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

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

(11) **1-0036537**

(51)[7] **A61K 39/395**; C12N 9/64; C07K 16/40; A61K 39/00

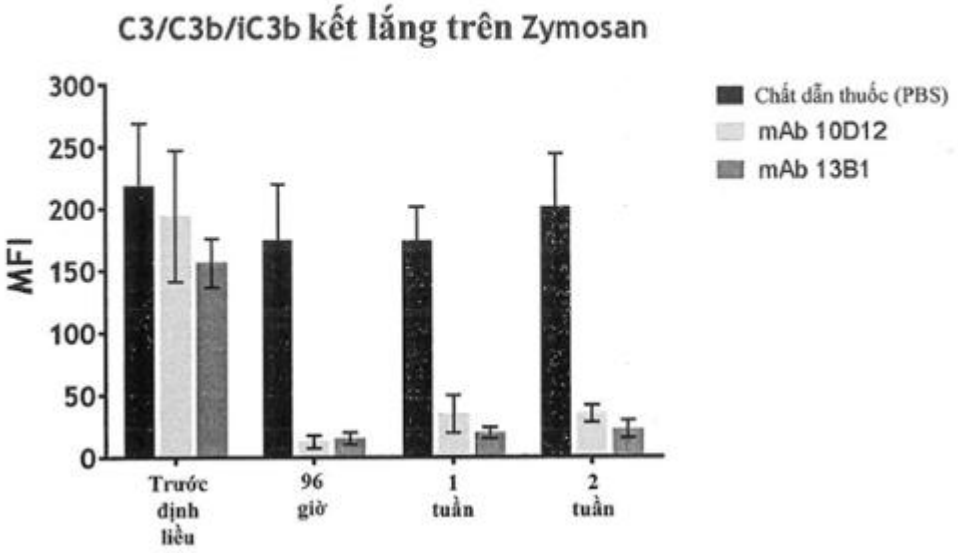
(13) **B**

(21) 1-2019-00950
(22) 31/07/2017
(86) PCT/US2017/044714 31/07/2017
(87) WO 2018/026722 08/02/2018
(30) 62/369,674 01/08/2016 US; 62/419,420 08/11/2016 US; 62/478,336 29/03/2017 US
(45) 25/08/2023 425
(43) 25/09/2019 378A
(73) 1. OMEROS CORPORATION (US)
201 Elliott Avenue West, Seattle, WA 98119, United States of America
2. UNIVERSITY OF LEICESTER (GB)
University Road, Leicester, Leicestershire, LE1 7RH, United Kingdom
(72) CUMMINGS, W., Jason (US); DEMOPULOS, Gregory, A. (US); DUDLER, Thomas (CH); SCHWAEBLE, Hans-Wilhelm (DE); TJOELKER, Larry, W. (US); WOOD, Christi, L. (US); YABUKI, Munehisa (JP).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP HOẶC MẢNH LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ LIÊN KẾT VỚI MASP-3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể ức chế MASP-3 và dược phẩm chứa kháng thể này nhằm dùng để ức chế các tác động bất lợi do sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3.

mAb MASP-3 ức chế APC *in vivo*



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm và phương pháp ức chế MASP-3 để điều trị các bệnh và rối loạn khác nhau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ thống bổ thể mang lại cơ chế tác động sớm để khởi phát, khuếch đại và sắp đặt đáp ứng miễn dịch đối với bệnh nhiễm vi khuẩn và các chấn thương cấp tính khác (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York), ở người và các động vật có xương sống khác. Mặc dù sự hoạt hóa bổ thể tạo ra hàng rào đứng đầu có giá trị kháng các mầm bệnh tiềm ẩn, nhưng các hoạt tính của bổ thể mà thúc đẩy đáp ứng miễn dịch bảo vệ cũng có thể là mối đe dọa tiềm ẩn cho vật chủ (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol. 15*:417-431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig. 24*:219-228, 1994). Ví dụ, sản phẩm phân hủy protein C3 và C5 bổ sung và hoạt hóa các bạch cầu trung tính. Dù rất cần thiết cho hàng rào ở vật chủ, các bạch cầu trung tính đã hoạt hóa không phân biệt việc giải phóng các enzym phá hủy của chúng và có thể gây hiện tượng phá hủy cơ quan. Ngoài ra, sự hoạt hóa bổ thể có thể gây ra hiện tượng kết lắng các thành phần bổ thể phân hủy ở các tế bào chủ gần đó cũng như ở các đích vi khuẩn, dẫn đến tình trạng phân hủy tế bào chủ.

Hệ thống bổ thể này cũng liên quan đến quá trình sinh bệnh của nhiều tình trạng bệnh cấp và mạn tính, bao gồm: nhồi máu cơ tim, đột quỵ, ARDS, tổn thương do tái tưới máu, sốc nhiễm trùng huyết, rò rỉ mao mạch sau bỏng do nhiệt, chứng viêm sau khi ghép tim phổi nhân tạo, thải loại mảnh ghép, viêm khớp dạng thấp, bệnh đa xơ cứng, bệnh nhược cơ, và bệnh Alzheimer. Trong hầu hết tất cả các tình trạng bệnh lý này, bổ thể không phải là nguyên nhân nhưng là một trong các yếu tố liên quan đến quá trình sinh bệnh. Tuy nhiên, sự hoạt hóa bổ thể có thể là cơ chế

bệnh lý chính và là điểm hữu hiệu để kiểm soát lâm sàng nhiều tình trạng bệnh này. Việc nhận biết ngày càng gia tăng về tầm quan trọng của tổn thương mô qua trung gian bổ thể trong các tình trạng bệnh khác nhau nhấn mạnh nhu cầu về các thuốc ức chế bổ thể hữu hiệu. Tính đến nay, Eculizumab (Solaris®), kháng thể kháng C5, là thuốc hướng đích bổ thể duy nhất đã được phê duyệt để sử dụng cho người. Tuy nhiên, C5 là một trong một vài phân tử tác động nằm "cùng chiều" trong hệ thống bổ thể, và sự phong bế C5 không ức chế sự hoạt hóa của hệ thống bổ thể. Do đó, chất ức chế trong các bước ban đầu của quá trình hoạt hóa bổ thể sẽ có các ưu điểm có ý nghĩa so với chất ức chế bổ thể "cùng chiều".

Hiện nay, đã được chấp nhận rộng rãi rằng hệ thống bổ thể có thể được hoạt hóa thông qua ba con đường riêng biệt: con đường cổ điển, con đường lectin, và con đường nhánh. Con đường cổ điển thường được khởi phát bằng phức hợp gồm có các kháng thể chủ liên kết với hạt ngoại lai (tức là, kháng nguyên) và vì thế cần có sự tiếp xúc ưu tiên với kháng nguyên để tạo ra đáp ứng kháng thể đặc hiệu. Do sự hoạt hóa của con đường cổ điển phụ thuộc vào đáp ứng miễn dịch thích ứng ưu tiên bởi vật chủ, nên con đường cổ điển này là một phần của hệ miễn dịch đạt được. Ngược lại, cả con đường lectin và con đường nhánh đều không phụ thuộc vào tính miễn dịch thích ứng và là một phần của hệ miễn dịch bẩm sinh.

Sự hoạt hóa hệ thống bổ thể dẫn đến sự hoạt hóa tuần tự của các zymogen serin proteaza. Bước thứ nhất trong quá trình hoạt hóa con đường cổ điển là bước liên kết phân tử nhận diện đặc hiệu, C1q, với các phân tử IgG và IgM liên kết kháng nguyên. C1q được kết hợp với tiền enzym serin proteaza Clr và Cls dưới dạng phức hợp gọi là Cl. Khi liên kết C1q với phức hợp miễn dịch, thì sự phân cắt phân hủy protein tự động của điểm Arg-Ile của Clr diễn ra trước khi phân cắt qua trung gian Clr và hoạt hóa Cls, từ đó có được khả năng phân cắt C4 và C2. C4 được phân cắt thành hai mảnh, được ký hiệu là C4a và C4b, và, tương tự, C2 được phân cắt thành C2a và C2b. Mảnh C4b có thể tạo ra các liên kết cộng hóa trị với nhóm hydroxyl hoặc nhóm amin liền kề và tạo ra C3 convertaza (C4b2a) thông qua sự tương tác không cộng hóa trị với mảnh C2a của C2 đã hoạt hóa. C3 convertaza (C4b2a) hoạt hóa C3 bằng

cách phân cắt phân hủy protein thành thành phần con C3a và C3b dẫn đến việc tạo ra C5 convertaza (C4b2a3b), mà, bằng cách phân cắt C5 dẫn đến việc tạo ra phức hợp tấn công màng (C5b được kết hợp với C6, C7, C8 và C-9, còn được đề cập đến là "MAC") mà có thể phá vỡ các màng tế bào dẫn đến hiện tượng phân hủy tế bào. Các dạng đã hoạt hóa của C3 và C4 (C3b và C4b) được kết lắng cộng hóa trị trên các bề mặt đích ngoại lai, được nhận biết bởi các thụ thể bổ thể trên các thực bào.

Một cách độc lập, bước thứ nhất trong quá trình hoạt hóa hệ thống bổ thể thông qua con đường lectin cũng là bước liên kết các phân tử nhận diện đặc hiệu, sau đó là bước hoạt hóa các tiền enzym serin proteaza có liên quan. Tuy nhiên, thay vì liên kết các phức hợp miễn dịch bởi C1q, thì các phân tử nhận diện trong con đường lectin lại chứa nhóm các protein liên kết hydrat cacbon (lectin liên kết manan (MBL), H-ficolin, M-ficolin, L-ficolin và lectin typ C CL-11), được đề cập chung là lectin. Xem tài liệu J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta 1572*:387-400, (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol*. 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology 101*:225-232 (2000)). Xem cả trong tài liệu J. Luet et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:387-400 (2002); Holmskov et al, *Annu Rev Immunol* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000); Hansen et al, *J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010).

Ikeda et al. đầu tiên chứng minh rằng, giống với C1q, MBL có thể hoạt hóa hệ thống bổ thể khi liên kết với các hồng cầu được phủ manan của nấm men theo cách phụ thuộc vào C4 (Ikeda et al., *J. Biol. Chem. 262*:7451-7454, (1987)). MBL, một thành viên của họ protein colectin, là lectin phụ thuộc vào canxi mà liên kết hydrat cacbon với nhóm 3-và 4-hydroxy được định hướng trong mặt phẳng xích đạo của vòng pyranoza. Vì thế các phối tử chiếm ưu thế đối với MBL là D-manoza và N-axetyl-D-glucosamin, trong khi các hydrat cacbon không đáp ứng yêu cầu trong không gian này lại có ái lực đối với MBL không phát hiện ra được (Weis et al., *Nature* 360:127-134, (1992)). Sự tương tác giữa MBL và các đường hóa trị một là cực kỳ yếu, với các hằng số phân ly thường nằm trong khoảng milimol một chữ số. MBL có được sự liên kết đặc hiệu chặt chẽ với phối tử glycan bằng ái lực, tức là,

bằng cách tương tác đồng thời với nhiều gốc monosacarit được bố trí tiếp xúc gần với nhau (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, (1992)). MBL nhận biết các vân hydrat cacbon thường tạo vân trên các vi sinh vật như vi khuẩn, nấm men, ký sinh trùng và một số virut nhất định. Ngược lại, MBL không nhận biết D-galactoza và axit sialic, đường gần cuối và cuối mà thường tạo vân trên thể tiếp hợp glyco phức "thuần thục" có mặt trên huyết tương của động vật có vú và glycoprotein bề mặt tế bào. Tính đặc hiệu liên kết này được cho là thúc đẩy sự nhận biết các bề mặt "ngoại lai" và hỗ trợ bảo vệ tránh "tự hoạt hóa". Tuy nhiên, MBL liên kết với cụm các glycan "tiền chất" nồng độ manoza cao với ái lực cao trên glycoprotein liên kết N và glycolipit được cô lập trong lưới nội bào và Golgi của tế bào động vật có vú (Maynard et al., *J. Biol. Chem. 257*:3788-3794, (1982)). Ngoài ra, đã cho thấy rằng MBL có thể liên kết các polynucleotit, ADN và ARN, mà có thể được cho tiếp xúc trên tế bào hoại tử và tế bào chết theo chương trình (Palaniyar et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1010:467-470 (2003); Nakamura et al., *J. Leuk. Biol.* 86:737-748 (2009)). Do đó, các tế bào đã bị phá hủy là các đích tiềm năng để hoạt hóa con đường lectin thông qua sự liên kết MBL.

Ficolin có kiểu miền lectin khác với MBL, gọi là miền giống fibrinogen. Ficolin liên kết các gốc đường theo cách độc lập với Ca^{++}. Ở người, đã nhận biết được ba loại ficolin (L-ficolin, M-ficolin và H-ficolin). Hai ficolin huyết thanh, L-ficolin và H-ficolin, có chung tính đặc hiệu đối với N-axetyl-D-glucosamin; tuy nhiên, H-ficolin còn liên kết với N-axetyl-D-galactosamin. Sự khác biệt giữa tính đặc hiệu với đường của L-ficolin, H-ficolin, CL-11, và MBL có nghĩa là các lectin khác nhau có thể là các thể tiếp hợp glycol bổ sung và hướng đích khác nhau, mặc dù chồng lặp. Khái niệm này được hỗ trợ bởi báo cáo gần đây rằng, trong số các lectin đã biết trong con đường lectin, chỉ có L-ficolin liên kết đặc hiệu với axit lipoteichoic, là thể tiếp hợp glyco của vách tế bào được tìm thấy trên tất cả các vi khuẩn gram dương (Lynch et al., *J. Immunol. 172*:1198-1202, (2004)). Ngoài các gốc đường được axetyl hóa, các ficolin cũng có thể liên kết với axit amin được axetyl hóa và polypeptit (Thomsen et al., *Mol. Immunol.* 48(4):369-81 (2011)). Các colectin

(tức là, MBL) và ficolin không mang độ tương đồng đáng kể ở trình tự axit amin. Tuy nhiên, hai nhóm protein này có tổ chức miền tương tự và, giống với C1q, lắp ghép thành cấu trúc oligome, tối đa hóa khả năng liên kết nhiều điểm.

Nồng độ trong huyết thanh của MBL biến đổi ở mức cao trong các quần thể khỏe mạnh và nồng độ này được kiểm soát di truyền bằng hiện tượng đa hình/đột biến ở cả gen khởi đầu và vùng mã hóa của gen MBL. Dưới dạng protein pha cấp tính, sự biểu hiện của MBL được điều hòa tăng hơn nữa trong quá trình viêm. L-ficolin có mặt trong huyết thanh ở nồng độ tương tự với các nồng độ của MBL. Do đó, nhánh L-ficolin của con đường lectin có thể so sánh được với nhánh MBL về độ bền. MBL và ficolin cũng có thể hoạt động như opsonin, cho phép các thực bào hướng đích bề mặt được tạo vân bởi MBL và ficolin (xem tài liệu Jack et al., *J Leukoc Biol.*, 77(3):328-36 (2004), Matsushita and Fujita, *Immunobiology*, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., *J Immunol,* 174(1):418-25(2005). Việc opsonin hóa này đòi hỏi sự tương tác của các protein với thụ thể thực bào (Kuhlman et al., *J. Exp. Med. 169*:1733, (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Chem. 271*:2448-54, (1996)), tính đồng nhất của chúng chưa được thiết lập.

MBL của người tạo ra tương tác đặc hiệu và có ái lực cao thông qua miền giống colagen của nó với serin proteaza giống C1r/Cls độc nhất, gọi là serin proteaza liên quan đến MBL (MBL-associated serine protease: MASP). Tính đến nay, ba MASP đã được mô tả. Trước tiên, enzym "MASP" đơn lẻ được nhận biết và mô tả đặc điểm dưới dạng enzym chịu trách nhiệm khởi phát tầng bổ thể (tức là, phân cắt C2 và C4) (Matsushita et al., *J Exp Med* 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., *J. Immunol. 150*:571-578, (1993)). Sau đó đã xác định được rằng, trên thực tế, hoạt tính MASP là hỗn hợp của hai proteaza: MASP-1 và MASP-2 (Thiel et al., *Nature 386*:506-510, (1997)). Tuy nhiên, đã chứng minh được rằng, một mình phức hợp MBL MASP 2 là đủ để hoạt hóa bổ thể (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol. 165*:2093-2100, (2000)). Ngoài ra, chỉ có MASP-2 phân cắt C2 và C4 ở tốc độ cao (Ambrus et al., *J. Immunol. 170*:1374-1382, (2003)). Do đó, MASP-2 là proteaza chịu trách nhiệm hoạt hóa C4 và C2 để tạo ra C3 convertaza, C4b2a. Đây là sự khác

biệt đáng kể với phức hợp C1 của con đường cổ điển, nơi mà sự tác động kết hợp của hai serin proteaza cụ thể (C1r và C1s) dẫn đến việc hoạt hóa hệ thống bổ thể. Ngoài ra, proteaza mới thứ ba, MASP-3, được phân lập (Dahl, M.R., et al., *Immunity 15*:127-35, 2001). MASP-1 và MASP-3 là sản phẩm ghép thay thế của cùng một gen.

