằng DSS trong 1 tuần, cứ 2 tuần cho đến khi kết thúc mười tuần thử nghiệm và tiêm ba lần một tuần bằng kháng thể 4C11 hoặc PBS. Các chuột được đem giết vào ngày đầu tiên của tuần thứ mười và ruột kết được loại bỏ để phân tích mô. Bảng 3 rõ ràng chỉ ra rằng việc điều trị cho chuột nhắt bằng kháng thể 4C11 có tác dụng ngăn ngừa hoặc làm chậm sự phát triển của bệnh ung thư biểu mô ruột kết do bệnh viêm gây ra.

Bảng 3: Tác dụng của mAb 4C11 kháng Netrin trên khối u ruột kết do bệnh viêm gây ra in vivo. Mô hình chuột nhắt IBD (bệnh viêm ruột) liên quan tới bệnh ung thư trực tràng được tạo ra như đã được mô tả (*Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Oct 6;106(40):17146-51*). Trước tiên, chuột nhắt được điều trị bằng azoxymetan (AOM) và Dextran sulfat natri (DSS) để gây ra bệnh ung thư trực tràng. Chuột nhắt được điều trị bằng PBS hoặc 4C11 trong màng bụng 2mg/kg hai lần một tuần (n=7). Chuột nhắt được đem giết. Ruột kết được lấy ra, được cố định trong formaldehyt để phân tích mô. Bảng 3

thể hiện tỷ lệ phần trăm chuột nhất có các tổn thương gây ra bởi tiền bệnh ung thư hoặc bệnh ung thư ruột kết khác nhau.

| Tổn thương ở ruột kết | Được chất điều trị |       |
|-----------------------|--------------------|-------|
|                       | PBS                | 4C11  |
| Chứng tăng sản cục bộ | 0%                 | 86%   |
| U tuyến mức thấp      | 50%                | 0%    |
| U tuyến mức cao       | 16,7%              | 0%    |
| ADK sớm               | 33,3%              | 42,8% |
| ADK                   | 66,7%              | 14,3% |

Ví dụ 11: Định lượng protein netrin-1 trên các tế bào bệnh ung thư người:

Để phân tích thâm miễn dịch, các tế bào được phân giải bằng cách siêu âm trong dung dịch đệm RIPA cải biến (50mM Tris-HCl, độ pH=7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% natri deoxycholat, 0,1% SDS, 1mM EDTA, cốc-tai ức chế proteaza và 5mM DTT) và ủ 1 giờ ở 4°C. Mảnh tế bào được tạo viên bằng cách ly tâm (10,000g 15' ở 4°C) và phân chiết protein (200 µg/dòng) được nạp lên 10% gel SDS-polyacrylamit và thâm lên các tấm PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, U.S.A.). Các dịch lọc được phong bế bằng 10% sữa khô không béo và 5% BSA trong PBS/0,1% Tween 20 (PBS-T) qua đêm và sau đó được ủ trong 2 giờ bằng các kháng thể đa dòng của  $\alpha$ -netrin-1 thỏ (tỷ lệ pha loãng 1:500, dòng H104, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) và kháng thể đơn dòng của  $\beta$ -actin chuột nhất (Santa Cruz Biotechnologies). Sau ba lần rửa bằng PBS-T, các màng lọc được ủ bằng kháng thể sơ cấp được tạo tiếp hợp bởi HRP thích hợp (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) trong 1 giờ. Quy trình phát hiện được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống West Dura Chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.).

Để nghiên cứu phát huỳnh quang miễn dịch, các tế bào được tách ra, được ly tâm trên giấy phủ bằng cytospiner (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific) và cố định trong 30 phút bằng 4% (thể tích/thể tích) paraformaldehyt. Sau đó, các tế bào được thâm trong 30 phút trong 0,2% Triton X-100/PBS và phong bế trong PBS chứa 2% BSA và 2% huyết thanh lừa khỏe mạnh. Netrin-1 nội sinh được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng của dòng  $\alpha$ -netrin-1 của chuột (Hệ thống R&D) và kháng thể của lừa kháng IgG của chuột Alexa-488 (Đoạn môi phân tử). Nhân được nhuộm ngược bằng cách sử dụng chất nhuộm Hoescht (Sigma).

Ví dụ 12: Ví dụ về netrin-1 biểu hiện quá mức bệnh ung thư và biểu hiện DCC và/hoặc UNC5A và/hoặc B và/hoặc C và/hoặc D cần dự tuyển để điều trị bằng UNC5-TRAP hoặc kháng thể 4C11 nhân tạo.

Tỷ lệ phần trăm của các trường hợp biểu hiện quá mức netrin-1 được đưa ra đối với mỗi loại bệnh ung thư để biểu hiện netrin-1 và các thụ thể của nó được xác định.

- 60% bệnh ung thư vú di căn (Fitamant et al., PNAS 2008),
- 47% bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (Delloye-Bourgeois et al., JNCI 2009),
- 38% u nguyên bào thần kinh xâm lấn (Delloye-Bourgeois et al., J. Exp. Med. 2009),
- 61% bệnh ung thư biểu mô tuyến tụy (Link et al., Annals of Chir. Onco. 2007; Dumartin et al., Gastro 2010),
- 100% f u melanin nguyên phát (n=7), u melanin di căn (n=6) (Kaufmann et al., Cellular Oncology 2009),
- 76% bệnh ung thư buồng trứng (Panastasiou et al., Oncotarget 2011),
- 65% u nguyên bào xốp,
- 60% bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính và bệnh bạch cầu lympho mạn tính
- 50% u bạch huyết tế bào B xâm lấn,
- 30% bệnh ung thư mô liên kết,
- 40% bệnh ung thư biểu mô tuyến thận,
- 22% bệnh ung thư đầu và cổ,
- Bệnh ung thư tinh hoàn (36% bệnh ung thư biểu mô phôi thai, 50% u quái, 100% khối u bao noãn hoàng)
- 50% bệnh ung thư thận,
- 26% bệnh ung thư dạ dày,
- 19% bệnh ung thư tử cung.

Ví dụ 13. RT-PCR định lượng cho phép đánh giá mức biểu hiện netrin-1 hoặc biểu hiện quá mức theo WO2014/041088:

ARN toàn phần được chiết bằng cách sử dụng kit NucleoSpin® RNA II (Macherey Nagel, Düren, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phản ứng RT-PCR được tiến hành bằng kit tổng hợp iScript® ADN bổ sung (Biorad). Một  g ARN toàn phần được sao chép ngược bằng cách sử dụng chương trình sau: 25 C trong 5 phút, 42 C trong 30 phút và 85 C trong 5 phút. Đối với các nghiên cứu biểu hiện, các bản sao đích được khuếch đại trong thiết bị LightCycler® 2.0 (Roche Applied Science), sử dụng kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science). Sự biểu hiện các gen đích được chuẩn hóa thành các gen glyceraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza (GAPDH) và phosphoglyxerat kinaza (PGK), được dùng làm gen giữ nhà. Số lượng các bản sao đích, được chuẩn hóa thành gen giữ nhà này, được tính toán bằng cách sử dụng phương pháp C<sub>T</sub> so sánh. Thử nghiệm phê chuẩn được thực hiện, để chứng tỏ rằng tác dụng của gen đích và gen giữ nhà là tương đương nhau. Trình tự đoạn môi là như sau:

Đoạn môi xuôi: aaaagtactgcaagaaggactatgc SEQ ID NO.33.  
Đoạn môi ngược: ccctgcttatacacggagatg SEQ ID NO.34.