MASP chia sẻ các tổ chức miền giống hệt với các tổ chức miền của Clr và Cls, là thành phần enzym hóa của phức hợp Cl (Sim et al., *Biochem. Soc. Trans. 28*:545, (2000)). Các miền này bao gồm miền đầu tận N Clr/Cls/VEGF nhím biển/protein hình thái xương (CUB), miền giống yếu tố sinh trưởng biểu bì, miền CUB thứ hai, thể tiếp đôi của miền protein kiểm soát bổ thể, và miền serin proteaza. Như trong C1 proteaza, sự hoạt hóa MASP-2 diễn ra thông qua sự phân cắt của liên kết Arg-I1e liền kề với miền serin proteaza, mà phân chia enzym thành mạch A và B liên kết bằng disulfua, mạch B gồm có miền serin proteaza.

MBL cũng có thể kết hợp với dạng ghép thay thế của MASP-2, được biết đến là protein liên quan đến MBL 19 kDa (MAp19) hoặc protein liên quan đến MBL nhỏ (sMAP), thiếu hoạt tính xúc tác của MASP-2. (Stover, *J. Immunol. 162*:3481-90, (1999); Takahashi et al., *Int. Immunol. 11*:859-863, (1999)). MAp19 trước tiên bao gồm hai miền của MASP-2, sau đó là trình tự thêm của bốn axit amin độc nhất. Chức năng của Map19 là không rõ ràng (Degn et al., *J Immunol. Methods*, 2011). Gen MASP-1 và MASP-2 lần lượt được nằm trên nhiễm sắc thể 3 và 1 của người (Schwaeble et al., *Immunobiology 205*:455-466, (2002)).

Một vài dòng bằng chứng đề xuất rằng có các phức hợp MBL-MASP khác nhau và phần lớn các MASP trong huyết thanh không được tạo phức với MBL (Thiel, et al., *J. Immunol. 165*:878-887, (2000)). Cả H- và L-ficolin đều liên kết với tất cả các MASP và hoạt hóa con đường bổ thể lectin, và MBL cũng vậy (Dahl et al., *Immunity 15*:127-35, (2001); Matsushita et al., *J. Immunol. 168*:3502-3506, (2002)). Cả con đường lectin và con đường cổ điển đều tạo ra C3 convertaza phổ biến (C4b2a) và hai con đường trên hội tụ trong bước này.

Con đường lectin phần nhiều được cho là có vai trò chính trong hàng rào ở vật chủ chống lây nhiễm ở vật chủ chưa qua thí nghiệm. Bằng chứng rõ rệt về sự liên quan của MBL trong hàng rào ở vật chủ thu được từ việc phân tích ở các bệnh nhân có nồng độ MBL chức năng trong huyết thanh giảm đi (Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta 1572*:401-413, (2002)). Các bệnh nhân như vậy biểu hiện sự nhạy cảm đối với sự tái phát các lây nhiễm vi khuẩn và nấm. Các triệu chứng này thường rõ rệt từ sớm trong cuộc sống, trong cửa sổ biểu kiến của tính dễ lây truyền dưới dạng suy yếu độ chuẩn kháng thể thu được từ mẹ, nhưng trước khi phát triển danh mục đầy đủ của đáp ứng kháng thể. Hội chứng này thường là do đột biến ở một vài điểm trong phần chứa colagen của MBL, can thiệp vào sự hình thành chính xác của các oligome MBL. Tuy nhiên, do MBL có thể có hoạt động như opsonin không phụ thuộc vào bổ thể, không biết được tính nhạy cảm đối với lây nhiễm gia tăng đến mức độ nào là do sự hoạt hóa bổ thể suy yếu.

Trái ngược với con đường cổ điển và con đường lectin, không có tác nhân khởi phát nào của con đường nhánh đã được phát hiện ra trước đây là thực hiện các chức năng nhận biết mà C1q và lectin thực hiện trong hai con đường còn lại. Hiện đã được chấp nhận rộng rãi rằng con đường nhánh tự phát trải qua quá trình hoạt hóa luân chuyển ở mức độ thấp, quá trình này có thể dễ dàng được khuếch đại trên bề mặt ngoại lai hoặc các bề mặt bất thường khác (tế bào nhiễm vi khuẩn, nấm men, virut, hoặc mô bị phá hủy) mà thiếu các thành phần phân tử chính xác duy trì sự hoạt hóa bổ thể tự phát đang kiểm tra. Có bốn protein huyết tương liên quan trực tiếp đến sự hoạt hóa của con đường nhánh: C3, yếu tố B và D, và properdin.

Mặc dù có bằng chứng chuyên sâu liên quan đến cả con đường bổ thể cổ điển và con đường bổ thể nhánh trong quá trình sinh bệnh của các bệnh không lây nhiễm ở người, vai trò của con đường lectin chỉ mới bắt đầu được đánh giá. Các nghiên cứu gần đây cung cấp bằng chứng rằng sự hoạt hóa con đường lectin có thể chịu trách nhiệm về sự hoạt hóa bổ thể và sự viêm liên quan trong tổn thương do thiếu máu cục bộ/tổn thương do tái tưới máu. Collard et al. (2000) báo cáo rằng các tế bào nội mô đã được nuôi cấy chịu ứng suất oxy hóa liên kết với MBL và cho thấy C3 kết lắng

khi tiếp xúc với huyết thanh của người (Collard et al., *Am. J. Pathol. 156*:1549-1556, (2000)). Ngoài ra, việc xử lý huyết thanh của người bằng các kháng thể đơn dòng kháng MBL phong bế đã làm ức chế sự liên kết MBL và sự hoạt hóa bổ thể. Các kết quả này được mở rộng ra mô hình chuột cống có chứng thiếu máu cục bộ-tái tưới máu tim phổi trong đó chuột cống được điều trị bằng kháng thể phong bế được định hướng kháng MBL chuột cống cho thấy sự phá hủy tim mạch khi tắc động mạch vành ít đáng kể hơn so với chuột cống được điều trị bằng kháng thể đối chứng (Jordan et al., *Circulation 104*:1413-1418, (2001)). Cơ chế phân tử để liên kết MBL với nội mô mạch sau ứng suất oxy hóa là không rõ ràng; nghiên cứu gần đây gợi ý rằng sự hoạt hóa con đường lectin sau ứng suất oxy hóa có thể được điều tiết bởi sự liên kết MBL với xytokeratin nội mô mạch, và không liên kết với thể tiếp hợp glyco (Collard et al., *Am. J. Pathol. 159*:1045-1054, (2001)). Các nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng con đường cổ điển và con đường nhánh trong quá trình sinh bệnh của tổn thương do thiếu máu cục bộ/tái tưới máu và vai trò của con đường lectin trong bệnh này vẫn còn đang gây tranh cãi (Riedermann, N.C., et al., *Am. J. Pathol. 162*:363-367, 2003).

Các nghiên cứu gần gây đã cho thấy rằng MASP-1 và MASP-3 chuyển hóa yếu tố enzym hoạt hóa con đường nhánh D từ dạng zymogen của nó thành dạng có hoạt tính enzym của nó (xem tài liệu Takahashi M. et al., *J Exp Med* 207(1):29-37 (2010); Iwaki et al., *J. Immunol.* 187:3751-58 (2011)). Tầm quan trọng về mặt sinh lý của quy trình này được nhấn mạnh bởi việc không có hoạt tính chức năng của con đường nhánh trong huyết tương của chuột nhắt thiếu hụt MASP-1/3. Sự hình thành do phân hủy protein của C3b từ C3 tự nhiên là cần phải có để con đường nhánh thực hiện chức năng. Do con đường nhánh C3 convertaza (C3bBb) chứa C3b dưới dạng cấu trúc siêu phân tử thiết yếu, câu hỏi liên quan đến nguồn gốc của C3b thứ nhất thông qua con đường nhánh đã cho thấy một vấn đề khó trả lời và đã khơi ra một nghiên cứu đáng cân nhắc.

C3 thuộc họ protein (cùng với C4 và α-2 macroglobulin) chứa cải biến sau dịch mã hiếm đã được biết là liên kết thioeste. Nhóm thioeste gồm có glutamin có

nhóm carbonyl tận cùng tạo ra liên kết thioeste cộng hóa trị với nhóm sulfhydryl của xystein của ba axit amin. Liên kết này là không ổn định và glutamyl-thioeste ưa điện tử có thể phản ứng với các gốc ưa nhân như nhóm hydroxyl hoặc amino và vì thế tạo ra liên kết cộng hóa trị với các phân tử khác. Liên kết thioeste ổn định một cách hợp lý khi được cô lập bên trong bao kỵ nước của C3 nguyên vẹn. Tuy nhiên, việc phân cắt phân hủy protein của C3 thành C3a và C3b dẫn đến sự tiếp xúc của liên kết thioeste phản ứng ở mức cao trên C3b và, sau đó là sự tấn công ưa nhân bởi các gốc liền kề chứa nhóm hydroxyl hoặc amino, C3b bắt đầu được liên kết cộng hóa trị với đích. Ngoài vai trò đã được ghi chép cẩn thận của nó về sự gắn cộng hóa trị của C3b với các đích bổ thể, C3 thioeste cũng được cho là có vai trò then chốt trong việc khởi phát con đường nhánh. Theo "lý thuyết dè dặt" được chấp nhận rộng rãi, con đường nhánh được khởi phát bằng cách tạo ra convertaza pha lỏng, iC3Bb, được tạo ra từ C3 với thioeste đã thủy phân (iC3; C3(H_2O)) và yếu tố B (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol. 7*:143-162, (1984)). C3(H_2O) giống C3b được tạo ra từ C3 tự nhiên bằng cách thủy phân tự phát thioeste ở mức độ chậm bên trong trong protein (Pangburn, M.K., et al., *J. Exp. Med. 154*:856-867, 1981). Thông qua hoạt tính của C3(H_2O)Bb convertaza, phân tử C3b được kết lắng trên bề mặt đích từ đó khởi phát con đường nhánh.

Trước nghiên cứu hiện tại được mô tả ở đây, biết được rất ít về các tác nhân khởi phát quá trình hoạt hóa con đường nhánh. Các tác nhân hoạt hóa được cho là bao gồm vách tế bào nấm men (zymosan), nhiều polysacarit tinh khiết, hồng cầu của thỏ, một số globulin miễn dịch nhất định, virut, nấm, vi khuẩn, tế bào khối u động vật, ký sinh trùng, và tế bào đã bị phá hủy. Đặc điểm chung duy nhất đối với các tác nhân hoạt hóa này là sự có mặt của hydrat cacbon, nhưng độ phức tạp và đa dạng của cấu trúc hydrat cacbon gây khó khăn cho việc thiết lập các thể quyết định phân tử chia sẻ đã được nhận biết. Đã được chấp nhận rộng rãi rằng sự hoạt hóa con đường nhánh được kiểm soát thông qua sự cân bằng đồng đều giữa các thành phần điều hòa ức chế của con đường này, như yếu tố H, yếu tố I, DAF, và CR1, và properdin,

properdin là tác nhân điều hòa tích cực duy nhất của con đường nhánh (xem tài liệu Schwaeble W.J. and Reid K.B., *Immunol Today* 20(1):17-21 (1999)).

Ngoài cơ chế hoạt hóa không được điều hòa một cách rõ ràng được mô tả trên đây, con đường nhánh cũng có thể tạo ra vòng khuếch đại mạnh cho C3 convertaza (C4b2a) của con đường lectin/con đường cổ điển do C3b bất kỳ tạo thành có thể kết hợp với yếu tố B để tạo ra C3 convertaza (C3bBb) của con đường nhánh bổ sung. C3 convertaza của con đường nhánh được làm ổn định bằng cách liên kết properdin. Properdin kéo dài thời gian bán rã C3 convertaza của con đường nhánh từ sáu đến mười lần. Việc bổ sung C3b vào C3 convertaza của con đường nhánh dẫn đến việc hình thành C5 convertaza của con đường nhánh.

Tất cả ba con đường (tức là, cổ điển, lectin và nhánh) đã được cho rằng hội tụ ở C5, được phân cắt để tạo ra các sản phẩm có nhiều tác dụng tiền viêm. Con đường đã hội tụ được đề cập đến là con đường bổ thể tận cùng. C5a là anaphylatoxin có hoạt lực nhất, cảm ứng sự thay đổi trong cơ trơn và trương lực mạch, cũng như độ thẩm thấu trong mạch. Nó cũng là chemotaxin mạnh và tác nhân hoạt hóa của cả bạch cầu trung tính và bạch cầu đơn nhân. Sự hoạt hóa tế bào qua trung gian C5a có thể khuếch đại đáng kể đáp ứng viêm bằng cách cảm ứng sự giải phóng của các tác nhân điều tiết viêm bổ sung, bao gồm xytokin, enzym thủy phân, chất chuyển hóa axit arachidonic, và các loại oxy phản ứng. Sự phân cắt C5 dẫn đến việc tạo ra C5b-9, còn được biết đến là phức hợp tấn công màng (MAC). Hiện nay có bằng chứng rõ rệt rằng sự kết lắng MAC dưới ngưỡng phân hủy có thể đóng vai trò quan trọng trong tình trạng gây viêm ngoài vai trò của nó dưới dạng phức hợp tạo lỗi phân hủy.

Ngoài vai trò thiết yếu của nó trong hàng rào miễn dịch, hệ thống bổ thể góp phần phá hủy mô ở nhiều tình trạng bệnh lý lâm sàng. Vì thế, có nhu cầu cấp bách về việc phát triển chất ức chế bổ thể có tác dụng trị liệu để ngăn ngừa các tác động có hại này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với miền serin proteaza của MASP-3 của người (các gốc axit amin từ 450 đến 728 của SEQ ID NO:2) với ái lực cao (có K_D thấp hơn 500 pM), trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đặc trưng bởi ít nhất một hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính sau: (a) ức chế sự thành thục của tiền yếu tố D; (b) không liên kết với MASP-1 của người (SEQ ID NO:8); (c) ức chế con đường nhánh ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb) ở đối tượng là động vật có vú (d) không ức chế con đường cổ điển (e) ức chế tình trạng tan máu và/hoặc opsonin hóa; (f) ức chế sự phân cắt đặc hiệu cơ chất MASP-3 serin proteaza; (g) làm giảm sự tan máu hoặc sự giảm phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b; (h) làm giảm sự kết lắng yếu tố B và/hoặc Bb trên bề mặt hoạt hóa; (i) làm giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D; (j) làm giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa; (k) làm giảm việc tạo ra mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng; và/hoặc (l) làm giảm sự kết lắng yếu tố P. Theo một số phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong miền serin proteaza của MASP-3 của người, trong đó epitop này nằm trong ít nhất một hoặc nhiều trong số: VLRSQRRDTTVI (SEQ ID NO:9), TAAHVLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO:11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO:12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO:13), VSNYVDWVWE (SEQ ID NO:14) và/hoặc VLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:15). Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop trong ít nhất một trong số: ECGQPSRSLPSLV (SEQ ID NO:16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO:17); KWFGSGALLSASWIL (SEQ ID

NO:18); EHVTVYLGLH (SEQ ID NO:19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO:20); APHMLGL (SEQ ID NO:21); SDVLQYVKLP (SEQ ID NO:22); và/hoặc AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO:23).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:209 (XXDIN, trong đó X ở vị trí 1 là S hoặc T và trong đó X ở vị trí 2 là N hoặc D); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, trong đó X ở vị trí 7 là G hoặc D; X ở vị trí 8 là S, T hoặc R; X ở vị trí 9 là I hoặc T; X ở vị trí 13 là E hoặc D; X ở vị trí 14 là K hoặc E; và X ở vị trí 16 là T hoặc K); và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:211 (XEDXY, trong đó X ở vị trí 1 là L hoặc V, và trong đó X ở vị trí 4 là T hoặc S); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, trong đó X ở vị trí 8 là N, I, Q hoặc A; trong đó X ở vị trí 9 là S hoặc T; và trong đó X ở vị trí 17 là A hoặc S); LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:144 (WASTRES) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:146 (KQSYNLYT).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:213 (SYGXX, trong đó X ở vị trí 4 là M hoặc I và trong đó X ở vị trí 5 là S hoặc T); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:74; và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:214 (GGXAXDY, trong đó X ở vị trí 3 là E hoặc D và trong đó X ở vị trí 5 là M hoặc L); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:215 (KSSQSLLDSXXKTYLX, trong đó X ở vị trí 10 là D, E hoặc A; trong đó X ở vị trí 11 là G hoặc A; và trong đó X ở vị trí 16 là N hoặc S); LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:155; và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:216 (WQGTHFPXT, trong đó X ở vị trí 8 là W hoặc Y).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến

đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:84 (GKWIE); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) hoặc SEQ ID NO:275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:88 (SEDV); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); hoặc SEQ ID NO:259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:144 (WASTRES); và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:161 (KQSYNIPT).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:91 (GYWIE); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG), và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:95 (SIDY); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:165 (KVSNRFS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:167 (SQSTHVPPT).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:109 (RVHFAIRDTNYWMQ), HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:110 (AIYPGNGDTSYNQKFKG), HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:112 (GSHYFDY); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:182 (RASQSIGTSIH), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:184 (YASESIS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:186 (QQSNSWPYT); hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:125 (DYYMN), HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:127 (DVNPNNDGTTYNQKFKG), HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:129 (CPFYYLGKGTHFDY); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu

trong SEQ ID NO:196 (RASQDISNFLN), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:198 (YTSRLHS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:200 (QQGFTLPWT); hoặc

(c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:137, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:138, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:140; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:206, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:207 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:208: hoặc

(d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:98, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:99, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:101; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:169, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:171 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:173; hoặc

(e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:103, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:105, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:107; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:176, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:193: hoặc

(f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:114, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:116, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:118; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:188, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:190; hoặc

(g) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:114, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:121, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:123; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:191, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:193.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng động vật có vú cần điều trị dùng một lượng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3 với ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó đủ để ức chế sự hoạt hóa con đường bổ thể theo con đường nhánh ở động vật có vú. Theo một phương án của phương pháp này, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với MASP-3 với ái lực thấp hơn 500 pM. Theo một phương án của phương pháp này, do sử dụng chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, một hoặc nhiều hiện tượng sau diễn ra ở đối tượng là động vật có vú: (a) ức chế sự thuần thục của yếu tố D; (b) ức chế con đường nhánh khi được sử dụng cho đối tượng ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb); (c) con đường cổ điển không được ức chế; (d) ức chế tình trạng tan máu và/hoặc opsonin hóa; (e) làm giảm sự tan máu hoặc sự giảm phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b; (f) làm giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa; (g) làm giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D; (h) làm giảm mức yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa; và/hoặc (i) làm giảm việc tạo ra mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng. Theo một phương án của phương pháp này, chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3 mà ức chế con đường nhánh ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 ở đối tượng mắc hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (age-related macular degeneration - AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối, hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh hoặc bệnh Behcet. Phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng này dùng chế phẩm

chứa lượng chất ức chế MASP-3 với ái lực cao hữu hiệu để ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho đối tượng này dùng chế phẩm chứa chất ức chế MASP-2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thuốc để ức chế các tác động của quá trình hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 ở đối tượng sống cần điều trị, bao gồm bước kết hợp lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-3 trong chất mang dược. Theo một số phương án, chất ức chế MASP-3 là kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao. Theo một số phương án, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước sản xuất thuốc để ức chế các tác động của quá trình hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 ở đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối, hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh hoặc bệnh Behcet. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước kết hợp lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 vào hoặc với thuốc chứa chất ức chế MASP-3.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa chất mang sinh lý dụng và kháng thể đơn dòng ức chế MASP-3 với ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh. Theo một phương án, kháng thể MASP-3 có ái lực cao này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm chứa lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ mắc PNH ở đối tượng này. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161. Theo một số phương án, dược phẩm này làm gia tăng khả năng sống của tế bào hồng cầu ở đối tượng mắc PNH. Theo một số phương án, trong đó đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển PNH có một hoặc nhiều triệu chứng được chọn từ nhóm bao gồm (i) dưới nồng độ hemoglobin bình thường, (ii) dưới nồng độ tiểu cầu bình thường; (iii) trên nồng độ hồng cầu lưới bình thường, và (iv) trên nồng độ bilirubin bình thường. Theo một số phương án, dược phẩm này được sử dụng toàn thân (ví dụ, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch hoặc dưới dạng chất xông hít) cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh PNH. Theo một số phương án, đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh PNH trước đó đã trải qua, hoặc hiện đang trải qua quá trình điều trị bằng chất ức chế bổ thể tận cùng mà ức chế sự phân cắt của protein bổ thể C5. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho đối tượng này dùng chất ức chế bổ thể tận cùng ức chế sự phân cắt của protein bổ thể C5. Theo một số phương án, chất ức chế bổ thể tận cùng là kháng thể kháng C5 được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một số phương án, chất ức chế bổ thể tận cùng là eculizumab.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh viêm khớp (bệnh khớp dạng viêm và không

viêm) bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm chứa lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ mắc bệnh viêm khớp ở đối tượng. Theo một phương án, kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i)VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh viêm khớp được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp độ tuổi thanh thiếu niên, viêm cột sống dính khớp, bệnh Behcet, viêm khớp liên quan đến lây nhiễm và viêm khớp vảy nến. Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng toàn thân (tức là, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch hoặc dưới dạng chất xông hít). Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng khu trú vào khớp.

Như được mô tả trong bản mô tả này, các phương án khác nhau của kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao, tùy ý kết hợp với các phương án khác nhau của chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng trong dược phẩm theo sáng chế.

Như được mô tả trong bản mô tả này, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo phương pháp theo sáng chế.

Các khía cạnh và phương án này và khác của sáng chế được mô tả ở đây sẽ rõ ràng khi tham khảo phần mô tả và các hình vẽ dưới đây. Tất cả các patent Mỹ, công bố đơn sáng chế Mỹ, đơn sáng chế Mỹ, các patent nước ngoài, đơn sáng chế nước ngoài và các công bố đơn không phải sáng chế được đề cập đến trong bản mô tả này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn, như là mỗi tài liệu này được kết hợp riêng rẽ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các khía cạnh trên đây và nhiều ưu điểm kèm theo của sáng chế này sẽ trở nên dễ đánh giá hơn cũng như dễ hiểu hơn bằng cách tham khảo phần mô tả chi tiết sau đây, khi kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 minh họa cách hiểu mới về con đường lectin và con đường nhánh;

Fig.2 là sơ đồ đại cương phỏng theo Schwaeble et al., *Immunobiol* 205:455-466 (2002), như được biến đổi bởi Yongqing et al., *BBA* 1824:253 (2012), minh họa miền protein MASP-1, MASP-3 và MAp44và các exon mã hóa các miền này;

Fig.3 thể hiện trình tự axit amin MASP-3 của người (SEQ ID NO:2) với trình tự dẫn hướng được thể hiện dưới dạng gạch chân;

Fig.4 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng của protein MASP-3 chiều dài đầy đủ từ nhiều loài;

Fig.5 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng của miền SP của protein MASP-3 từ nhiều loài;

Fig.6 là biểu đồ Kaplan-Meyer minh họa bằng đồ thị phần trăm sống sót của chuột nhắt MASP-2 KO và WT sau khi dùng liều lây nhiễm 2,6 x 10^7 cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh A Z2491, cho thấy rằng chuột thiếu hụt MASP-2 được bảo vệ để không chết do *N. meningitidis* cảm ứng, như được mô tả trong Ví dụ 1;

Fig.7 là biểu đồ Kaplan-Meyer minh họa bằng đồ thị phần trăm sống sót của chuột nhắt MASP-2 KO và WT sau khi dùng liều lây nhiễm 6 x 10^6 cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58, cho thấy rằng chuột thiếu hụt MASP-2 được bảo vệ để không chết do *N. meningitidis* cảm ứng, như được mô tả trong Ví dụ 1;

Fig.8 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58 trong mỗi mL máu thu hồi được từ chuột nhắt MASP-2 KO và WT ở các thời điểm khác nhau sau khi lây nhiễm i.p. với 6x10^6 cfu của *N. meningitidis*

nhóm huyết thanh B chủng MC58 (n=3 ở các thời điểm khác nhau đối với cả hai nhóm chuột nhắt), cho thấy rằng mặc dù chuột nhắt MASP-2 KO được lây nhiễm với cùng một liều của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58 như chuột nhắt WT, chuột nhắt MASP-2 KO có độ thanh thải nhiễm trùng huyết tăng cường khi so sánh với WT, như được mô tả trong ví dụ 1;

Fig.9 minh họa bằng đồ thị điểm ốm yếu trung bình của chuột nhắt MASP-2 KO và WT ở 3, 6, 12 và 24 giờ sau khi lây nhiễm với $6x10^6$ cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58, cho thấy rằng chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 thể hiện điểm ốm yếu thấp hơn nhiều ở 6 giờ, 12 giờ, và 24 giờ sau khi lây nhiễm, khi so sánh với chuột nhắt WT, như được mô tả trong ví dụ 1;

Fig.10 là biểu đồ Kaplan-Meyer minh họa bằng đồ thị phần trăm sống sót của chuột nhắt sau khi dùng liều lây nhiễm $4x10^6$ cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58, sau đó sử dụng kháng thể ức chế MASP-2 (1 mg/kg) hoặc kháng thể isotyp đối chứng 3 giờ sau lây nhiễm, cho thấy rằng kháng thể MASP-2 là hữu hiệu để điều trị và cải thiện khả năng sống sót ở các đối tượng được lây nhiễm với N. *meningitidis,* như được mô tả trong ví dụ 2;

Fig.11 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL số lượng cá thể sống của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58 được thu hồi ở các thời điểm khác nhau trong các mẫu huyết thanh của người được thể hiện trong bảng 6 được lấy ở các thời điểm khác nhau sau khi ủ với *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58, như được mô tả trong ví dụ 3;

Fig.12 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL số lượng cá thể sống của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B-MC58 được thu hồi ở các thời điểm khác nhau trong các mẫu huyết thanh của người được thể hiện trong bảng 8, cho thấy rằng sự tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *N. meningitidis* ở huyết thanh người 20% (thể tích/thể tích) là phụ thuộc vào MASP-3 và MBL, như được mô tả trong ví dụ 3;

Fig.13 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL số lượng cá thể sống của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B-MC58 được thu hồi ở các thời điểm khác nhau

trong mẫu huyết thanh của chuột nhắt được thể hiện trong bảng 10, cho thấy rằng huyết thanh của chuột nhắt bất hoạt MASP-2 -/- (được đề cập đến là "MASP-2 -/-") có mức hoạt tính diệt khuẩn đối với *N. meningitidis* cao hơn so với huyết thanh của chuột nhắt WT, trong khi đó ngược lại, huyết thanh của chuột nhắt MASP-1/3 -/- không có bất kỳ hoạt tính diệt khuẩn nào, như được mô tả trong ví dụ 3;

Fig.14 minh họa bằng đồ thị động học hoạt hóa C3 trong điều kiện đặc hiệu con đường lectin (huyết tương 1%) trong huyết thanh chuột nhắt WT, C4-/-, MASP-1/3-/-, Yếu tố B-/- và MASP-2-/-, như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.15 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi con đường nhánh (được điều khiển AP) trên đĩa vi chuẩn được phủ zymosan trong điều kiện đặc hiệu con đường nhánh (đặc hiệu AP) "truyền thống" (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) dưới dạng hàm nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ đối tượng người thiếu hụt MASP-3, thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL, như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.16 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa vi chuẩn được phủ zymosan trong điều kiện đặc hiệu AP "truyền thống" (tức là, BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) dưới dạng hàm thời gian trong mẫu huyết thanh của người 10% thu được từ đối tượng người thiếu hụt MASP-3, thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL, như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.17A minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b trên đĩa vi chuẩn được phủ manan dưới dạng hàm nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ chuột nhắt WT, thiếu hụt MASP-2, và thiếu hụt MASP-1/3 trong điều kiện đặc hiệu AP "truyền thống" (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép cả con đường lectin và con đường nhánh (AP) có chức năng (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.17B minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b trên đĩa vi chuẩn được phủ zymosan dưới dạng hàm nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ chuột nhắt WT, thiếu hụt MASP-2, và thiếu hụt MASP-1/3 trong điều

kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép cả con đường lectin và con đường nhánh có chức năng (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.17C minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b trên đĩa vi chuẩn được phủ *S. pneumoniae* D39 dưới dạng hàm nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ chuột nhắt WT, thiếu hụt MASP-2, và thiếu hụt MASP-1/3 trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép cả con đường lectin và con đường nhánh có chức năng (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.18A minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm kết lắng C3b trong huyết thanh được pha loãng ở mức cao được tiến hành trên các đĩa vi chuẩn được phủ manan trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép cả con đường lectin và con đường nhánh có chức năng (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), bằng cách sử dụng nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0% lên đến 1,25%, như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.18B minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm kết lắng C3b được tiến hành trên đĩa vi chuẩn được phủ zymosan trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép cả con đường lectin và con đường nhánh có chức năng (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), bằng cách sử dụng nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0% lên đến 1,25%, như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.18C minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm kết lắng C3b được tiến hành trên đĩa vi chuẩn được phủ *S. pneumoniae* D39 trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép cả con đường lectin và con đường nhánh có chức năng (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), bằng cách sử dụng nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0 % lên đến 1,25%, như được mô tả trong ví dụ 4;

Fig.19 minh họa bằng đồ thị mức độ tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt đã phân hủy (Crry/C3-/-) vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột được phủ manan bằng huyết thanh của người trong các điều kiện sinh lý (tức là, khi có mặt Ca^{++}) trên một khoảng các phần pha loãng huyết thanh trong huyết thanh từ MASP-3-/-, huyết thanh bình thường được bất hoạt bằng nhiệt của người (HI NHS), MBL-/-, kháng thể đơn dòng NHS + MASP-2 và đối chứng NHS, như được mô tả trong ví dụ 5;

Fig.20 minh họa bằng đồ thị mức độ tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt đã phân hủy (Crry/C3-/-) vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột được phủ manan bằng huyết thanh của người trong các điều kiện sinh lý (tức là, khi có mặt Ca^{++}) trên một khoảng nồng độ trong huyết thanh trong huyết thanh từ MASP-3-/-, (HI) NHS được bất hoạt bằng nhiệt, MBL-/-, kháng thể đơn dòng NHS + MASP-2 và đối chứng NHS, như được mô tả trong ví dụ 5;

Fig.21 minh họa bằng đồ thị mức độ tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt WT đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột không được phủ bằng huyết thanh của người trong các điều kiện sinh lý (tức là, khi có mặt Ca^{++}) trên một khoảng nồng độ trong huyết thanh trong huyết thanh từ 3MC (MASP-3-/-), (HI) NHS được bất hoạt bằng nhiệt, MBL-/-, kháng thể đơn dòng NHS + MASP-2 và đối chứng NHS, như được mô tả trong ví dụ 5;

Fig.22 minh họa bằng đồ thị sự tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt đã phân hủy (CD55/59-/-) vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột không được phủ bằng huyết thanh của người trong các điều kiện sinh lý (tức là, khi có mặt Ca^{++}) trên một khoảng các nồng độ trong huyết thanh trong huyết thanh từ (HI) NHS được bất hoạt bằng nhiệt, MBL-/-, kháng thể đơn dòng NHS + MASP-2 và đối chứng NHS, như được mô tả trong ví dụ 5;

Fig.23 minh họa bằng đồ thị sự tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu thỏ đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu thỏ được phủ manan bằng huyết thanh chuột nhắt MASP-1/3-/- và huyết thanh chuột nhắt đối chứng WT trong các điều kiện sinh lý (tức là, khi có mặt Ca^{++}) trên một khoảng các nồng độ trong huyết thanh, như được mô tả trong ví dụ 6;

Fig.24A là biểu đồ FACS về sự liên kết kháng nguyên/kháng thể MASP-3 đối với dòng vô tính M3J5, như được mô tả trong ví dụ 7;

Fig.24B là biểu đồ FACS về sự liên kết kháng nguyên/kháng thể MASP-3 đối với dòng vô tính M3M1, như được mô tả trong ví dụ 7;

Fig.25 minh họa bằng đồ thị đường cong liên kết bão hòa của dòng vô tính M3J5 (Dòng vô tính 5) đối với kháng nguyên MASP-3, như được mô tả trong ví dụ 7;