Ví dụ 14. Định lượng protein netrin-1 trong các tế bào bệnh ung thư người theo WO2014/041088:

Để phân tích thâm miễn dịch, các tế bào được phân giải bằng cách siêu âm trong dung dịch đệm RIPA cải biến (50mM Tris-HCl, độ pH=7,5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% natri deoxycholat, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, cốc-tai ức chế proteaza và 5mM DTT) và ủ 1h ở 4 C. Mảnh tế bào được tạo viên bằng cách ly tâm (10,000g 15' ở 4 C) và phân chiết protein (200  g/dòng) được nạp lên 10% gel SDS-polyacrylamit và thâm lên các tấm PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, U.S.A.). Dịch lọc được phong bế bằng 10% sữa khô không béo và 5% BSA trong PBS/0,1% Tween 20 (PBS-T) qua đêm và sau đó được ủ trong 2 giờ bằng kháng thể đa dòng của  -netrin-1 thô (tỷ lệ pha loãng 1:500, dòng H104, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) và kháng thể đơn dòng của  -actin chuột nhắt (Santa Cruz Biotechnologies). Sau ba lần rửa bằng PBS-T, các dịch lọc được ủ bằng kháng thể sơ cấp được tạo tiếp hợp bởi HRP thích hợp (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) trong 1 giờ. Quá trình phát hiện được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống West Dura Chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.).

Để nghiên cứu phát huỳnh quang miễn dịch, các tế bào được tách ra, được ly tâm trên giấy phủ bằng cytospiner (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific) và cố định trong 30 phút bằng 4% (thể tích/thể tích) paraformaldehyt. Sau đó, các tế bào được thấm trong 30 phút trong 0,2% Triton X-100/PBS và phong bế trong PBS chứa 2% BSA và 2% huyết thanh lừa khỏe mạnh. Netrin-1 nội sinh được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng của dòng  $\alpha$ -netrin-1 của chuột (Hệ thống R&D) và kháng thể của lừa kháng IgG của chuột Alexa-488 (Đoạn mỗi phân tử). Nhân được nhuộm ngược bằng cách sử dụng chất nhuộm Hoescht (Sigma).

#### Ví dụ 15: Mô hình dị ghép *in vivo*

Dòng tế bào khác nhau của người (dòng tế bào bệnh ung thư biểu mô tuyến phổi H358 và A549, và dòng tế bào u bạch huyết vỏ não GRANTA-519 và tế bào B khuếch tán của u bạch huyết oci-ly3) được phát triển theo hàm số mũ thu được từ môi trường nuôi cấy, rửa hai lần bằng PBS vô trùng, được đếm và  $5,10^6$  tế bào được tạo hỗn dịch lại trong PBS trước khi cấy dưới da vào sườn phải của chuột nhắt cái Swiss/cạo lông 5 tuần tuổi. Thể tích khối u (V) được xác định theo công thức  $V = 0,5 (\text{chiều dài} \times \text{chiều rộng}^2)$  bằng thước kẹp. Khối u có kích thước  $100 \pm 20 \text{ mm}^3$  được tạo ra trước khi chọn ngẫu nhiên vào các nhóm (mỗi nhóm 10 chuột). Kháng thể kháng netrin 1 hoặc chất đối chứng isotyp được tiêm tĩnh mạch (H358, A549, oci-ly3) hoặc tiêm màng bụng (GRANTA-519) vào chuột nhắt với liều 10mg/kg hai lần một tuần. Tỷ lệ phần trăm về khả năng ức chế sinh trưởng của khối u (%TGI) được xác định đối với mỗi dòng tế bào được ghép ở ngày (d) được đưa ra trong bảng dưới đây và tính toán bằng công thức  $\text{TGI} (\%) = (1 - T/C) \times 100$  trong đó T là thể tích khối u trung bình của nhóm thử nghiệm (đã được điều trị bằng kháng thể kháng netrin 1) ở ngày thứ d, và C là thể tích trung bình của nhóm được điều trị bằng đối chứng isotyp. Khả năng ức chế sinh trưởng của khối u  $< 50\%$  được xem là có ý nghĩa.

| Dị ghép dòng tế bào của người | Kháng thể           | % TGI | Số ngày d sau khi điều trị |
|-------------------------------|---------------------|-------|----------------------------|
| GRANTA-519                    | 4C11 của chuột      | 63    | 40                         |
| H358                          | 4C11 HUM03 nhân tạo | 56    | 40                         |
| A549                          | 4C11 HUM03 nhân tạo | 40    | 47                         |
| OCY13                         | 4C11 HUM03 nhân tạo | 33    | 20                         |

Các kháng thể của chuột và kháng thể nhân tạo theo sáng chế có hoạt tính ức chế sinh trưởng khối u hữu hiệu.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

## 1. Polypeptit phân lập:

- cấu thành từ trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc biến thể cấu thành từ mảnh có ít nhất 20 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc

- được mã hóa bởi ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, hoặc biến thể của nó do thoái hóa mã di truyền, hoặc ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4.

2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.35, hoặc polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 35.

3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này được mã hóa bởi ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.36 hoặc biến thể của nó do thoái hóa mã di truyền, hoặc ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.36.

4. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit này cấu thành từ polypeptit có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3, hoặc polypeptit cấu thành từ mảnh có ít nhất 25 hoặc 30 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3.

5. ADN bổ sung có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.36, hoặc biến thể của nó do thoái hóa mã di truyền, hoặc ADN bổ sung biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.36.

6. ADN bổ sung theo điểm 5, trong đó ADN bổ sung này có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4 hoặc SEQ ID NO.36.

7. Kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1, trong đó kháng thể đơn dòng này có các đặc tính sau :

(i) gắn kết đặc hiệu với polypeptit có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.35 hoặc polypeptit biến thể có độ tương đồng ít nhất bằng 85%

so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 hoặc SEQ ID NO.35, hoặc polypeptit biến thể cấu thành từ mảnh có ít nhất 20 axit amin tiếp giáp có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3 ; hoặc

(2i) chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.6, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, và vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, vùng xác định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong YAS và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 ; hoặc

(3i) chứa vùng xác định bổ sung CDR1-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.28, vùng xác định bổ sung CDR2-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng xác định bổ sung CDR3-H có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.30, và vùng xác định bổ sung CDR1-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.31, vùng xác định bổ sung CDR2-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.32 và vùng xác định bổ sung CDR3-L có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.9 ;

trong đó kháng thể đơn dòng này có đặc tính gắn kết netrin-1 và gây chết tế bào hoặc gây chết tế bào khối u theo chương trình thông qua thụ thể UNC5 hoặc thụ thể DCC.

8. Kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1 theo điểm 7, trong đó kháng thể đơn dòng được xác định trong mục (i) gắn kết đặc hiệu với polypeptit có độ tương đồng ít nhất bằng 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự như nêu trong SEQ ID NO.3.

9. Kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 8, trong đó kháng thể đơn dòng này là mảnh gắn kết epitop của nó.

10. Kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9, trong đó kháng thể đơn dòng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.12 hoặc SEQ ID NO.13, tốt hơn nếu cả hai trình tự như nêu trong SEQ ID NO.10 và SEQ ID NO.11, hoặc SEQ ID NO.12 và SEQ ID NO.13.

11. Kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 10, trong đó kháng thể đơn dòng này chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.19 và/hoặc nhóm trình tự như nêu trong SEQ

ID NO.20 đến SEQ ID NO.27, tốt hơn nếu kháng thể này chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.19 và trình tự axit amin được chọn từ nhóm trình tự như nêu trong SEQ ID NO.20 đến SEQ ID NO.27.

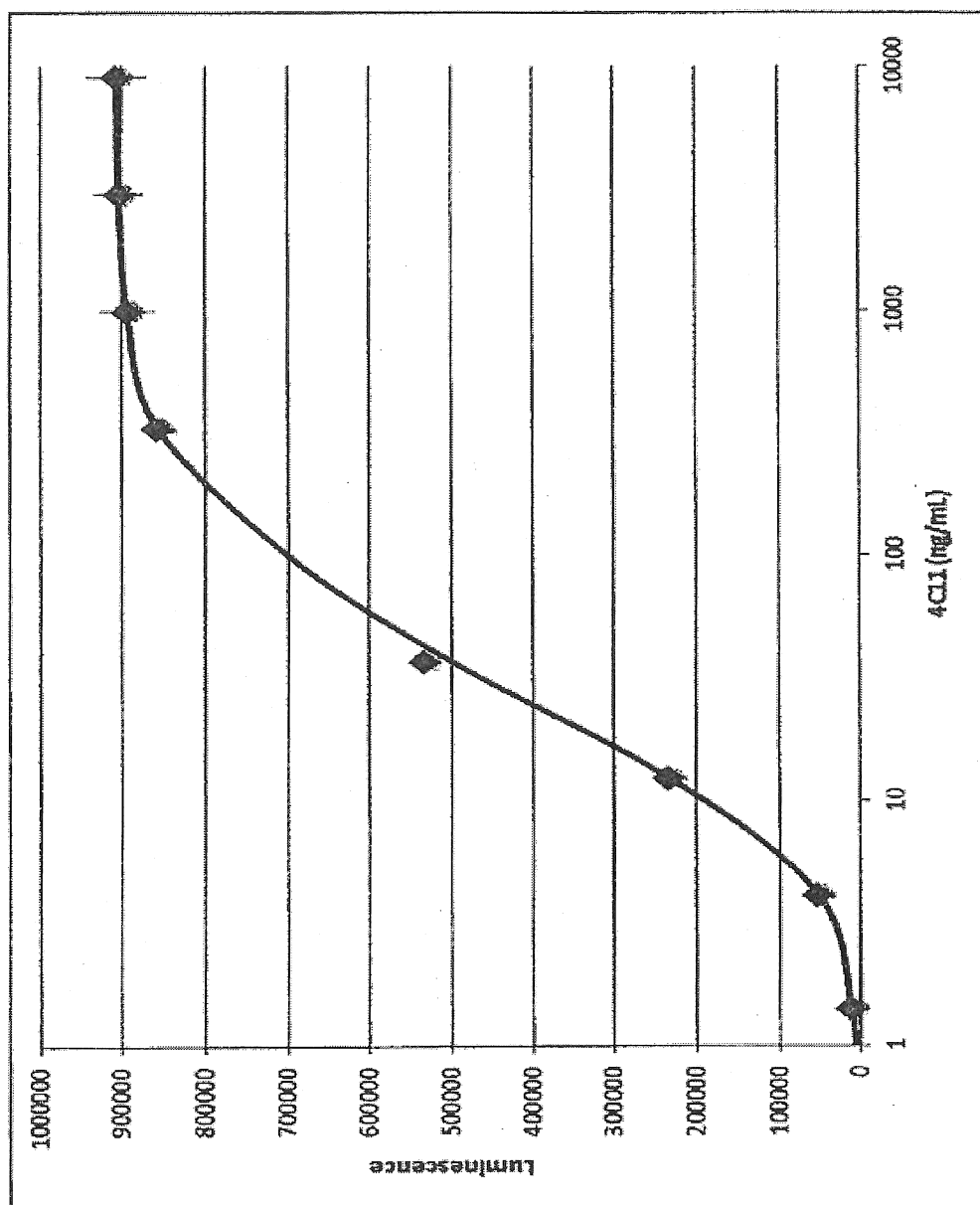
12. Kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1 theo điểm 11, trong đó kháng thể đơn dòng này chứa cặp trình tự axit amin được chọn từ cặp trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14 và SEQ ID NO.20; SEQ ID NO.15 và SEQ ID NO.21; SEQ ID NO.16 và SEQ ID NO.22; SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.23; SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.24; SEQ ID NO.16 và SEQ ID NO.25; SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.26; SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.22; SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.25; và SEQ ID NO.16 và SEQ ID NO.21.

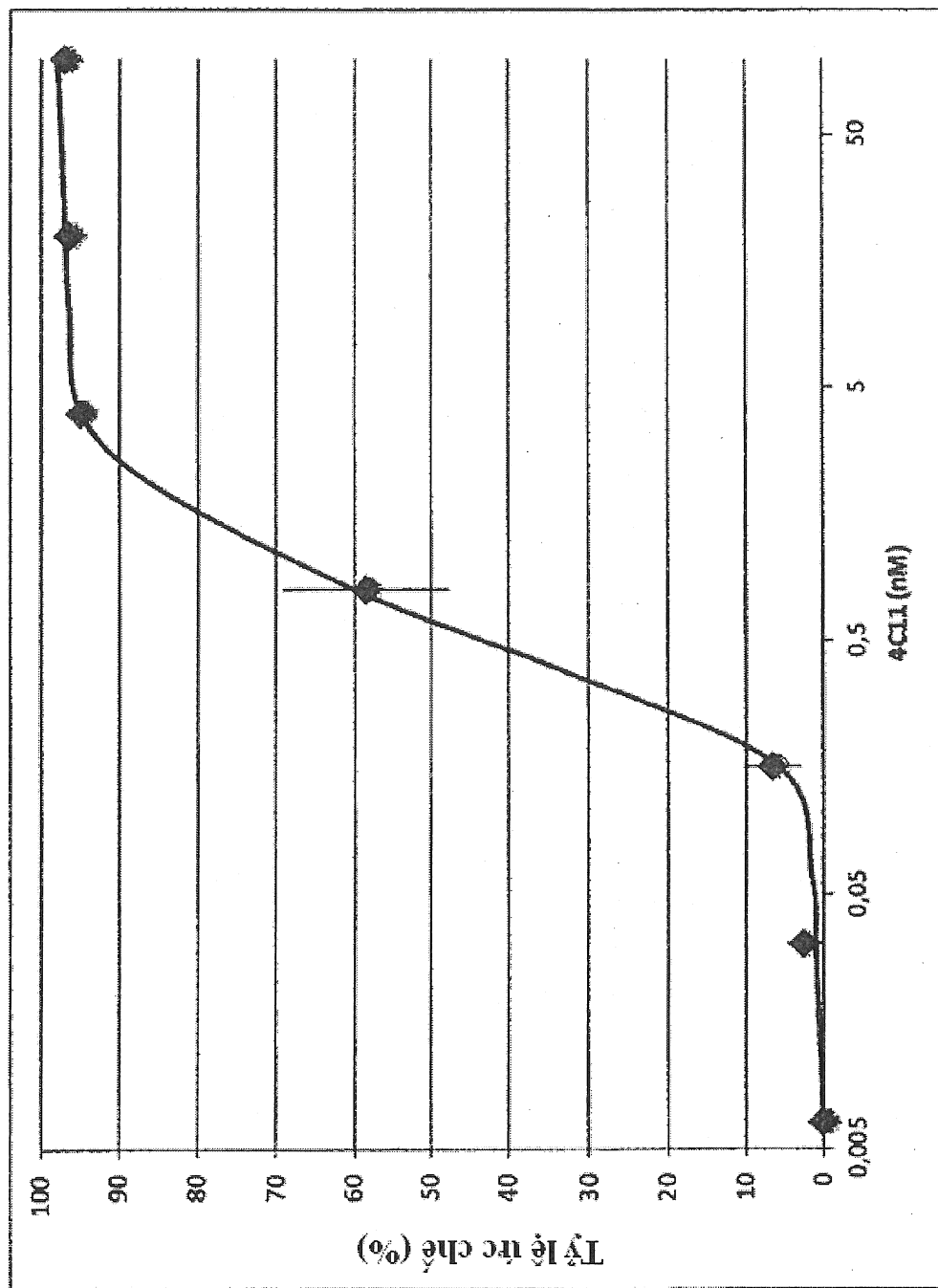
13. Kháng thể đơn dòng gắn kết netrin-1 theo điểm 12, trong đó kháng thể đơn dòng này còn chứa miền hằng định kapa của người trong chuỗi nhẹ, và miền hằng định IgG1 của người trong chuỗi nặng.

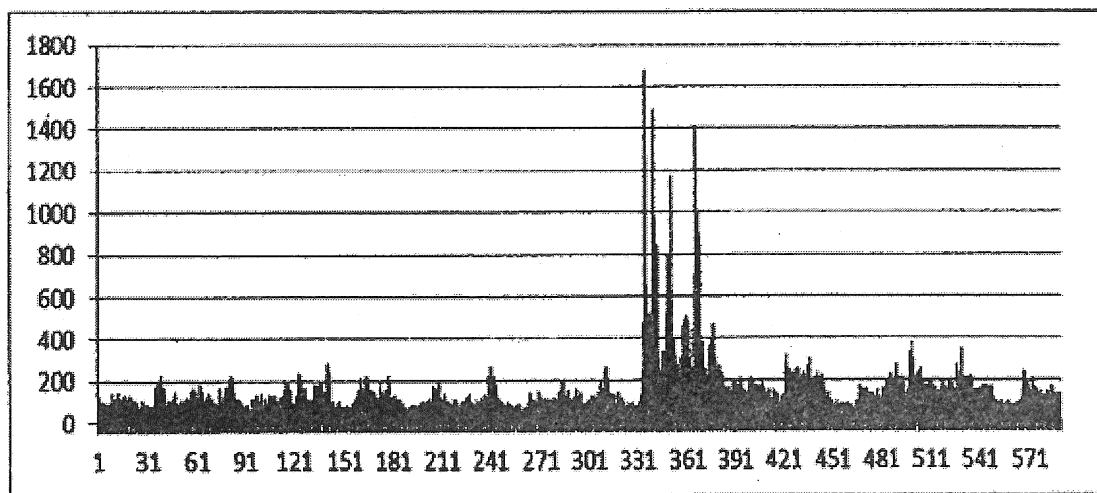
14. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 13, và chất dẫn thuốc, chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó dược phẩm này còn chứa dược chất hóa trị liệu.

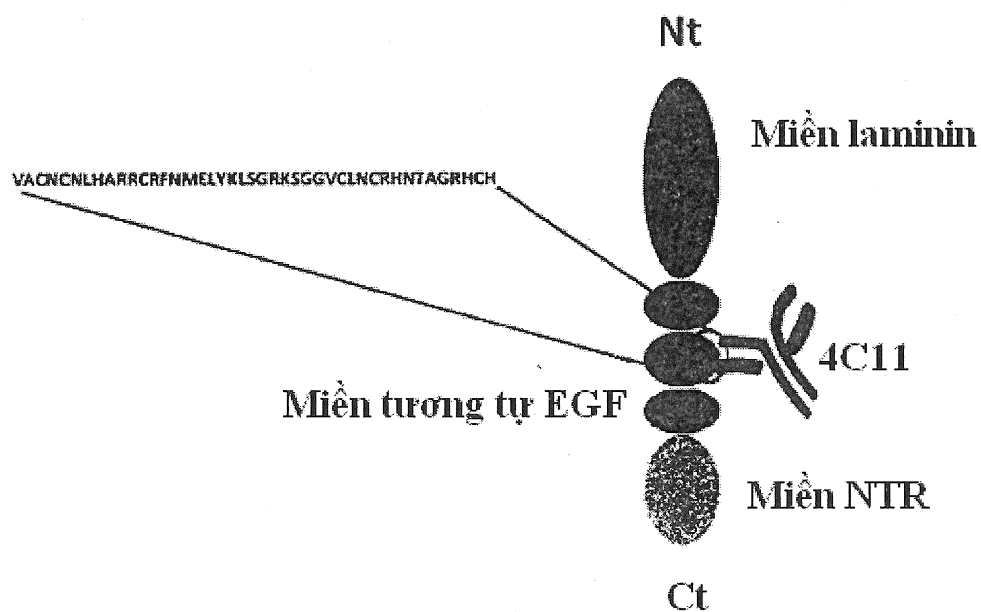
16. Dược phẩm theo điểm 15, trong đó dược chất hóa trị liệu là doxorubicin, 5-fluorouracil (5FU), paclitaxel, hoặc cisplatin.