Fig.26A là quá trình sắp xếp thẳng hàng trình tự axit amin của vùng VH của M3J5, M3M1, D14 và 1E10 với trình tự DT40 VH của gà, trong đó các dấu chấm là độ đồng nhất axit amin với trình tự DT40 và các đường gạch ngang chỉ các khoảng trống được đưa vào để tối đa hóa sự sắp xếp thẳng hàng, như được mô tả trong ví dụ 7;

Fig.26B là quá trình sắp xếp thẳng hàng trình tự axit amin của vùng VL của M3J5, M3M1, D14 và 1E10 với trình tự DT40 VL của gà, trong đó các dấu chấm là độ đồng nhất axit amin với trình tự DT40 và các đường gạch ngang chỉ các khoảng trống được đưa vào để tối đa hóa sự sắp xếp thẳng hàng, như được mô tả trong ví dụ 7;

Fig.27 là biểu đồ cột thể hiện hoạt tính ức chế của kháng thể đơn dòng (mAb) 1E10 trong con đường MBL, sàng lọc hệ thống bổ thể Wieslab so với huyết thanh dương tính được cung cấp với kit thử nghiệm, cũng như kháng thể đối chứng isotyp, cho thấy rằng mAb1E10 ức chế một phần sự hoạt hóa phụ thuộc vào LEA-2, (thông

qua việc ức chế sự hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-1 của MASP-2), trong khi đó kháng thể đối chứng isotyp không như vậy, như được mô tả trong ví dụ 7;

Fig.28A cung cấp các kết quả của phân tích đếm tế bào theo dòng chảy để kết lắng C3b trên *Staphylococcus aureus* được tiêu diệt bằng nhiệt, cho thấy rằng trong huyết thanh bình thường của người khi có mặt EDTA, đã được biết là làm bất hoạt con đường lectin và con đường nhánh, không quan sát thấy sự kết lắng C3b nào (ô 1), trong huyết thanh bình thường của người được điều trị bằng Mg^{++}/EGTA, sự kết lắng C3b được điều khiển bởi con đường nhánh được quan sát thấy (ô 2), và như được thể hiện trong các ô 3, 4 và 5, trong huyết thanh đã rút cạn yếu tố B, đã rút cạn yếu tố D và đã rút cạn properdin (yếu tố P), một cách tương ứng, không quan sát thấy sự kết lắng C3b được điều khiển bởi con đường nhánh nào, như được mô tả trong ví dụ 8;

Fig.28B cung cấp các kết quả của phân tích đếm tế bào theo dòng chảy để kết lắng C3b trên *S. aureus* được tiêu diệt bằng nhiệt, cho thấy rằng, như trong huyết thanh bình thường được xử lý bằng EDTA (ô 1), không có sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trong huyết thanh 3MC khi có mặt Mg^{++}/EGTA (ô 3), trong khi đó các ô 4 và 5 cho thấy rằng rMASP-3 chiều dài đầy đủ có hoạt tính (ô 4) và rMASP-3 có hoạt tính (CCP1-CCP2-SP) (ô 5) đều khôi phục sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trong huyết thanh 3MC đến mức độ được quan sát thấy trong huyết thanh bình thường được xử lý bằng Mg^{++}/EGTA (ô 2), cả rMASP-3 bất hoạt (S679A) (ô 6) lẫn rMASP-1 loại dại (ô 7) đều không thể khôi phục sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trong huyết thanh 3MC, như được mô tả trong ví dụ 8;

Fig.29 thể hiện các kết quả của phân tích thẩm tách Tây để xác định sự phân cắt yếu tố B đáp ứng với *S. aureus* trong huyết thanh 3MC khi có hoặc không có mặt rMASP-3, cho thấy rằng huyết thanh bình thường của người khi có mặt EDTA (đối chứng âm, làn 1) thể hiện sự phân cắt yếu tố B rất ít so với huyết thanh bình thường của người khi có mặt Mg^{++}/EGTA, được thể hiện trong làn 2 (đối chứng dương), như cũng được thể hiện trong làn 3, huyết thanh 3MC thể hiện sự phân cắt yếu tố B rất ít khi có mặt Mg^{++}/EGTA. Tuy nhiên, như được thể hiện trong làn 4, sự phân cắt yếu

tố B được khôi phục bằng cách bổ sung và ủ sơ bộ protein MASP-3 tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ với huyết thanh 3MC, như được mô tả trong ví dụ 8;

Fig.30 thể hiện quá trình nhuộm Comassie của protein gel trong đó sự phân cắt yếu tố B được phân tích, cho thấy rằng sự phân cắt yếu tố B là tối ưu nhất khi có mặt C3, MASP-3 và tiền yếu tố D (làn 1), và như được thể hiện trong các làn 4 và 5, một mình MASP-3 hoặc tiền yếu tố D có thể điều tiết sự phân cắt yếu tố B, miễn là C3 có mặt, như được mô tả trong ví dụ 8;

Fig.31 minh họa bằng đồ thị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) khi nhuộm C3b của *S. aureus* thu được từ mAbD14 (liên kết MASP-3), mAb1A5 (kháng thể đối chứng âm) và kháng thể đối chứng isotyp được vẽ đồ thị dưới dạng hàm nồng độ mAb trong huyết thanh 3MC khi có mặt rMASP-3, cho thấy rằng mAbD14 ức chế sự kết lắng C3b phụ thuộc vào MASP-3 theo cách phụ thuộc vào nồng độ, như được mô tả trong ví dụ 8;

Fig.32 thể hiện phân tích thẩm tách Tây về sự phân cắt cơ chất tiền yếu tố D, trong đó so với một mình tiền yếu tố D (làn 1) hoặc MASP-3 tái tổ hợp bất hoạt có chiều dài đầy đủ (S679A; làn 3) hoặc MASP-1 (S646A; làn 4), thì MASP-3 tái tổ hợp loại dại có chiều dài đầy đủ (làn 2) và MASP-1 (làn 5) phân cắt một cách hoàn toàn hoặc một phần tiền yếu tố D để tạo ra yếu tố D thuần thục, như được mô tả trong ví dụ 9;

Fig.33 là thẩm tách Tây thể hiện hoạt tính ức chế của mAb liên kết MASP-3 D14 (làn 2) và M3M1 (làn 3) đến sự phân cắt tiền yếu tố D phụ thuộc vào MASP-3 so với phản ứng đối chứng chỉ chứa MASP-3 và tiền yếu tố D (không mAb, làn 1), cũng như phản ứng đối chứng chứa mAb thu được từ thư viện DTLacO liên kết MASP-1, nhưng không liên kết MASP-3 (làn 4), như được mô tả trong ví dụ 9;

Fig.34 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa vi chuẩn được phủ zymosan dưới dạng hàm nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ đối tượng thiếu hụt MASP-3 (3MC), thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL, cho thấy rằng huyết thanh thiếu hụt MASP-3 từ bệnh nhân 2 và

bệnh nhân 3 có hoạt tính AP dư ở các nồng độ trong huyết thanh cao (nồng độ trong huyết thanh 25%, 12,5%, 6,25%), nhưng AP_{50} cao hơn đáng kể (tức là, huyết thanh 8,2% và 12,3% cần để đạt 50% mức kết lắng C3 tối đa), như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.35A minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa vi chuẩn được phủ zymosan trong điều kiện đặc hiệu AP "truyền thống" (tức là, BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) dưới dạng hàm thời gian trong mẫu huyết thanh của người 10% thu được từ đối tượng người thiếu hụt MASP-3, thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL, như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.35B thể hiện thẩm tách Tây với huyết tương thu được từ bệnh nhân 3MC #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)), bệnh nhân 3MC #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)), và huyết thanh từ các đối tượng cho bình thường (W), trong đó tiền yếu tố D của người (25040 Da) và/hoặc yếu tố D thuần thục (24405 Da) được phát hiện ra với kháng thể đặc hiệu yếu tố D của người, như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.35C minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm con đường lectin và con đường nhánh cổ điển Weislab với huyết tương thu được từ bệnh nhân 3MC #2, bệnh nhân 3MC #3, và huyết thanh bình thường của người, như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.36 minh họa bằng đồ thị phần trăm tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu thỏ đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu thỏ được phủ manan trên một khoảng các nồng độ trong huyết thanh trong huyết thanh từ hai đối tượng người bình thường (Normal Human subject-NHS) và từ hai bệnh nhân 3MC (Bệnh nhân 2 và bệnh nhân 3), được đo khi không có Ca^{++}, cho thấy rằng sự thiếu hụt MASP-3 làm giảm phần trăm làm phân hủy qua trung gian bổ thể của hồng cầu được phủ manan khi so sánh với huyết thanh bình thường của người, như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.37 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa vi chuẩn được phủ zymosan dưới dạng hàm nồng độ protein MASP-3 tái tổ

hợp có chiều dài đầy đủ được bổ sung vào các mẫu huyết thanh thu được từ người bệnh 3MC 2 (MASP-$3^{-/-}$), cho thấy rằng, so với đối chứng âm MASP-3 tái tổ hợp bất hoạt (MASP-3A; S679A), protein MASP-3 tái tổ hợp có hoạt tính khôi phục lại sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa được phủ zymosan theo cách phụ thuộc vào nồng độ, như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.38 minh họa bằng đồ thị phần trăm tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu thỏ đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu thỏ được phủ manan trên một khoảng các nồng độ trong huyết thanh trong (1) huyết thanh bình thường của người (NHS); (2) huyết thanh của bệnh nhân 3MC; (3) huyết thanh của bệnh nhân 3MC cộng với MASP-3 có hoạt tính tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ (20 µg/ml); và (4) huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt (HIS), được đo khi không có Ca^{++}, cho thấy rằng phần trăm phân hủy của hồng cầu thỏ được tăng lên đáng kể trong huyết thanh 3MC chứa rMASP-3 khi so sánh với phần trăm phân hủy trong huyết thanh 3MC mà không có MASP-3 tái tổ hợp (p=0,0006), như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.39 minh họa bằng đồ thị phần trăm phân hủy hồng cầu thỏ trong huyết thanh của người 7% từ bệnh nhân 3MC 2 và từ bệnh nhân 3MC 3 chứa MASP-3 tái tổ hợp có hoạt tính ở khoảng nồng độ từ 0 đến 110 µg/ml (trong BBS/ Mg^{++}/EGTA, cho thấy rằng phần trăm phân hủy hồng cầu thỏ tăng cùng với lượng MASP-3 tái tổ hợp theo cách phụ thuộc vào nồng độ, như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.40 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi LEA trên đĩa ELISA được phủ manan dưới dạng hàm nồng độ huyết thanh của người được pha loãng trong chất đệm BBS, đối với huyết thanh từ đối tượng người bình thường (NHS), từ hai bệnh nhân 3MC (Bệnh nhân 2 và bệnh nhân 3), từ bố mẹ của bệnh nhân 3 và từ đối tượng thiếu hụt MBL, như được mô tả trong ví dụ 10;

Fig.41 minh họa bằng đồ thị một ví dụ tiêu biểu về thử nghiệm liên kết được thực hiện với MASP-3 của người trong đó M3-1 Fab (còn được đề cập đến là 13B1)

thể hiện ái lực liên kết biểu kiến (EC_{50}) bằng khoảng 0,117 nM với protein của người, như được mô tả trong ví dụ 11;

Fig.42 minh họa bằng đồ thị một ví dụ tiêu biểu về thử nghiệm liên kết được thực hiện với MASP-3 của chuột nhắt trong đó M3-1 Fab (còn được đề cập đến là 13B1) thể hiện ái lực liên kết biểu kiến (EC_{50}) bằng khoảng 0,214 nM với protein của chuột nhắt, như được mô tả trong ví dụ 11;

Fig.43 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng yếu tố Bb bổ sung trên các hạt zymosan (được xác định bằng kỹ thuật dò đếm tế bào được đo theo đơn vị MFI) khi có mặt các nồng độ khác nhau của mAb M3-1 (còn được đề cập đến là 13B1) trong huyết thanh của người đã cạn CFD, như được mô tả trong ví dụ 11;

Fig.44 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3 trên các hạt zymosan ở các thời điểm khác nhau sau một liều đơn lẻ của mAb M3-1 (13B1) (10 mg/kg i.v.) ở chuột nhắt loại dại, như được mô tả trong ví dụ 11;

Fig.45 minh họa bằng đồ thị phần trăm sống sót của RBC cho (WT hoặc Crry-) trong giai đoạn 14 ngày ở chuột nhắt nhận loại dại được điều trị bằng mAb M3-1 (13B1) (10 mg/kg vào ngày -11, 04, -1 và +6), được điều trị bằng mAb BB5.1, hoặc chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc, như được mô tả trong ví dụ 12;

Fig.46 minh họa bằng đồ thị phần trăm sống sót của RBC cho (WT hoặc Crry-) trong giai đoạn 16 ngày ở chuột nhắt loại dại được điều trị bằng một liều đơn lẻ của mAb M3-1 (13B1) (20 mg/kg vào ngày -6) hoặc chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc, như được mô tả trong ví dụ 12;

Fig.47 minh họa bằng đồ thị điểm số lâm sàng của chuột nhắt được điều trị bằng mAb M3-1 (13B1) (5 mg/kg hoặc 20 mg/kg) hoặc chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc trong chu trình thời gian 14 ngày trong mô hình viêm khớp được cảm ứng bằng kháng thể-colagen, như được mô tả trong ví dụ 13;

Fig.48 minh họa bằng đồ thị phần trăm mắc bệnh viêm khớp ở chuột nhắt được điều trị bằng mAb M3-1 (13B1) (5 mg/kg hoặc 20 mg/kg) hoặc chuột nhắt được

điều trị bằng chất dẫn thuốc trong chu trình thời gian 14 ngày trong mô hình viêm khớp được cảm ứng bằng kháng thể-colagen, như được mô tả trong ví dụ 13;

Fig.49A thể hiện trình tự axit amin của vùng VH của mAb ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao (≤500 pM), như được mô tả trong ví dụ 15;

Fig.49B thể hiện trình tự axit amin của vùng VL của mAb ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao (≤500 pM), như được mô tả trong ví dụ 15;

Fig.50A là thụ đồ của vùng VH của mAb ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao, như được mô tả trong ví dụ 15;

Fig.50B là thụ đồ của vùng VL của mAb ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao, như được mô tả trong ví dụ 15;

Fig.51A minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm liên kết trong đó kháng thể tiêu biểu ức chế tái tổ hợp và đã được tinh chế kháng MASP-3 của người thể hiện ái lực liên kết biểu kiến thấp hơn 500 pM (ví dụ, từ 240 pM đến 23 pM) với protein MASP-3 của người, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.51B minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm liên kết trong đó kháng thể tiêu biểu ức chế tái tổ hợp và đã được tinh chế kháng MASP-3 của người thể hiện ái lực liên kết biểu kiến thấp hơn 500 pM (ví dụ, từ 91 pM đến 58 pM) với protein MASP-3 của người, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.51C minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm liên kết trong đó kháng thể ức chế tiêu biểu tái tổ hợp và đã được tinh chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao được thể hiện là có chọn lọc trong việc liên kết với MASP-3 và không liên kết với MASP-1 của người, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.51D minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm liên kết trong đó kháng thể ức chế tiêu biểu tái tổ hợp và đã được tinh chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao được thể hiện là có chọn lọc trong việc liên kết với MASP-3 và không liên kết với MASP-2 của người, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.52 minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm liên kết trong đó kháng thể tiêu biểu ức chế tái tổ hợp và đã được tinh chế kháng MASP-3 của người cũng thể hiện ái lực liên kết cao với protein MASP-3 của chuột nhắt, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.53 minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm xác định khả năng của kháng thể MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu trong việc ức chế sự phân cắt tripeptit sinh huỳnh quang, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.54 thể hiện thẩm tách Tây cho thấy khả năng của mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu trong việc ngăn chặn sự phân cắt qua trung gian MASP-3 tái tổ hợp của tiền yếu tố D thành yếu tố D trong thử nghiệm *in vitro*, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.55A minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng yếu tố Bb bổ sung trên các hạt zymosan (được xác định bằng kỹ thuật dò đếm tế bào theo dòng chảy được đo theo đơn vị MFI) khi có mặt các nồng độ khác nhau của MASP-3 mAb có ái lực cao 1F3, 1G4, 2D7 và 4B6 trong huyết thanh của người đã rút cạn yếu tố D, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.55B minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng yếu tố Bb bổ sung trên các hạt zymosan (được xác định bằng kỹ thuật dò đếm tế bào theo dòng chảy được đo theo đơn vị MFI) khi có mặt các nồng độ khác nhau của MASP-3 mAb có ái lực cao 4D5, 10D12 và 13B1 trong huyết thanh của người đã rút cạn yếu tố D, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.56A minh họa bằng đồ thị mức độ ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ khi có mặt các nồng độ khác nhau của MASP-3 mAb có ái lực cao 1A10, 1F3, 4B6, 4D5 và 2F2 như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.56B minh họa bằng đồ thị mức độ ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ khi có mặt các nồng độ khác nhau của MASP-3 mAb có ái lực cao 1B11, 1E7, 1G4, 2D7 và 2F5 như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.57 thể hiện thẩm tách Tây phân tích nồng độ của tiền yếu tố D) và yếu tố D trong huyết thanh của bệnh nhân 3MC (Bệnh nhân B) khi có mặt MASP-3 tái tổ hợp có hoạt tính (rMASP-3), rMASP-3 bất hoạt, và rMASP-3 có hoạt tính cộng thêm MASP-3 mAb có ái lực cao 4D5, như được mô tả trong ví dụ 16;