**Fig. 1**

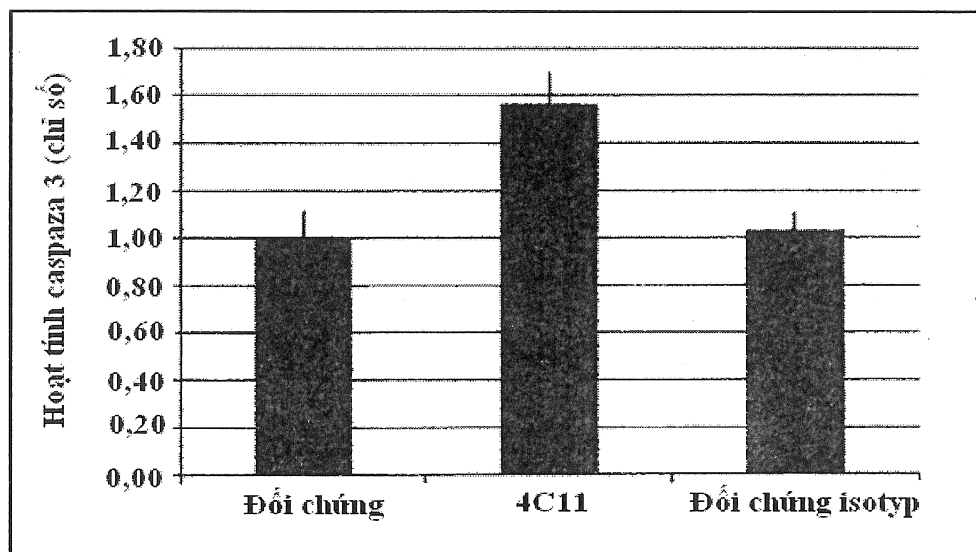
**Fig.2**



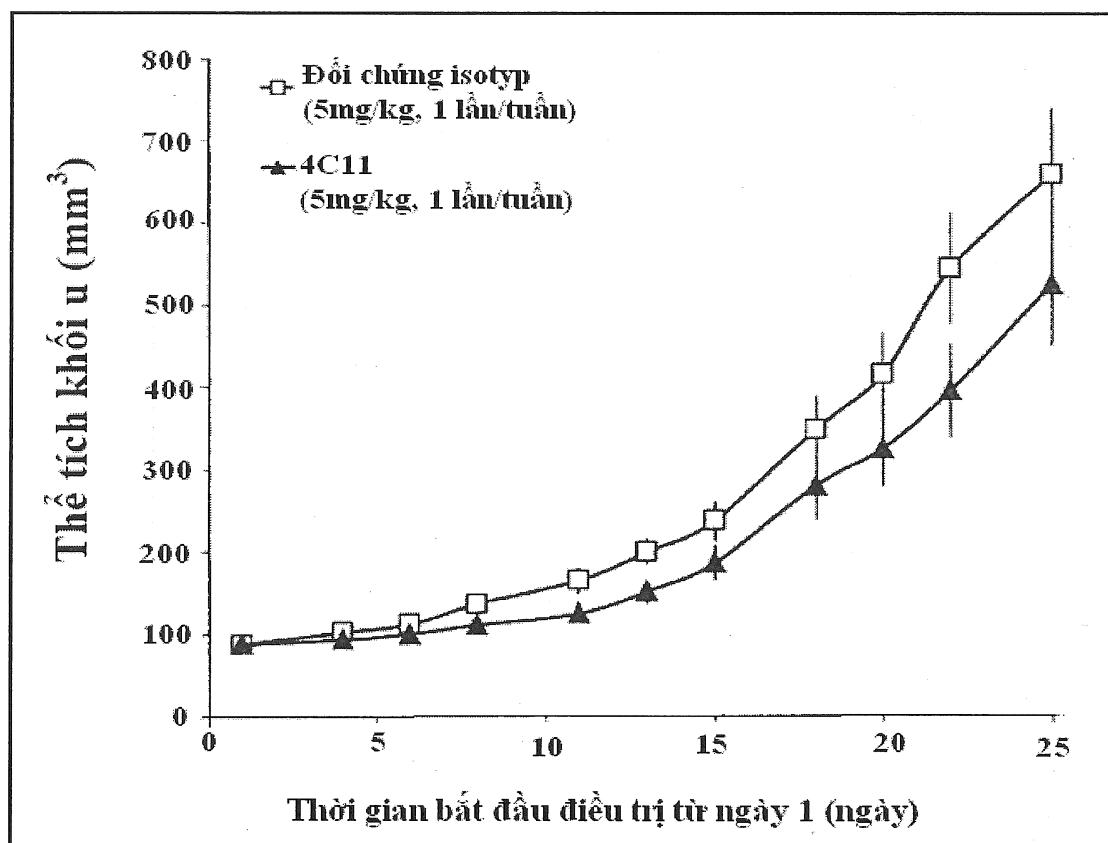
**Fig.3**



**Fig.4**



**Fig.5**