Fig.58 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3/C3b/iC3b trên các hạt zymosan ở các thời điểm khác nhau sau một liều đơn lẻ của MASP-3 mAb có ái lực cao M3-1 (13B1, 10 mg/kg) hoặc 10D12 (10 mg/kg) ở chuột nhắt loại dại, như được mô tả trong ví dụ 17;

Fig.59 thể hiện thẩm tách Tây phân tích trạng thái của mảnh yếu tố Ba của yếu tố B ở chuột nhắt được điều trị bằng MASP-3 mAb có ái lực cao 10D12 (10mg/kg) hoặc chuột nhắt được điều trị bằng đối chứng dẫn thuốc, như được mô tả trong ví dụ 17;

Fig.60 minh họa bằng đồ thị mức độ ức chế tình trạng tan máu 20% huyết thanh từ chuột nhắt được điều trị bằng MASP-3 mAb có ái lực cao 10D12 (10 mg/kg hoặc 25 mg/kg), như được mô tả trong ví dụ 17;

Fig.61A minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết MASP-3 mAb có ái lực cao ngăn chặn sự tương tác giữa MASP-3 mAb có ái lực cao 4D5 và MASP-3 của người, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.61B minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết MASP-3 mAb có ái lực cao ngăn chặn sự tương tác giữa MASP-3 mAb có ái lực cao 10D12 và MASP-3 của người, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.61C minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết MASP-3 mAb có ái lực cao ngăn chặn sự tương tác giữa MASP-3 mAb có ái lực cao 13B1 và MASP-3 của người, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.61D minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết MASP-3 mAb có ái lực cao ngăn chặn sự tương tác giữa MASP-3 mAb có ái lực cao 1F3 và MASP-3 của người, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.61E minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết MASP-3 mAb có ái lực cao ngăn chặn sự tương tác giữa MASP-3 mAb có ái lực cao 1G4 và MASP-3 của người, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.62 cung cấp sơ đồ đại cương thể hiện các vùng tiếp xúc trên MASP-3 của người bằng MASP-3 mAb có ái lực cao, như được xác định bằng phân tích Pepscan, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.63A thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và MASP-3 mAb có ái lực cao 1F3, 4D5 và 1A10, bao gồm các gốc axit amin từ 498 đến 509 (SEQ ID NO:9), các gốc axit amin từ 544 đến 558 (SEQ ID NO:11), các gốc axit amin từ 639 đến 649 (SEQ ID NO:13) và các gốc axit amin từ 704 đến 713 (SEQ ID NO:14) của MASP-3, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.63B thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và MASP-3 mAb có ái lực cao 10D12, bao gồm các gốc axit amin từ 498 đến 509 (SEQ ID NO:9) của MASP-3, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.64 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và MASP-3 mAb có ái lực cao 13B1, bao gồm các gốc axit amin từ 494 đến 508 (SEQ ID NO:10) và các gốc axit amin từ 626 đến 638 (SEQ ID NO: 12) của MASP-3, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.65 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và MASP-3 mAb có ái lực cao 1B11, bao gồm các gốc axit amin từ 435 đến 447 (SEQ ID NO:16), các gốc axit amin từ 454 đến 464 (SEQ ID NO:17), các gốc axit amin từ 583 đến 589 (SEQ ID NO:21) và các gốc axit amin từ 614 đến 623 (SEQ ID NO:22) của MASP-3, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.66 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và MASP-3 mAb có ái lực cao 1E7, 1G4 và 2D7, bao gồm các gốc axit amin từ 454 đến 464 (SEQ ID NO:17), các gốc axit amin từ 514 đến 523 (SEQ ID NO:19) và các gốc axit amin từ 667 đến 678 (SEQ ID NO:23) của MASP-3, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.67 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và MASP-3 mAb có ái lực cao 15D9 và 2F5, bao gồm các gốc axit amin từ 454 đến 464 (SEQ ID NO:17), các gốc axit amin từ 479 đến 493 (SEQ ID NO:18), các gốc axit amin từ 562 đến 571 (SEQ ID NO:20), và các gốc axit amin từ 667 đến 678 (SEQ ID NO:23) của MASP-3, như được mô tả trong ví dụ 18;

Fig.68 minh họa bằng đồ thị các kết quả của mô hình thử nghiệm mắc bệnh viêm não tủy tự miễn ở chuột nhắt được điều trị bằng mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao 13B1 (10 mg/kg), mAB yếu tố B 1379 (30 mg/kg) hoặc mAb đối chứng isotyp (10 mg/kg), như được mô tả trong ví dụ 20;

Fig.69 minh họa bằng đồ thị hoạt tính APC, như được xác định bằng MFI trung bình trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy phát hiện yếu tố Bb bổ sung trên bề mặt của các hạt zymosan, trong các mẫu huyết thanh thu được từ nhóm gồm ba con khỉ đuôi dài theo thời gian sau khi điều trị bằng MASP-3 mAb có ái lực cao h13B1X, khi có hoặc không có mặt kháng thể kháng yếu tố D được pha vào mẫu huyết thanh, như được mô tả trong ví dụ 21;

Fig.70 minh họa bằng đồ thị hoạt tính APC, như được xác định bằng sự kết lắng Bb trên zymosan, trong các mẫu huyết thanh thu được từ nhóm gồm các con khỉ đuôi dài (3 con mỗi nhóm) được điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao h4D5X, h10D12X hoặc h13B1X, như được mô tả trong ví dụ 21;

Fig.71A minh họa bằng đồ thị hoạt tính APC, như được xác định bằng Ba pha lỏng trong các mẫu huyết thanh thu được từ nhóm gồm các con khỉ đuôi dài (3 con mỗi nhóm) theo thời gian sau khi điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg của mAb h4D5X, h10D12X, và h13B1X, như được mô tả trong ví dụ 21;

Fig.71B minh họa bằng đồ thị hoạt tính APC, như được xác định bằng Bb pha lỏng trong các mẫu huyết thanh thu được từ nhóm gồm các con khỉ đuôi dài (3 con mỗi nhóm) theo thời gian sau khi điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg mAb h4D5X, h10D12X, và h13B1X, như được mô tả trong ví dụ 21;

Fig.71C minh họa bằng đồ thị hoạt tính APC, như được xác định bằng C3a pha lỏng trong các mẫu huyết thanh thu được từ nhóm gồm các con khỉ đuôi dài (3 con mỗi nhóm) theo thời gian sau khi điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg mAb h4D5X, h10D12X, và h13B1X, như được mô tả trong ví dụ 21;

Fig.72A minh họa bằng đồ thị tỷ lệ mol của đích (MASP-3) với kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao h4D5X ở các thời điểm ức chế APC hoàn toàn, như được đo bằng Ba pha lỏng, như được mô tả trong ví dụ 21;

Fig.72B minh họa bằng đồ thị tỷ lệ mol của đích (MASP-3) với kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao h10D12X ở các thời điểm ức chế APC hoàn toàn, như được đo bằng Ba pha lỏng, như được mô tả trong ví dụ 21;

Fig.72C minh họa bằng đồ thị tỷ lệ mol của đích (MASP-3) với kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao h13B1X ở các thời điểm ức chế APC hoàn toàn, như được đo bằng Ba pha lỏng, như được mô tả trong ví dụ 21; và

Fig.73 thể hiện thẩm tách Tây phân tích nồng độ của tiền yếu tố D và yếu tố D trong huyết thanh từ khỉ đuôi dài theo thời gian (giờ) sau khi điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg mAb h13B1X, như được mô tả trong ví dụ 21.

Mô tả danh mục trình tự

SEQ ID NO:1 cADN MASP-3 của người

SEQ ID NO:2 protein MASP-3 của người (có gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:3 protein MASP-3 của chuột nhắt (có gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:4 protein MASP-3 của chuột cống

SEQ ID NO:5 protein MASP-3 của gà

SEQ ID NO:6 protein MASP-3 của thỏ

SEQ ID NO:7 protein MASP-3 của khỉ đuôi dài

SEQ ID NO:8 protein MASP-1 của người (có gen dẫn hướng)

Các mảnh peptit của miền SP MASP-3 của người:

SEQ ID NO:9 (aa 498-509 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:10 (aa 494-508 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:11 (aa 544-558 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:12 (aa 626-638 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:13 (aa 639-649 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:14 (aa 704-713 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:15 (aa 498-508 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:16 (aa 435-447 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:17 (aa 454-464 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:18 (aa 479-493 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:19 (aa 514-523 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:20 (aa 562-571 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:21 (aa 583-589 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:22 (aa 614-623 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:23 (aa 667-678 của MASP-3 của người có/gen dẫn hướng)

SEQ ID NO:24-39: Vùng biến đổi chuỗi nặng- chuột nhắt bố mẹ

SEQ ID NO:24 4D5_VH

SEQ ID NO:25 1F3_VH

SEQ ID NO:26 4B6_VH

SEQ ID NO:27 1A10_VH

SEQ ID NO:28 10D12_VH

SEQ ID NO:29 35C1_VH

SEQ ID NO:30 13B1_VH

SEQ ID NO:31 1G4_VH

SEQ ID NO:32 1E7_VH

SEQ ID NO:33 2D7_VH

SEQ ID NO:34 49C11_VH

SEQ ID NO:35 15D9_VH

SEQ ID NO:36 2F5_VH

SEQ ID NO:37 1B11_VH

SEQ ID NO:38 2F2_VH

SEQ ID NO:39 11B6_VH

SEQ ID NO:40-54: Vùng biến đổi chuỗi nhẹ- chuột nhắt bố mẹ

SEQ ID NO:40 4D5_VL

SEQ ID NO:41 1F3_VL

SEQ ID NO:42 4B6/1A10_VL

SEQ ID NO:43 10D12_VL

SEQ ID NO:44 35C1_VL

SEQ ID NO:45 13B1_VL

SEQ ID NO:46 1G4_VL

SEQ ID NO:47 1E7_VL

SEQ ID NO:48 2D7_VL

SEQ ID NO:49 49C11_VL

SEQ ID NO:50 15D9_VL

SEQ ID NO:51 2F5_VL

SEQ ID NO:52 1B11_VL

SEQ ID NO:53 2F2_VL

SEQ ID NO:54 11B6_VL

SEQ ID NO:55-140: vùng khung (FR) và vùng quyết định tính bổ sung (CDR) của chuỗi nặng từ MASP-3 mAb của chuột nhắt bố mẹ

SEQ ID NO:141-208: FR và CDR của chuỗi nhẹ từ MASP-3 mAb của chuột nhắt bố mẹ

SEQ ID NO:209-216: trình tự liên ứng CDR

SEQ ID NO:217-232: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng (chuột nhắt bố mẹ)

SEQ ID NO:233-247: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (chuột nhắt bố mẹ)

SEQ ID NO:248: vùng biến đổi chuỗi nặng 4D5_VH-14 (h4D5_VH-14) được làm giống như của người

SEQ ID NO:249: vùng biến đổi chuỗi nặng 4D5_VH-19 (h4D5_VH-19) được làm giống như của người

SEQ ID NO:250: vùng biến đổi chuỗi nhẹ 4D5_VL-1 (h4D5_VL-1) được làm giống như của người

SEQ ID NO:251: vùng biến đổi chuỗi nặng 10D12_VH-45 (h10D12_VH-45) được làm giống như của người

SEQ ID NO:252: vùng biến đổi chuỗi nặng 10D12_VH-49 (h10D12_VH-49) được làm giống như của người

SEQ ID NO:253: vùng biến đổi chuỗi nhẹ 10D12_VL-21 (h10D12-VL-21) được làm giống như của người

SEQ ID NO:254: vùng biến đổi chuỗi nặng 13B1_VH-9 (h13B1-VH-9) được làm giống như của người

SEQ ID NO:255: vùng biến đổi chuỗi nặng 13B1_VH-10 (h13B1-VH-10) được làm giống như của người

SEQ ID NO:256: vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13B1-VL-1 (h13B1-VL-1) được làm giống như của người

SEQ ID NO:257: 4D5 và 13B1 LC-CDR1-NQ

SEQ ID NO:258: 4D5 và 13B1 LC-CDR1-NA

SEQ ID NO:259: 4D5 và 13B1 LC-CDR1-ST

SEQ ID NO:260: LC-CDR1 liên ứng đối với 4D5, 13B1 bố mẹ và các biến thể

SEQ ID NO:261: 10D12 LC-CDR1-DE

SEQ ID NO:262: 10D12 LC-CDR1-DA

SEQ ID NO:263: 10D12 LC-CDR1-GA

SEQ ID NO:264-277: HC FR và CDR đối với 4D5, 10D12 và 13B1 được làm giống như của người

SEQ ID NO:278: h4D5_VL-1-NA

SEQ ID NO:279: h10D12_VL-21-GA

SEQ ID NO:280: h13B1_VL-1-NA

SEQ ID NO:281-287 LC FR và CDR đối với 4D5, 10D12 và 13B1 được làm giống như của người

SEQ ID NO:288-293: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 4D5, 10D12, 13B1 được làm giống như của người và các biến thể

SEQ ID NO:294-299: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 4D5, 10D12, 13B1 được làm giống như của người và các biến thể

SEQ ID NO:300: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) DTLacO bố mẹ

SEQ ID NO:301: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) dòng vô tính M3J5 đặc hiệu MASP-3

SEQ ID NO:302: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của dòng vô tính M3M1 đặc hiệu MASP-3

SEQ ID NO:303: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) DTLacO bố mẹ

SEQ ID NO:304: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) dòng vô tính M3J5 đặc hiệu MASP-3

SEQ ID NO:305: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) dòng vô tính M3M1 đặc hiệu MASP-3

SEQ ID NO:306: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) MASP-3 dòng vô tính D14

SEQ ID NO:307: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) MASP-3 dòng vô tính D14

SEQ ID NO:308: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) MASP-1 dòng vô tính 1E10

SEQ ID NO:309: polypeptit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) MASP-1 dòng vô tính 1E10

SEQ ID NO:310: vùng hằng định IgG4 của người

SEQ ID NO:311: vùng hằng định IgG4 của người có đột biến S228P

SEQ ID NO:312: vùng hằng định IgG4 của người có đột biến S228P_X

SEQ ID NO:313: vùng hằng định IgK của người

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa một cách cụ thể ở đây, tất cả các thuật ngữ được sử dụng ở đây có nghĩa giống như sẽ được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực của sáng chế. Các định nghĩa sau được nêu để nhằm làm rõ các thuật ngữ khi chúng được sử dụng trong bản mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ để mô tả sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, nhánh tác động con đường lectin 1 ("LEA-1") dùng để chỉ sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và yếu tố D bởi MASP-3.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, nhánh tác động con đường lectin 2 ("LEA-2") dùng để chỉ sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-2.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3" bao gồm hai yếu tố: (i) sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin MASP-3 của yếu tố B và yếu tố D, được bao hàm trong sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian LEA-1, xảy ra khi có mặt Ca^{++}, thường dẫn đến sự chuyển hóa C3bB thành C3bBb và tiền yếu tố D thành yếu tố D; và (ii) sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và yếu tố D, có thể xảy ra khi không có Ca^{++}, thường dẫn đến sự chuyển hóa C3bB thành C3bBb và tiền yếu tố D thành yếu tố D. Sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian LEA-1 và sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và yếu tố D đã được xác định là gây ra sự opsonin hóa và/hoặc phân hủy. Trong khi không muốn bị hạn chế bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, được tin rằng chỉ khi nhiều phân tử C3b kết hợp và liên kết trong khu vực lân cận gần, thì C3bBb C3 convertaza mới thay đổi độ đặc hiệu cơ chất của nó và phân cắt C5 dưới dạng C5 convertaza của con đường nhánh gọi là C3bBb(C3b)n.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-2", còn được đề cập đến trong bản mô tả là sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian LEA-2, bao gồm sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin MASP-2, diễn ra khi có mặt Ca^{++}, dẫn đến việc hình thành C3 convertaza C4b2a của con đường lectin và khi tích tụ sản phẩm phân cắt C3 C3b sau đó thành C5 convertaza C4b2a(C3b)n, mà việc tích tụ này đã được xác định là gây ra sự opsonin hóa và/hoặc phân hủy.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cách hiểu truyền thống về con đường nhánh" còn được đề cập đến là "con đường nhánh truyền thống" dùng để chỉ con đường nhánh trước khi có sáng chế được mô tả ở đây, tức là, sự hoạt hóa bổ thể được khởi phát, ví dụ, bởi zymosan từ vách tế bào nấm và nấm men,

lipopolysacarit (LPS) từ màng ngoài Gram âm, và hồng cầu thỏ, cũng như từ nhiều polysacarit tinh khiết, virut, vi khuẩn, tế bào khối u động vật, ký sinh trùng và tế bào đã bị phá hủy, và theo truyền thống được cho là phát sinh từ sự hình thành tự phát do phân hủy protein của C3b từ yếu tố bổ thể C3. Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự hoạt hóa của "con đường nhánh truyền thống", còn được đề cập đến trong bản mô tả là "con đường nhánh", được đo trong chất đệm Mg^{++}/EGTA (tức là, khi không có Ca^{++}).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "con đường lectin" dùng để chỉ sự hoạt hóa bổ thể diễn ra thông qua sự liên kết đặc hiệu của protein liên kết hydrat cacbon huyết thanh và không huyết thanh bao gồm lectin liên kết manan (MBL), CL-11 và ficolin (H-ficolin, M-ficolin, hoặc L-ficolin). Như được mô tả trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng con đường lectin được điều khiển bởi hai nhánh tác động, nhánh tác động con đường lectin 1 (LEA-1), hiện nay được biết là phụ thuộc vào MASP-3, và nhánh tác động con đường lectin 2 (LEA-2), phụ thuộc vào MASP-2. Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự hoạt hóa của con đường lectin được đánh giá bằng cách sử dụng chất đệm chứa Ca^{++}.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "con đường cổ điển" dùng để chỉ sự hoạt hóa bổ thể được khởi phát bởi kháng thể liên kết với hạt ngoại lai và đòi hỏi sự liên kết của phân tử nhận diện C1q.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "HTRA-1" dùng để chỉ serin proteaza A1 đòi hỏi nhiệt độ cao của serin peptidaza.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất ức chế MASP-3" dùng để chỉ chất bất kỳ ức chế trực tiếp sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3, bao gồm các chất liên kết với hoặc tương tác trực tiếp với MASP-3, bao gồm kháng thể MASP-3 và mảnh liên kết MASP-3 của chúng, peptit tự nhiên và tổng hợp, cơ chất cạnh tranh, phân tử nhỏ, chất ức chế sự biểu hiện và chất ức chế tự nhiên được phân lập, và còn bao gồm peptit cạnh tranh với MASP-3 để liên kết với một phân tử nhận diện khác (ví dụ, MBL, CL-11, H-ficolin, M-ficolin, hoặc L-ficolin) trong con

đường lectin. Theo một phương án, chất ức chế MASP-3 đặc hiệu với MASP-3, và không liên kết với MASP-1 hoặc MASP-2. Chất ức chế mà ức chế trực tiếp MASP-3 có thể được đề cập đến là chất ức chế trực tiếp MASP-3 (ví dụ, kháng thể MASP-3), trong khi chất ức chế ức chế gián tiếp MASP-3 có thể được đề cập đến là chất ức chế gián tiếp MASP-3 (ví dụ, kháng thể MASP-1 ức chế sự hoạt hóa MASP-3). Một ví dụ về chất ức chế trực tiếp MASP-3 là chất ức chế đặc hiệu MASP-3, như chất ức chế MASP-3 liên kết đặc hiệu với một phần của MASP-3 của người (SEQ ID NO:2) với ái lực liên kết lớn hơn ít nhất 10 lần so với các thành phần khác trong hệ thống bổ thể. Một ví dụ khác về chất ức chế trực tiếp MASP-3 là kháng thể MASP-3 có ái lực cao liên kết đặc hiệu với miền serin proteaza của MASP-3 của người (SEQ ID NO:2), với ái lực thấp hơn 500 pM và không liên kết với MASP-1 của người (SEQ ID NO:8). Theo một phương án, chất ức chế MASP-3 ức chế gián tiếp hoạt tính MASP-3, như, ví dụ, chất ức chế sự hoạt hóa MASP-3, bao gồm chất ức chế sự hoạt hóa MASP-3 qua trung gian MASP-1 (ví dụ, kháng thể MASP-1 hoặc mảnh liên kết MASP-1 của nó, peptit tự nhiên và tổng hợp, phân tử nhỏ, chất ức chế sự biểu hiện và chất ức chế tự nhiên được phân lập, và còn bao gồm cả peptit cạnh tranh với MASP-1 để liên kết với MASP-3). Theo một phương án được ưu tiên, chất ức chế MASP-3, như kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc peptit liên kết kháng nguyên ức chế sự thuần thục qua trung gian MASP-3 của yếu tố D. Theo một phương án khác, chất ức chế MASP-3 ức chế sự hoạt hóa qua trung gian MASP-3 của yếu tố B. Chất ức chế MASP-3 hữu ích trong phương pháp theo sáng chế có thể làm giảm sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 hơn 10%, như hơn 20%, hơn 50%, hoặc hơn 90%. Theo một phương án, chất ức chế MASP-3 làm giảm sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 hơn 90% (tức là, dẫn đến sự hoạt hóa bổ thể MASP-3 chỉ 10% hoặc thấp hơn). Mong đợi rằng sự ức chế MASP-3 sẽ ngăn chặn, hoàn toàn hoặc một phần, cả sự phân hủy và sự opsonin hóa liên quan đến LEA-1 và sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và sự phân hủy và sự opsonin hóa liên quan đến yếu tố D.

Theo một phương án, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao liên kết với miền serin proteaza của MASP-3 (các gốc axit amin từ 450 đến 728 của SEQ ID NO:2) với ái lực thấp hơn 500 pM (ví dụ, thấp hơn 250 pM, thấp hơn 100 pM, thấp hơn 50 pM, hoặc thấp hơn 10 pM) và ức chế sự hoạt hóa bổ thể của con đường nhánh trong máu của đối tượng là động vật có vú ít nhất 50% (ví dụ, ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% hoặc lớn hơn).

"Kháng thể" là phân tử globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu với đích, như polypeptit, thông qua ít nhất một điểm nhận diện epitop nêu trong vùng biến đổi (còn được đề cập đến trong bản mô tả là miền biến đổi) của phân tử globulin miễn dịch.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các kháng thể và mảnh kháng thể của chúng, có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ sản sinh kháng thể (ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, và động vật linh trưởng bao gồm người), hoặc từ phương pháp lai, chọn lọc thực khuẩn thể, biểu hiện tái tổ hợp hoặc động vật chuyển gen (hoặc các phương pháp tạo ra kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác"), liên kết đặc hiệu với polypeptit đích, như, ví dụ, MASP-1, MASP-2 hoặc MASP-3 polypeptit hoặc các phần của chúng. Không dự tính là thuật ngữ "kháng thể" bị hạn chế ở nguồn kháng thể hoặc cách thức trong đó kháng thể này được tạo ra (ví dụ, bằng cách lai, chọn lọc thực khuẩn thể, biểu hiện tái tổ hợp, động vật chuyển gen, tổng hợp peptit, v.v.). Các kháng thể lấy làm ví dụ bao gồm kháng thể đa dòng, đơn dòng và tái tổ hợp; kháng thể đặc hiệu pan, nhiều đặc hiệu (ví dụ, kháng thể hai đặc hiệu, ba đặc hiệu); kháng thể được làm giống như của người; kháng thể chuột nhắt; các kháng thể đơn dòng khảm, chuột nhắt-người, chuột nhắt-động vật linh trưởng, động vật linh trưởng-người; và kháng thể kháng idiotyp, và có thể là kháng thể nguyên vẹn bất kỳ hoặc mảnh của kháng thể đó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" không những bao gồm kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng nguyên vẹn, mà còn bao gồm cả các mảnh của chúng, như kháng thể vùng biến đổi đơn (dAb), hoặc các mảnh kháng thể đã biết khác như Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv và dạng tương tự, chuỗi đơn (ScFv), các biến thể tổng hợp của nó, biến

thể có trong tự nhiên, protein dung hợp chứa phần kháng thể có mảnh liên kết kháng nguyên có độ đặc hiệu được yêu cầu, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể hai đặc hiệu, và cấu hình biến đổi bất kỳ khác của phân tử globulin miễn dịch chứa điểm liên kết kháng nguyên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên (điểm nhận diện epitop) có độ đặc hiệu được yêu cầu.

"Kháng thể đơn dòng" dùng để chỉ quần thể kháng thể đồng nhất trong đó kháng thể đơn dòng này gồm có các axit amin (có trong tự nhiên và không có trong tự nhiên) liên quan đến sự liên kết có chọn lọc của epitop. Các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên đích ở mức cao. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" không những bao gồm các kháng thể đơn dòng nguyên vẹn và các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ, mà còn bao gồm các mảnh của chúng (như Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), chuỗi đơn (ScFv), các biến thể của chúng, protein dung hợp chứa phần liên kết kháng nguyên, các kháng thể đơn dòng được làm giống như của người, các kháng thể đơn dòng khảm, và cấu hình đã biến đổi bất kỳ khác của phân tử globulin miễn dịch chứa mảnh liên kết kháng nguyên (điểm nhận diện epitop) có độ đặc hiệu được yêu cầu và khả năng liên kết với epitop. Không dự tính bị giới hạn ở nguồn kháng thể hoặc cách thức trong đó kháng thể này được tạo ra (ví dụ, bằng phương pháp lai, chọn lọc thực khuẩn thể, biểu hiện tái tổ hợp, động vật chuyển gen, v.v.). Thuật ngữ này bao gồm toàn bộ globulin miễn dịch cũng như các mảnh v.v. được mô tả trên đây trong định nghĩa về "kháng thể".

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mảnh kháng thể" dùng để chỉ phần thu được từ hoặc liên quan đến kháng thể có chiều dài đầy đủ, như, ví dụ, kháng thể MASP-1, MASP-2 hoặc MASP-3, thường bao gồm vùng liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của nó. Các ví dụ minh họa về mảnh kháng thể bao gồm mảnh Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ và Fv, mảnh scFv, kháng thể thể đôi, kháng thể mạch thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn và kháng thể nhiều đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của chúng như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm tập vùng quyết định tính bổ sung ("CDR") của chuỗi nặng (VH) và chuỗi nhẹ (VL), lần lượt nằm vào giữa nhóm khung (FR) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà hỗ trợ các CDR và xác định mối liên hệ trong không gian của các CDR so với nhau. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tập CDR" dùng để chỉ ba vùng siêu biến của vùng V của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Xuất phát từ đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, các vùng này lần lượt được ký hiệu là "CDR1", "CDR2", và "CDR3". Do đó, điểm liên kết kháng nguyên bao gồm sáu CDR, bao gồm tập CDR từ mỗi một trong số vùng V của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tập FR" dùng để chỉ bốn trình tự axit amin nằm bên sườn mà tạo khung cho các CDR của tập CDR của vùng V của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Một số gốc FR có thể tiếp xúc với kháng nguyên đã liên kết; tuy nhiên, các FR chủ yếu chịu trách nhiệm về việc gập vùng V vào điểm liên kết kháng nguyên, cụ thể là các gốc FR ngay liền kề với các CDR. Bên trong FR, một số gốc axit amin nhất định và một số đặc điểm cấu trúc nhất định được bảo toàn ở mức độ rất cao. Về mặt này, tất cả các trình tự vùng V chứa vòng disulfua bên trong có khoảng 90 gốc axit amin. Khi vùng V gập vào điểm liên kết, thì các CDR được biểu hiện dưới dạng mô-típ vòng nhô ra mà tạo ra bề mặt liên kết kháng nguyên. Thường đã biết rằng có vùng cấu trúc bảo toàn của FR mà gây ảnh hưởng đến hình dạng gập của vòng CDR thành một số cấu trúc "chính tắc" - bất kể trình tự axit amin chính xác của CDR.

Các cấu trúc và vị trí của vùng biến đổi globulin miễn dịch có thể được xác định bằng cách tham khảo tài liệu Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, US Department of Health and Human Services, 1987, và các bản cập nhật mới của tài liệu này, hiện có sẵn trên mạng Internet (immuno.bme.nwu.edu.).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, mảnh kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" bao gồm các miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Nhìn chung, Fv polypeptit còn bao gồm tác nhân liên kết polypeptit giữa miền V_H và miền V_L, khiến cho scFv tạo ra cấu trúc mong muốn để liên kết kháng nguyên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể khảm" là protein tái tổ hợp bao gồm các miền biến đổi và vùng quyết định tính bổ sung thu được từ kháng thể của loài không phải là người (ví dụ, loài gặm nhấm), trong khi phần còn lại của phân tử kháng thể thu được từ kháng thể người. Theo một số phương án, kháng thể khảm gồm có mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể ức chế MASP-3 được liên kết điều khiển được hoặc nếu không thì được dung hợp với phần Fc khác loại của kháng thể khác. Theo một số phương án, miền Fc khác loại có thể có nguồn gốc từ lớp Ig khác từ kháng thể bố mẹ, bao gồm IgA (bao gồm lớp con IgA1 và IgA2), IgD, IgE, IgG (bao gồm lớp con IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4) và IgM.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể được làm giống như của người" là phân tử khảm, thường được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, có điểm liên kết kháng nguyên thu được từ globulin miễn dịch từ loài không phải là người và cấu trúc globulin miễn dịch còn lại của phân tử dựa trên cấu trúc và/hoặc trình tự của globulin miễn dịch của người. Điểm liên kết kháng nguyên có thể bao gồm các vùng biến đổi hoàn chỉnh được dung hợp lên trên miền hằng định hoặc chỉ có các CDR được ghép lên trên vùng khung thích hợp trong miền biến đổi. Điểm liên kết epitop có thể là loại dại hoặc có thể được cải biến bằng một hoặc nhiều thay thế axit amin. Một phương pháp khác không chỉ tập trung vào việc tạo ra vùng hằng định có nguồn gốc từ người, mà còn tập trung vào việc cải biến vùng biến đổi cũng như để tạo hình lại cho chúng giống nhất có thể với dạng ở người. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống như của người giữ được tất cả các trình tự CDR (ví dụ, kháng thể chuột nhắt được làm giống như của người chứa tất cả sáu CDR từ kháng thể chuột nhắt). Theo các phương án khác, kháng thể được làm giống như của người có một hoặc nhiều CDR (một, hai, ba, bốn, năm, sáu) được làm thay

đối so với kháng thể ban đầu, còn được gọi là một hoặc nhiều CDR "thu được từ" một hoặc nhiều CDR từ kháng thể ban đầu.

Kháng thể "liên kết đặc hiệu" với đích nếu nó liên kết với ái lực lớn hơn và/hoặc ái lực mà nó liên kết với các chất khác. Theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với miền serin proteaza của MASP-3 của người (các gốc axit amin từ 450 đến 728 của SEQ ID NO:2). Theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với một hoặc nhiều epitop trong số các epitop được mô tả trong bảng 4, bảng 28 hoặc được thể hiện trên Fig.62.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "lectin liên kết manan" ("MBL") tương đương với protein liên kết manan ("mannan-binding protein-MBP").

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phức hợp tấn công màng" ("MAC") dùng để chỉ phức hợp của các thành phần bổ thể năm đầu tận (C5b được kết hợp với C6, C7, C8 và C9) mà xen vào và phá vỡ màng (còn được đề cập đến là C5b-9).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "đối tượng" bao gồm tất cả các động vật có vú, bao gồm nhưng không giới hạn ở người, động vật linh trưởng không phải người, chó, mèo, ngựa, cừu, dê, bò, thỏ, lợn và loài gặm nhấm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các gốc axit amin được viết tắt như sau: alanin (Ala;A), asparagin (Asn;N), axit aspartic (Asp;D), arginin (Arg;R), xystein (Cys;C), axit glutamic (Glu;E), glutamin (Gln;Q), glyxin (Gly;G), histidin (His;H), isoleuxin (Ile;I), leuxin (Leu;L), lysin (Lys;K), metionin (Met;M), phenylalanin (Phe;F), prolin (Pro;P), serin (Ser;S), threonin (Thr;T), tryptophan (Trp;W), tyrosin (Tyr;Y), và valin (Val;V).