**Fig.6**

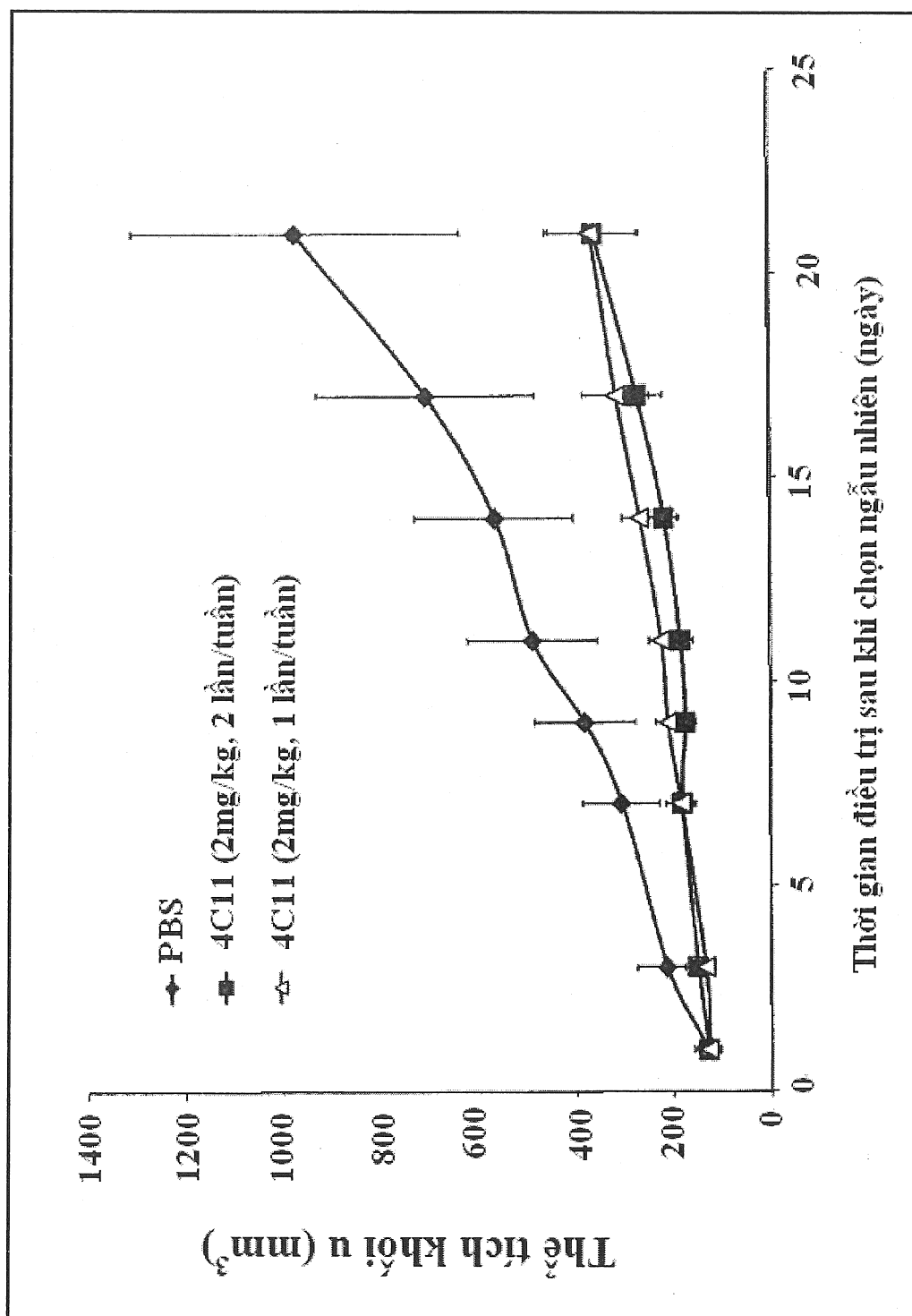
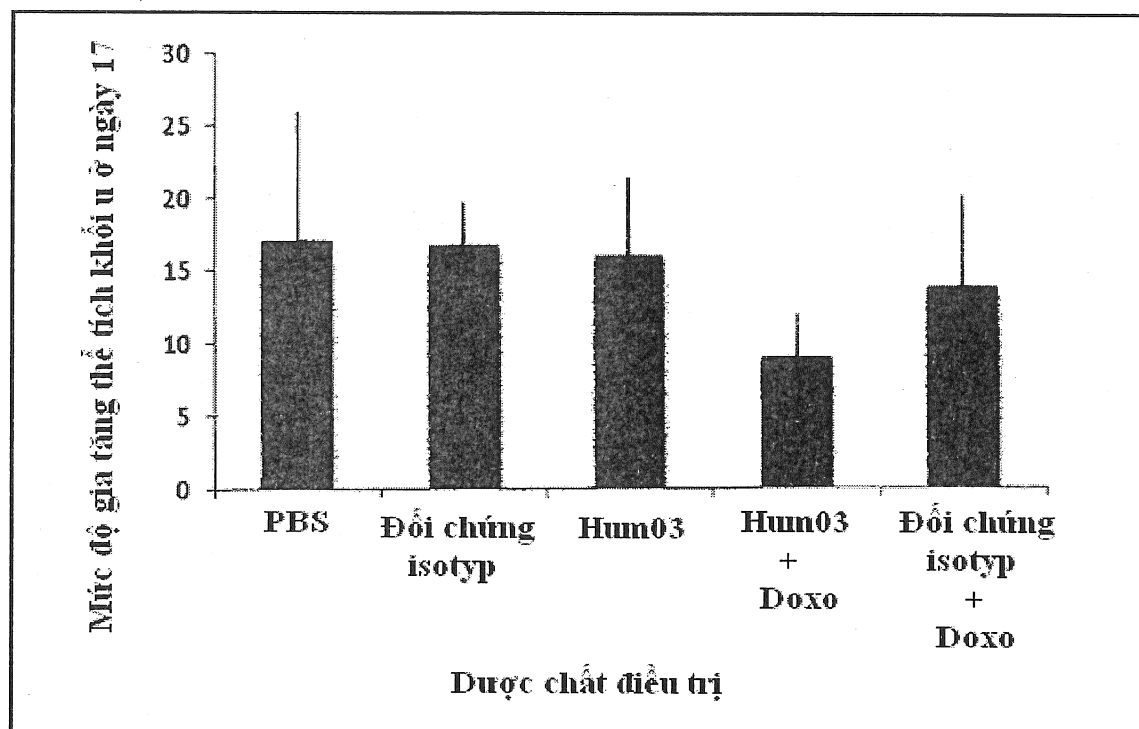
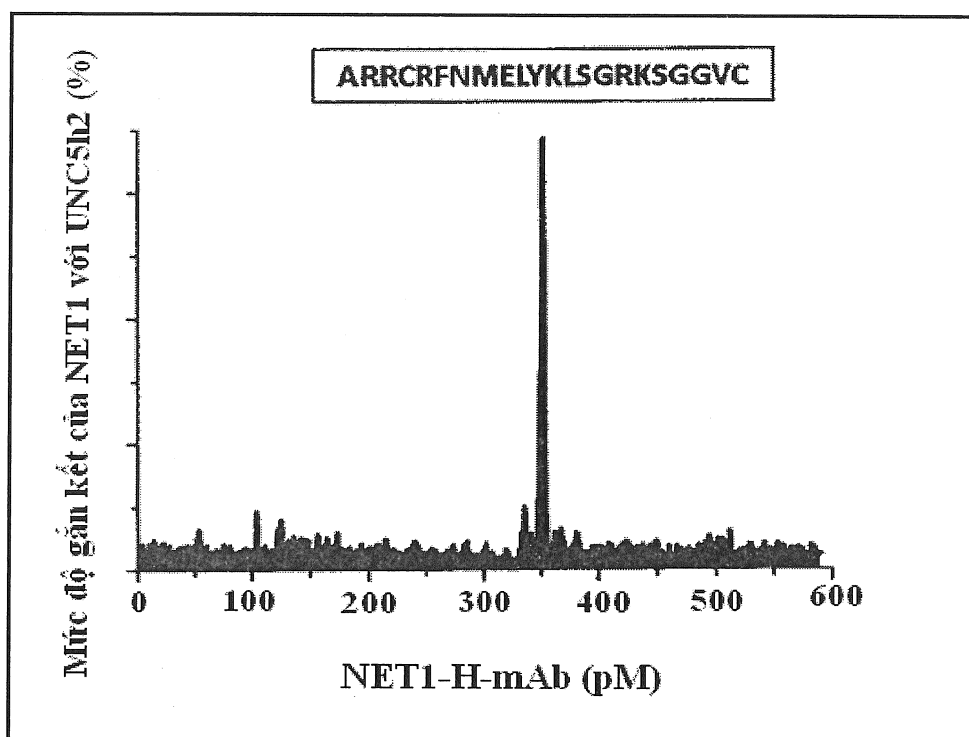