Theo nghĩa rộng nhất, các axit amin có trong tự nhiên có thể được chia thành các nhóm dựa trên đặc tính hóa học của chuỗi bên của các axit amin tương ứng. Thuật ngữ axit amin "kỵ nước" có nghĩa là Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys hoặc Pro. Thuật ngữ axit amin "ưa nước" có nghĩa là Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg hoặc His. Việc phân nhóm của các axit amin này còn có thể được phân

nhóm con như sau. Thuật ngữ axit amin "ưa nước không tích điện" có nghĩa là Ser, Thr, Asn hoặc Gln. Thuật ngữ axit amin "có tính axit" có nghĩa là Glu hoặc Asp. Thuật ngữ axit amin "có tính kiềm" có nghĩa là Lys, Arg hoặc His.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thay thế axit amin bảo toàn" được minh họa bằng phép thay thế giữa các axit amin ở mỗi một trong các nhóm sau: (1) glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin, (2) phenylalanin, tyrosin, và tryptophan, (3) serin và threonin, (4) aspartat và glutamat, (5) glutamin và asparagin, và (6) lysin, arginin và histidin.

Thuật ngữ "oligonucleotit" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ oligome hoặc polyme của axit ribonucleic (ARN) hoặc axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc các dạng bắt chước của chúng. Thuật ngữ này cũng bao gồm cả các oligonucleobaza gồm có các nucleotit có trong tự nhiên, đường và các liên kết liên nucleosit (mạch chính) cộng hóa trị cũng như oligonucleotit có các cải biến không có trong tự nhiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "epitop" dùng để chỉ điểm trên protein (ví dụ, protein MASP-3 của người) mà liên kết với kháng thể. "Epitop chồng lặp" bao gồm ít nhất một (ví dụ, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) (các) gốc axit amin chung, bao gồm epitop mạch thẳng và mạch không thẳng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit", "peptit", và "protein" được sử dụng thay thế cho nhau và có nghĩa là chuỗi liên kết peptit bất kỳ của các axit amin, bất kể độ dài hoặc cải biến sau dịch mã. Protein MASP-3 được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa hoặc là protein loại dại hoặc có thể là biến thể có không nhiều hơn 50 (ví dụ, không nhiều hơn một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, hoặc 50) thay thế axit amin bảo toàn. Thay thế bảo toàn thường bao gồm thay thế trong các nhóm sau: glyxin và alanin; valin, isoleuxin, và leuxin; axit aspartic và axit glutamic; asparagin, glutamin, serin và threonin; lysin, histidin và arginin; và phenylalanin và tyrosin.

Theo một số phương án, protein MASP-3 của người có thể có trình tự axit amin mà đồng nhất bằng, hoặc lớn hơn, 70 (ví dụ, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, hoặc 100) % với protein MASP-3 của người có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, mảnh peptit có thể có độ dài ít nhất 6 (ví dụ, ít nhất 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, hoặc 600 hoặc nhiều hơn 600) gốc axit amin (ví dụ, ít nhất 6 gốc axit amin liền kề trong SEQ ID NO:2). Theo một số phương án, mảnh peptit kháng nguyên của protein MASP-3 của người có độ dài ít hơn 500 (ví dụ, ít hơn 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, hoặc 6) gốc axit amin (ví dụ, ít hơn 500 gốc axit amin liền kề trong SEQ ID NO:2.

Theo một số phương án, trong ngữ cảnh tạo ra kháng thể liên kết với MASP-3, mảnh peptit có tính kháng nguyên và giữ được ít nhất 10% (ví dụ, ít nhất 10%, ít nhất 15%, ít nhất 20%, ít nhất 25%, ít nhất 30%, ít nhất 35%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 55%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, ít nhất 99.5%, hoặc 100% hoặc nhiều hơn 100%) khả năng của protein chiều dài đầy đủ trong việc cảm ứng đáp ứng kháng nguyên ở động vật có vú (xem dưới đây trong mục "Phương pháp tạo ra kháng thể").

Phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin được định nghĩa là phần trăm axit amin trong trình tự ứng viên đồng nhất với axit amin trong trình tự đối chiếu, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm đồng nhất trình tự tối đa. Việc sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích xác định phần trăm đồng nhất trình tự có thể đạt được theo các cách khác nhau thuộc kỹ năng trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có bán trên

thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 hoặc Megalign (DNASTAR). Các thông số thích hợp để xác định sự sắp xếp thẳng hàng, bao gồm thuật toán bất kỳ cần để đạt được mức sắp xếp thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự được so sánh có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết.

Theo các phương án tiêu biểu, protein MASP-3 của người (SEQ ID NO:2) được mã hóa bởi trình tự cADN được nêu trong SEQ ID NO:1. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng trình tự cADN được bộc lộ trong SEQ ID NO:1 là alen đơn lẻ của MASP-3 của người, và biến thể alen và sự nối bện thay thế được mong đợi là sẽ diễn ra. Biến thể alen của các trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO:1, bao gồm các biến thể chứa đột biến câm và các biến thể trong đó các đột biến dẫn đến sự thay đổi trình tự axit amin, là nằm trong phạm vi của sáng chế. Biến thể alen của trình tự MASP-3 có thể được tách dòng bằng cách dò thư viện cADN hoặc thư viện bộ gen từ các cá thể khác nhau theo quy trình tiêu chuẩn, hoặc có thể được nhận biết bằng phương pháp tìm kiếm so sánh đồng nhất (ví dụ, tìm kiếm BLAST) cơ sở dữ liệu chứa thông tin này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phân tử axit nucleic được phân lập" là phân tử axit nucleic (ví dụ, polynucleotit) không được hợp nhất trong ADN bộ gen của sinh vật. Ví dụ, phân tử ADN mã hóa yếu tố sinh trưởng đã được tách khỏi ADN bộ gen của tế bào là phân tử ADN được phân lập. Một ví dụ khác về phân tử axit nucleic được phân lập là phân tử axit nucleic được tổng hợp hóa học mà không được hợp nhất trong bộ gen của sinh vật. Phân tử axit nucleic được phân lập từ loài cụ thể nhỏ hơn so với phân tử ADN hoàn chỉnh của nhiễm sắc thể từ loài đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "cấu trúc phân tử axit nucleic" là phân tử axit nucleic, sợi đơn hoặc sợi kép, đã được cải biến nhờ sự can thiệp của con người để chứa các đoạn axit nucleic được kết hợp và đặt kề nhau theo thứ tự sắp xếp không tồn tại trong tự nhiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vectơ biểu hiện" là phân tử axit nucleic mã hóa gen được biểu hiện trong tế bào chủ. Điển hình, vectơ biểu hiện chứa

gen khởi đầu phiên mã, gen, và gen kết thúc phiên mã. Sự biểu hiện gen thường diễn ra dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu, và gen như vậy được nói là "liên kết điều khiển được với" gen khởi đầu. Tương tự, thành phần điều hòa và gen khởi đầu trong lõi liên kết điều khiển được nếu thành phần điều hòa này điều biến hoạt tính của gen khởi đầu trong lõi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng" như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là nhằm cụ thể hóa rằng giá trị cụ thể được nêu có thể thay đổi đến một phạm vi nhất định, như thay đổi trong khoảng ±10%, tốt hơn là ±5%, tốt nhất là ±2% được bao gồm trong giá trị được nêu.

Khi các khoảng được nêu ra, thì các điểm cuối cũng được bao gồm trong khoảng này trừ khi được nêu khác đi hoặc nếu không thì rõ ràng từ ngữ cảnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các dạng số ít bao gồm cả các khía cạnh số nhiều trừ khi ngữ cảnh rõ ràng chỉ khác đi. Vì thế, ví dụ, khi đề cập đến "một tá dược" là bao gồm cả nhiều tá dược như vậy và các dạng tương đương của chúng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, khi đề cập đến "một chất" là bao gồm một chất, cũng như hai hoặc nhiều hơn hai chất; khi đề cập đến "một kháng thể" là bao gồm cả nhiều kháng thể như vậy và khi đề cập đến "một vùng khung" là bao gồm cả việc đề cập đến một hoặc nhiều vùng khung và các dạng tương đương của chúng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và v.v..

Mỗi phương án trong bản mô tả này được áp dụng kèm những sửa đổi chi tiết thích hợp cho mọi phương án khác trừ khi rõ ràng nêu khác đi. Được dự định rằng phương án bất kỳ được nêu trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo phương pháp, kit, chất phản ứng, hoặc chế phẩm bất kỳ theo sáng chế, và ngược lại. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để đạt được phương pháp theo sáng chế.

II. Con đường lectin: cách hiểu mới

i. Tổng quát: con đường lectin đã được định nghĩa lại

Như được mô tả trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã tiến hành một phát minh đáng ngạc nhiên rằng con đường lectin của bổ thể có hai nhánh tác động để hoạt hóa bổ thể, hai nhánh này đều được điều khiển bởi phức hợp hoạt hóa con đường lectin tạo ra từ các thành phần nhận diện hydrat cacbon (MBL, CL-11 và ficolin): i) nhánh tác động này được tạo ra bởi serin proteaza liên quan đến con đường lectin MASP-1 và MASP-3, được đề cập đến trong bản mô tả này là "nhánh tác động con đường lectin 1" hoặc "LEA-1"; và (ii) nhánh tác động hoạt hóa điều khiển bởi MASP-2, được đề cập đến trong bản mô tả này là "nhánh tác động con đường lectin 2", hoặc "LEA-2". Cả LEA-1 và LEA-2 đều có thể tác động đến sự phân hủy và/hoặc sự opsonin hóa.

Cũng đã xác định được rằng sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B bởi MASP-3 và sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố D bởi HTRA-1, MASP-1 và MASP-3, đều có thể diễn ra khi không có Ca^{++}, thường dẫn đến sự chuyển hóa C3bB thành C3bBb và tiền yếu tố D thành yếu tố D. Do đó, việc ức chế MASP-3 có thể ức chế cả LEA-1 và sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và/hoặc yếu tố D, mà có thể dẫn đến việc ức chế sự phân hủy và/hoặc sự opsonin hóa.

Fig.1 minh họa cách hiểu mới này về con đường hoạt hóa bổ thể. Như được thể hiện trên Fig.1, LEA-1 được điều khiển bởi MASP-3 liên kết với lectin, mà có thể hoạt hóa zymogen của yếu tố D thành dạng có hoạt tính của nó và/hoặc phân cắt yếu tố B liên kết với C3b hoặc C3b(H_20), dẫn đến sự chuyển hóa phức hợp C3bB zymogen thành dạng có hoạt tính enzym C3bBb của nó. Yếu tố đã được hoạt hóa D, được tạo ra bởi MASP-3, cũng có thể chuyển hóa phức hợp C3bB hoặc C3b(H_20) zymogen thành dạng có hoạt tính enzym của chúng. MASP-1 có khả năng đẩy nhanh sự tự hoạt hóa, trong khi đó MASP-3 thì không có khả năng này. Trong nhiều trường hợp, MASP-1 là chất hoạt hóa của MASP-3.

Trong khi trong nhiều ví dụ, lectin (tức là, MBL, CL-11 hoặc ficolin) có thể định hướng hoạt tính đến bề mặt tế bào, Fig.1 cũng nêu sơ lược chức năng không phụ thuộc vào lectin của MASP-3, MASP-1, và HTRA-1 trong quá trình hoạt hóa

yếu tố B và/hoặc làm thuần thục yếu tố D. Như với dạng liên quan đến lectin của MASP-3 trong LEA-1, dạng không phụ thuộc vào lectin của MASP-3 có khả năng điều tiết sự chuyển hóa của C3bB hoặc C3b(H_20) thành C3bBb (xem cả Fig.29 và Fig.30) và tiền yếu tố D thành yếu tố D (xem Fig.32). MASP-1 (xem cả Fig.32) và protein không liên quan đến MASP HTRA-1 cũng có thể hoạt hóa yếu tố D (Stanton et al., *Evidence That the HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration*, được thuyết trình tại hội thảo của Hiệp hội nghiên cứu về Thị lực và Nhãn khoa năm 2011 vào ngày 4/5/2011) theo cách trong đó không yêu cầu phải có thành phần lectin nào.

Vì thế, MASP-1 (thông qua LEA-1 và dạng không phụ thuộc vào lectin), MASP-3 (thông qua LEA-1 và dạng không phụ thuộc vào lectin), và HTRA-1 (chỉ không phụ thuộc vào lectin) có khả năng hoạt hóa trực tiếp hoặc gián tiếp ở một hoặc nhiều điểm dọc theo trục MASP-3 - yếu tố D - yếu tố B. Khi hoạt động như vậy, chúng tạo ra C3bBb, C3 convertaza của con đường nhánh, và chúng kích thích sự sản sinh và kết lắng của C3b trên bề mặt vi khuẩn. Sự kết lắng C3b đóng vai trò quan trọng trong quá trình opsonin hóa, đánh dấu bề mặt của vi khuẩn để tế bào thực bào chủ, như đại thực bào phá hủy. Là một ví dụ trong bản mô tả này (Fig.28A và Fig.28B), MASP-3 quan trọng đối với sự opsonin hóa của *S. aureus*. Sự kết lắng C3b diễn ra nhanh trên *S. aureus* đã tiếp xúc với huyết thanh của người theo cách phụ thuộc vào MASP-3 (Fig.28A và Fig.28B).

Tuy nhiên, sự đóng góp của LEA-1 và chức năng không phụ thuộc vào lectin của MASP-3, MASP-1, hoặc HTRA-1 không chỉ giới hạn ở sự opsonin hóa. Như được nêu bằng sơ đồ trên Fig.1, ba thành phần này cũng có thể gây phân hủy tế bào bởi sự hoạt hóa gián tiếp hoặc trực tiếp của yếu tố B, và sự sản sinh C3b. Các thành phần này tạo nên phức hợp mà tạo ra C5 convertaza của con đường nhánh, $C3bBb(C3b)_n$. Như được mô tả thêm trong bản mô tả này, yêu cầu đối với MASP-3 và MBL, nhưng không phải đối với MASP-2 (và, do đó, không đối với LEA-2 trong ví dụ này), trong quá trình phân hủy của *N. meningitidis* (xem Fig.11, Fig.12 và Fig.13) thể hiện vai trò đối với LEA-1 trong quá trình phân hủy. Tóm lại, các kết quả

opsonin hóa thu được từ nghiên cứu *S. aureus* và các kết quả phân hủy được quan sát thấy trong nghiên cứu *N. meningitidis* hỗ trợ cho vai trò của LEA-1 trong cả hai quá trình (như được nêu bằng sơ đồ trên Fig.1). Ngoài ra, các nghiên cứu này cho thấy rằng cả sự opsonin hóa và sự phân hủy đều có thể bắt nguồn từ sự chuyển hóa của C3bB hoặc C3b(H_20) và/hoặc của tiền yếu tố D thành yếu tố D; do đó, cả hai quy trình này đều có thể là kết quả của vai trò không phụ thuộc vào lectin của MASP-3, MASP-1, hoặc HTRA-1. Vì thế, mô hình được phát triển bởi các tác giả sáng chế trên Fig.1 hỗ trợ việc sử dụng các chất ức chế của chủ yếu là MASP-3, và cả MASP-1 và/hoặc HTRA-1, để ngăn chặn sự opsonin hóa và/hoặc sự phân hủy và để điều trị các bệnh lý do sự rối loạn điều hòa các quy trình này gây ra.

1. Nhánh tác động con đường lectin (LEA-1)

Nhánh tác động thứ nhất của con đường lectin, LEA-1, được tạo ra bởi serin proteaza liên quan đến con đường lectin MASP-1 và MASP-3. Như được mô tả trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã cho thấy rằng, khi không có mặt MASP-3 và khi có mặt MASP-1, con đường nhánh không được hoạt hóa một cách hiệu quả trên cấu trúc bề mặt. Các kết quả này cho thấy rằng MASP-3 đóng vai trò chưa được bộc lộ trước đó trong việc khởi phát con đường nhánh, và điều này được xác nhận bằng cách sử dụng huyết thanh 3MC thiếu hụt MASP-3 thu được từ các bệnh nhân có rối loạn liệt gen thể nhiễm sắc định hình 3MC dạng hiếm (Rooryck C, et al., Nat Genet. 43(3):197-203 (2011)) với các đột biến khiến cho miền serin proteaza của MASP-3 loạn chức năng. Dựa trên các kết quả mới này, được mong đợi rằng sự hoạt hóa bổ thể liên quan đến con đường nhánh, như được định nghĩa theo cách thông thường, là phụ thuộc vào MASP-3. Trên thực tế, MASP-3, và sự hoạt hóa LEA-1 của nó, có thể tượng trưng cho tác nhân khởi phát khó nắm bắt của con đường nhánh cho đến thời điểm hiện tại.