Fig.7



**Fig.8**



**Fig.9**

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NETRIS PHARMA  
 <120> POLYPEPTIT PHẦN LẬP, KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GẮN KẾT VỚI NETRIN-1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY  
 <130> BET 14L3009  
 <160> 36  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 604  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> Trình tự tín hiệu  
 <222> (1)..(24)  
 <220>  
 <221> Trình tự lỗi  
 <222> (339)..(381)  
 <223> Epitop mạch thẳng  
 <400> 1  
 Met Met Arg Ala Val Trp Glu Ala Leu Ala Leu Ala Val Ala  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Val Gly Ala Val Arg Gly Gly Pro Gly Leu Ser Met Phe Ala  
 20 25 30  
 Gly Gln Ala Ala Gln Pro Asp Pro Cys Ser Asp Glu Asn Gly His Pro  
 35 40 45  
 Arg Arg Cys Ile Pro Asp Phe Val Asn Ala Ala Phe Gly Lys Asp Val  
 50 55 60  
 Arg Val Ser Ser Thr Cys Gly Arg Pro Pro Ala Arg Tyr Cys Val Val  
 65 70 75 80  
 Ser Glu Arg Gly Glu Arg Leu Arg Ser Cys His Leu Cys Asn Ala  
 85 90 95  
 Ser Asp Pro Lys Lys Ala His Pro Pro Ala Phe Leu Thr Asp Leu Asn  
 100 105 110  
 Asn Pro His Asn Leu Thr Cys Trp Gln Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Phe  
 115 120 125  
 Pro His Asn Val Thr Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Lys Phe Glu Val  
 130 135 140  
 Thr Tyr Val Ser Leu Gln Phe Cys Ser Pro Arg Pro Glu Ser Met Ala  
 145 150 155 160  
 Ile Tyr Lys Ser Met Asp Tyr Gly Arg Thr Trp Val Pro Phe Gln Phe  
 165 170 175  
 Tyr Ser Thr Gln Cys Arg Lys Met Tyr Asn Arg Pro His Arg Ala Pro  
 180 185 190  
 Ile Thr Lys Gln Asn Glu Gln Glu Ala Val Cys Thr Asp Ser His Thr  
 195 200 205  
 Asp Met Arg Pro Leu Ser Gly Gly Leu Ile Ala Phe Ser Thr Leu Asp  
 210 215 220  
 Gly Arg Pro Ser Ala His Asp Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Ala Phe Ser Arg Leu His Thr  
 245 250 255  
 Phe Gly Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ser Glu Leu Ala Arg Asp Ser Tyr  
 260 265 270  
 Phe Tyr Ala Val Ser Asp Leu Gln Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn  
 275 280 285  
 Gly His Ala Ala Arg Cys Val Arg Asp Arg Asp Asp Ser Leu Val Cys  
 290 295 300  
 Asp Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Pro Glu Cys Asp Arg Cys Lys Pro  
 305 310 315 320  
 Phe His Tyr Asp Arg Pro Trp Gln Arg Ala Thr Ala Arg Glu Ala Asn  
 325 330 335  
 Glu Cys Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe  
 340 345 350  
 Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys  
 355 360 365  
 Leu Asn Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His Tyr Cys Lys  
 370 375 380  
 Glu Gly Tyr Tyr Arg Asp Met Gly Lys Pro Ile Thr His Arg Lys Ala  
 385 390 395 400  
 Cys Lys Ala Cys Asp Cys His Pro Val Gly Ala Ala Gly Lys Thr Cys  
 405 410 415  
 Asn Gln Thr Thr Gly Gln Cys Pro Cys Lys Asp Gly Val Thr Gly Ile  
 420 425 430  
 Thr Cys Asn Arg Cys Ala Lys Gly Tyr Gln Gln Ser Arg Ser Pro Ile  
 435 440 445  
 Ala Pro Cys Ile Lys Ile Pro Val Ala Pro Pro Thr Thr Ala Ala Ser  
 450 455 460  
 Ser Val Glu Glu Pro Glu Asp Cys Asp Ser Tyr Cys Lys Ala Ser Lys

```

465          470          475          480
Gly Lys Leu Lys Ile Asn Met Lys Lys Tyr Cys Lys Lys Asp Tyr Ala
          485          490          495
Val Gln Ile His Ile Leu Lys Ala Asp Lys Ala Gly Asp Trp Trp Lys
          500          505          510
Phe Thr Val Asn Ile Ile Ser Val Tyr Lys Gln Gly Thr Ser Arg Ile
          515          520          525
Arg Arg Gly Asp Gln Ser Leu Trp Ile Arg Ser Arg Asp Ile Ala Cys
          530          535          540
Lys Cys Pro Lys Ile Lys Pro Leu Lys Lys Tyr Leu Leu Leu Gly Asn
          545          550          555          560
Ala Glu Asp Ser Pro Asp Gln Ser Gly Ile Val Ala Asp Lys Ser Ser
          565          570          575
Leu Val Ile Gln Trp Arg Asp Thr Trp Ala Arg Arg Leu Arg Lys Phe
          580          585          590
Gln Gln Arg Glu Lys Lys Gly Lys Cys Lys Lys Ala
          595          600
<210> 2
<211> 1817
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 2
atgatgcgcg cagtgtggga ggcgtggcg ggcgtggcg cgttggcgtg cctgggtggc
gcgggtgcgc gcgggcccgc gctcagcatg ttccgcggcc aggcggcgca gcccgatccc
tgctcggacg agaacggcca ccgcgcgcgc tgcatcccg actttgtcaa tgcggccttc
ggcaaggacg tgcgcgtgtc cagcacctgc ggccggcccc cgccgcgcta ctgcgtggtg
agcgagcgcg gcgaggagcg gctgcgctcg tgccacctct gcaacgcgtc cgaccccaag
aaggcgcaac cgcccgccct cctcaccgac ctcaacaacc cgacaacct gacgtgctgg
cagtccgaga actacctgca gttcccgac aacgtcacgc tcacactgtc cctcggaag
aagttcgaag tgacctacgt gagcctgcag ttctgctcgc cgccggccga gtccatggcc
atctacaagt ccatggacta cgggcgcacg tgggtgccct tccagttcta ctccacgcag
tgccgcaaga tgtacaaccg gccgcaccgc gcgcccatca ccaagcagaa cgagcaggag
gccgtgtgca ccgactcgca caccgacatg cgcccgctct cgggcggcct catcgcttc
agcacgctgg acgggcggcc ctccgcgcac gacttcgaca actcgcccg gctgcaggac
tgggtcacgg ccacagacat ccgcgtggcc ttcagccgcc tgcacacgtt cggcgacgag
aacgaggacg actcggagct gccgcgcgac tcgtacttct acgcggtgtc cgacctgcag
gtgggcggcc ggtgcaagtg caacggccac gcggcccgct gcgtgcgca ccgcgacgac
agcctggtgt gcgactgcag gcacaacacg gccggccccg agtgcgacg ctgcaagccc
ttccactacg accggccctg gcagcgcgcc acagcccccg aagccaacga gtgcgtggcc
tgtaactgca actgcacatg ccgcgcgtgc cgcttcaaca tggagctcta caagctttcg
gggcgcaaga gcgaggtgtg ctgcctcaac tgtcgccaca acaccgcccg ccgccactgc
cattactgca aggagggcta ctaccgcgac atgggcaagc ccataccca ccggaaggcc
tgcaaaacct gtgattgcca ccctgtgggt gctgctggca aaacctgcaa ccaaaccacc
ggccagtgtc cctgcaagga cggcgtgacg ggtatcacct gcaaccgctg cgccaaaggc
taccagcgag ccgctctctc catcgcccc tgcataaaaga tccctgtagc gccgcgacg
actgcagcca gcagcgtgga ggagcctgaa gactgcgatt cctactgcaa ggctccaag
gggaagctga agattaacat gaaaaagtac tgcaagaagg actatgccgt ccagatccac
atcctgaagg cggacaaggc gggggactgg tgggaagttca cgtggaacat catctccgtg
tataagcagg gcacgagccg catccgccc ggtgaccaga gctgtggat ccgctcgcg
gacatgcct gcaagtgtcc caaaatcaag cccctcaaga agtacctgct gctgggcaac
gcggaggact ctccggacca gagcgcatc gtggcgata aaagcagcct ggtgatccag
tggcgggaca cgtgggcgcg gcgctgcgc aagttccagc agcgtgagaa gaagggaag
tgcaagaagg cctagcg
<210> 3
<211> 43
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met
1 5 10 15
Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys Leu Asn
20 25 30
Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His
35 40
<210> 4
<211> 129
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 4
gtggcctgta actgcaacct gcatgcccg cgtgcgcgt tcaacatgga gctctacaag
ctttcggggc gcaagagcgc aggtgtctgc ctcaactgtc gccacaacac cgccggccgc
cactgccat
<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 5
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
1 5
<210> 6

```

```

<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 6
Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
1 5
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 7
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr
1 5
<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 8
Gln Ser Val Ser Asn Asp
1 5
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 9
Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
1 5
<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 10
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ala
115
<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (27)..(32)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (50)..(52)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (89)..(97)
<223> CDR theo IGMT
<400> 11
Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

```

```

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

<210> 12
<211> 440
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 12
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100      105      110
Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
      115      120      125
Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
      130      135      140
Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
      145      150      155      160
Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Asp
      165      170      175
Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro
      180      185      190
Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
      195      200      205
Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile
      210      215      220
Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
      225      230      235      240
Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
      245      250      255
Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
      260      265      270
Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln
      275      280      285
Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
      290      295      300
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala
      305      310      315      320
Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
      325      330      335
Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala
      340      345      350
Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu
      355      360      365
Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
      370      375      380
Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr
      385      390      395      400
Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
      405      410      415

```

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys  
 420 425 430  
 Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 435 440  
 <210> 13  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> Trình tự lỗi  
 <222> (27)..(32)  
 <223> CDR theo IGMT  
 <220>  
 <221> Trình tự lỗi  
 <222> (50)..(52)  
 <223> CDR theo IGMT  
 <220>  
 <221> Trình tự lỗi  
 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR theo IGMT  
 <400> 13  
 Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
 130 135 140  
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
 180 185 190  
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210  
 <210> 14  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
 <220>  
 <223> Biện thể nhân tạo  
 <220>  
 <221> Trình tự lỗi  
 <222> (27)..(32)  
 <223> CDR theo IGMT  
 <220>  
 <221> Trình tự lỗi  
 <222> (50)..(52)  
 <223> CDR theo IGMT  
 <220>  
 <221> Trình tự lỗi  
 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR theo IGMT  
 <400> 14  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly  
100

<210> 15  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo  
<220>  
<223> Biến thể nhân tạo  
<220>  
<221> Trình tự lỗi  
<222> (27)..(32)  
<223> CDR theo IGMT  
<220>  
<221> Trình tự lỗi  
<222> (50)..(52)  
<223> CDR theo IGMT  
<220>  
<221> Trình tự lỗi  
<222> (89)..(97)  
<223> CDR theo IGMT  
<400> 15  
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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
20 25 30  
Val Ala Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala  
65 70 75 80  
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly  
100

<210> 16  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo  
<220>  
<223> Biến thể nhân tạo  
<220>  
<221> Trình tự lỗi  
<222> (27)..(32)  
<223> CDR theo IGMT  
<220>  
<221> Trình tự lỗi  
<222> (50)..(52)  
<223> CDR theo IGMT  
<220>  
<221> Trình tự lỗi  
<222> (89)..(97)  
<223> CDR theo IGMT  
<400> 16  
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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
20 25 30  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser  
65 70 75 80  
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly  
100

<210> 17  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo  
<220>  
<223> Biến thể nhân tạo  
<220>  
<221> Trình tự lỗi  
<222> (27)..(32)  
<223> CDR theo IGMT  
<220>  
<221> Trình tự lỗi

```

<222> (50)..(52)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (89)..(97)
<223> CDR theo IGMT
<400> 17
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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly
100

<210> 18
<211> 101
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (27)..(32)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (50)..(52)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (89)..(97)
<223> CDR theo IGMT
<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly
100

<210> 19
<211> 101
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (27)..(32)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (50)..(52)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (89)..(97)
<223> CDR theo IGMT
<400> 19
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

```

```

      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly
      100
<210> 20
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105
<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 21
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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20      25      30
Asn Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105
<210> 22
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo

```

```

<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 22
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 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
65 70 75 80
Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105

<210> 23
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105

<210> 24
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 24
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

```

```

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

```

```

<210> 25
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 25

```

```

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

```

```

<210> 26
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biến thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 26

```

```

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

```

```

<210> 27

```

```

<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Biễn thể nhân tạo
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (26)..(33)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (51)..(58)
<223> CDR theo IGMT
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (97)..(105)
<223> CDR theo IGMT
<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
          20          25          30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
          65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
          100          105
<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 28
Ser Tyr Asn Met His
1          5
<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 29
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1          5          10          15
Gly
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 30
Gly Gly Thr Gly Phe Ala Tyr
1          5
<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 31
Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
1          5          10
<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 32
Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1          5
<210> 33
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi để thực hiện phản ứng PCR đối với gen netrin-1 của người
<400> 33
aaaagtactg caagaaggac tatgc
<210> 34
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Đoạn mồi ngược để thực hiện phản ứng PCR đối với gen netrin-1 của người
<400> 34
ccctgcttat acacggagat g                                21
<210> 35
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35
Ala Arg Arg Cys Arg Phe Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg
1          5          10          15
Lys Ser Gly Gly Val Cys
                20
<210> 36
<211> 66
<212> ADN
<213> ADN bổ sung
<400> 36
gcccggcgct gccgcttcaa catggagctc tacaagcttt cggggcgcaa gacgggaggt    60
gtctgc                                                                    66

```