Như được mô tả thêm trong các ví dụ từ 1 đến 4 ở đây, trong huyết thanh thiếu hụt MASP-2, các tác giả sáng chế quan sát thấy hoạt tính hoạt hóa con đường nhánh phụ thuộc vào lectin cao hơn dẫn đến hoạt tính diệt khuẩn (tức là, hoạt tính phân hủy) kháng *N. meningitidis* cao hơn. Trong khi không muốn bị hạn chế bởi lý thuyết cụ

thể bất kỳ, tin rằng khi không có mặt MASP-2, phức hợp nhận diện hydrat cacbon mang MASP-1 có khả năng dễ liên kết gần hơn với phức hợp nhận diện hydrat cacbon mang MASP-3 để hoạt hóa MASP-3. Đã biết rằng, trong nhiều trường hợp, sự hoạt hóa của MASP-3 là phụ thuộc vào hoạt tính MASP-1, do MASP-3 không phải là enzym tự hoạt hóa và rất hay đòi hỏi là hoạt tính của MASP-1 cần được chuyển hóa từ dạng zymogen của nó thành dạng có hoạt tính enzym của nó. MASP-1 (giống MASP-2) là enzym tự hoạt hóa, trong khi MASP-3 không tự hoạt hóa và, trong nhiều trường hợp, đòi hỏi là hoạt tính enzym hóa của MASP-1 cần được chuyển hóa thành dạng có hoạt tính enzym của nó. Xem tài liệu, Zundel S, et al., *J Immunol.*, 172(7):4342-50 (2004). Khi không có mặt MASP-2, tất cả các phức hợp nhận diện con đường lectin được nạp MASP-1 hoặc MASP-3. Do đó, việc không có mặt MASP-2 tạo điều kiện cho việc chuyển hóa qua trung gian MASP-1 của MASP-3 thành dạng có hoạt tính enzym của nó. Mỗi khi MASP-3 được hoạt hóa, MASP-3 đã được hoạt hóa khởi phát sự hoạt hóa con đường nhánh, được đề cập đến là sự hoạt hóa "LEA-1", thông qua sự chuyển hóa qua trung gian MASP-3 C3bB thành C3bBb và/hoặc sự chuyển hóa tiền yếu tố D thành yếu tố D. C3bBb, còn được đề cập đến là C3 convertaza của con đường nhánh, phân cắt các phân tử C3 bổ sung dẫn đến sự kết lắng phân tử C3b opsonin. Nếu một vài mảnh C3b liên kết ở phạm vi lân cận gần với phức hợp C3bBb convertaza, thì điều này dẫn đến việc hình thành C5 convertaza của con đường nhánh C3bBb(C3b)n, thúc đẩy sự hình thành MAC. Ngoài ra, phân tử C3b đã kết lắng trên bề mặt tạo ra các điểm mới để liên kết yếu tố B, mà có thể được phân cắt bằng yếu tố D và/hoặc MASP-3 để tạo ra các điểm khác nữa mà phức hợp con đường nhánh C3 và C5 convertaza có thể được tạo ra. Quy trình nêu sau cùng này là cần thiết cho quá trình phân hủy hiệu quả và không đòi hỏi lectin mỗi khi diễn ra sự kết lắng C3b ban đầu. Công bố gần đây (Iwaki D. et al., *J Immunol* 187(7):3751-8 (2011)) cũng như dữ liệu có được từ các tác giả sáng chế (Fig.30) cho thấy rằng phức hợp zymogen C3 convertaza của con đường nhánh C3bB được chuyển hóa thành dạng có hoạt tính enzym của nó bởi MASP-3 đã được hoạt hóa. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sự phân cắt qua trung gian MASP-3 của

yếu tố B là thành phần con của LEA-1 mới được mô tả, thúc đẩy sự hình thành phụ thuộc vào lectin của C3 convertaza của con đường nhánh C3bBb.

2. Nhánh tác động con đường lectin (LEA-2)

Nhánh tác động thứ hai của con đường lectin, LEA-2, được tạo ra bởi serin proteaza liên quan đến con đường lectin MASP-2. MASP-2 được hoạt hóa khi các thành phần nhận diện liên kết với mô hình tương ứng của chúng, và cũng có thể được hoạt hóa bởi MASP-1, và tiếp đó phân cắt thành phần bổ thể C4 thành C4a và C4b. Sau quá trình liên kết của sản phẩm phân cắt C4b với C2 huyết tương, C2 liên kết với C4b trở thành cơ chất của bước phân cắt qua trung gian MASP-2 thứ hai mà chuyển hóa C2 liên kết với C4b thành phức hợp có hoạt tính enzym C4bC2a và mảnh phân cắt C2b nhỏ. C4b2a là C3 convertaza chuyển hóa C3 của con đường lectin, chuyển hóa thành phần huyết tương C3 tồn tại với lượng lớn thành C3a và C3b. C3b liên kết với bề mặt bất kỳ trong phạm vi lân cận gần thông qua liên kết thioeste. Nếu một vài mảnh C3b liên kết trong phạm vi lân cận gần với phức hợp C3 convertaza C4b2a, convertaza này làm thay đổi độ đặc hiệu của nó để chuyển hóa C5 thành C5b và C5a, tạo ra phức hợp C5 C4b2a(C3b)n. Trong khi C5 convertaza này có thể khởi phát sự hình thành MAC, quy trình này được cho là không đủ hiệu quả để thúc đẩy việc chính nó tự phân hủy. Thay vào đó, C3b opsonin ban đầu đã được sản sinh ra bởi LEA-2 tạo ra nhân để hình thành các điểm C3 convertaza và C5 convertaza của con đường nhánh mới, mà cuối cùng dẫn sự hình thành và phân hủy MAC tồn tại với lượng lớn. Sự kiện nêu sau cùng này được điều tiết bởi sự hoạt hóa yếu tố D của yếu tố B liên quan đến C3b tạo ra bởi LEA-2, và do đó phụ thuộc vào LEA-1 do vai trò thiết yếu đối với MASP-1 trong quá trình làm thuần thục yếu tố D. Cũng có đường hoạt hóa bắc cầu C4 phụ thuộc vào MASP-2 để hoạt hóa C3 khi không có C4, đóng vai trò quan trọng trong sinh lý bệnh học của tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, do chuột nhắt thiếu hụt C4 không được bảo vệ để tránh tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu trong khi chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 được bảo vệ (Schwaeble et al., *PNAS*, 2011 nêu trên). LEA-2 cũng liên quan đến con đường đông máu, bao gồm sự phân cắt của prothrombin thành thrombin (con đường chung) và cả

sự phân cắt của yếu tố XII (yếu tố Hageman) để chuyển hóa thành dạng có hoạt tính enzym XIIa của nó. Do đó, yếu tố XIIa phân cắt yếu tố XI thành XIa (con đường nội tại). Sự hoạt hóa con đường nội tại của tầng đông máu dẫn đến sự hình thành fibrin, có vai trò quan trọng thiết yếu để hình thành cục đông.

Fig.1 minh họa cách hiểu mới về con đường lectin và con đường nhánh dựa trên các kết quả được đề cập trong bản mô tả này. Fig.1 phác họa vai trò của LEA-2 trong cả quá trình opsonin hóa và quá trình phân hủy. Trong khi MASP-2 là tác nhân khởi phát sự kết lắng C3b "xuôi dòng" (và quá trình opsonin hóa đạt được) trong các thiết lập phụ thuộc vào lectin về mặt sinh lý (Fig.18A, Fig.18B, Fig.18C), thì nó cũng có vai trò trong quá trình phân hủy của vi khuẩn nhạy huyết thanh. Như được minh họa trên Fig.1, cơ chế phân tử được đề xuất chịu trách nhiệm về sự gia tăng hoạt tính diệt khuẩn của huyết thanh/huyết tương thiếu hụt MASP-2 hoặc đã rút cạn MASP-2 đối với mầm bệnh nhạy huyết thanh như *N. meningitidis* ở chỗ, để phân hủy vi khuẩn, phức hợp nhận diện con đường lectin liên quan đến MASP-1 và MASP-3 phải liên kết tiếp xúc gần với nhau trên bề mặt vi khuẩn, từ đó cho phép MASP-1 phân cắt MASP-3. Trái ngược với MASP-1 và MASP-2, MASP-3 không phải là enzym tự hoạt hóa, nhưng, trong nhiều trường hợp, cần phải có sự hoạt hóa/phân cắt bởi MASP-1 để được chuyển hóa thành dạng có hoạt tính enzym của nó.

Như cũng được thể hiện trên Fig.1, MASP-3 đã được hoạt hóa sau đó có thể phân cắt yếu tố B liên kết C3b trên bề mặt mầm bệnh để khởi phát đợt hoạt hóa nhánh bằng cách tạo ra C3 và C5 convertaza của con đường nhánh có hoạt tính enzym C3bBb và C3bBb(C3b)n, một cách tương ứng. Phức hợp hoạt hóa con đường lectin mang MASP-2 không có vai trò gì trong quá trình hoạt hóa của MASP-3 và, khi không có hoặc sau khi rút cạn MASP-2, thì tất cả các phức hợp hoạt hóa con đường lectin sẽ được nạp MASP-1 hoặc MASP-3. Do đó, khi không có MASP-2, thì gia tăng đáng kể khả năng rằng các phức hợp hoạt hóa con đường lectin mang MASP-1 và MASP-3 sẽ bắt đầu tiếp xúc gần với nhau trên bề mặt vi khuẩn, dẫn đến nhiều MASP-3 được hoạt hóa hơn và từ đó dẫn đến tốc độ phân cắt qua trung gian MASP-3 của yếu tố B liên kết C3b cao hơn để tạo ra C3 và C5 convertaza của con đường

nhánh C3bBb và C3bBb(C3b)n trên bề mặt vi khuẩn. Điều này dẫn đến sự hoạt hóa đợt hoạt hóa cuối cùng C5b-C9 mà tạo ra phức hợp tấn công màng, gồm có C5b liên kết bề mặt kết hợp với C6, C5bC6 kết hợp với C7, C5bC6C7 kết hợp với C8, và C5bC6C7C8, dẫn đến sự polyme hóa C9 mà xen vào cấu trúc bề mặt vi khuẩn và tạo ra lỗ trong vách vi khuẩn, dẫn đến việc tiêu diệt vi khuẩn hướng đích bổ thể theo cách phân hủy do thẩm thấu.

Cốt lõi của khái niệm mới này là ở chỗ dữ liệu được cung cấp trong bản mô tả này rõ ràng cho thấy rằng phức hợp hoạt hóa con đường lectin điều khiển hai đường hoạt hóa riêng biệt sau, như được minh họa trên Fig.1:

i) LEA-1: đường hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-3 khởi phát và điều khiển sự hoạt hóa của bổ thể bằng cách tạo ra convertaza con đường nhánh C3bBb thông qua sự phân cắt ban đầu và sự hoạt hóa của yếu tố B trên bề mặt chất hoạt hóa, mà sau đó xúc tác sự kết lắng C3b và sự hình thành của convertaza con đường nhánh C3bBb. Đường hoạt hóa được điều khiển bởi MASP-3 đóng vai trò thiết yếu trong quá trình opsonin hóa và phân hủy của vi khuẩn và điều khiển con đường nhánh trên bề mặt của vi khuẩn, mang đến tốc độ hoạt hóa tối ưu để tạo ra phức hợp tấn công màng; và

ii) LEA-2: đường hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-2 dẫn đến việc hình thành C3 convertaza của con đường lectin C4b2a và, khi tích tụ sản phẩm phân cắt C3 C3b, sau đó đến C5 convertaza C4b2a(C3b)n. Khi không có bổ thể C4, MASP-2 có thể tạo ra phức hợp C3 convertaza nhánh liên quan đến C2 và yếu tố đông máu XI.

Ngoài vai trò của nó trong quá trình phân hủy, đường hoạt hóa được điều khiển bởi MASP-2 còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình opsonin hóa vi khuẩn dẫn đến việc các vi khuẩn được phủ bằng C3b liên kết cộng hóa trị và các sản phẩm phân cắt của nó (tức là, iC3b và C3dg), mà đã được hướng đích để hấp thụ và tiêu diệt bởi thực bào mang thụ thể C3, như bạch cầu hạt, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào tiểu thần kinh đệm và hệ lưới nội mô. Đây là đường thanh thải hiệu quả nhất của vi khuẩn và vi sinh vật chống lại tình trạng phân hủy của bổ thể. Các vi khuẩn này bao gồm hầu hết các vi khuẩn gram dương.

Ngoài LEA-1 và LEA-2, MASP-3, MASP-1 và/hoặc HTRA-1 có khả năng hoạt hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố D, và MASP-3 cũng có khả năng hoạt hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B.

Trong khi không muốn bị hạn chế bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, được tin rằng mỗi một trong số (i) LEA-1, (ii) LEA-2 và (iii) sự hoạt hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và/hoặc yếu tố D dẫn đến sự opsonin hóa và/hoặc sự hình thành của MAC kèm theo sự phân hủy đạt được.

ii. Cơ sở của MASP-1, MASP-2 và MASP-3

Ba serin proteaza liên quan đến lectin liên kết manan (MASP-1, MASP-2 và MASP-3) hiện được biết đến là có liên quan đến lectin liên kết manan (MBL) trong huyết thanh của người. Lectin liên kết manan còn được gọi là 'protein liên kết manoza' hoặc 'lectin liên kết manoza' trong tài liệu gần đây. Phức hợp MBL–MASP đóng vai trò quan trọng trong tính miễn dịch bẩm sinh do sự liên kết của MBL với cấu trúc hydrat cacbon có mặt trên phạm vi vi sinh vật lớn. Sự tương tác của MBL với các dãy cấu trúc hydrat cacbon cụ thể mang lại sự hoạt hóa cho MASP proenzym mà, từ đó, hoạt hóa bổ thể bằng cách phân cắt thành phần bổ thể C4 và C2 để tạo ra C3 convertaza C4b2b (Kawasaki *et al.*, *J. Biochem* 106:483-489 (1989); Matsushita & Fujita, *J. Exp Med.* 176:1497-1502 (1992); Ji *et al.*, *J. Immunol* 150:571-578 (1993)).

Cho đến nay, phức hợp MBL-MASP proenzym được coi là chỉ chứa một loại proteaza (MASP-1), nhưng hiện nay đã rõ ràng là có hai proteaza riêng biệt khác (tức là, MASP-2 và MASP-3) cũng liên quan đến MBL (Thiel *et al.*, *Nature* 386:506-510 (1997); Dahl *et al.*, *Immunity* 15:127-135 (2001)), cũng như protein huyết thanh bổ sung 19 kDa, được đề cập đến là "MAp19" hoặc "sMAP" (Stover *et al.*, *J. Immunol* 162:3481-3490 (1999); Stover *et al.*, *J. Immunol* 163:6848-6859 (1999); Takahashi *et al.*, *Int. Immunol* 11:859-63 (1999)).

MAp19 là sản phẩm gen ghép thay thế của gen cấu trúc đối với MASP-2 và thiếu bốn miền đầu tận C của MASP-2, bao gồm miền serin endopeptidaza. Thể phiên

mã mARN đã cắt cụt và được biểu hiện ở mức dư thừa mà mã hóa MAp19 được tạo ra bởi sự kiện ghép/polyadenyl hóa thay thế của gen MASP-2. Bằng cơ chế tương tự, gen MASP-1/3 tạo ra ba sản phẩm gen chính, hai serin proteaza MASP-1 và MASP-3 và sản phẩm gen đã cắt cụt 44 kDa được đề cập đến là "MAp44" (Degn *et al.*, *J. Immunol* 183(11):7371-8 (2009); Skjoedt *et al.*, *J Biol Chem* 285:8234-43 (2010)).

MASP-1 đầu tiên được mô tả là thành phần P-100 proteaza của yếu tố phản ứng với huyết thanh Ra, hiện được coi là phức hợp gồm có MBL cộng với MASP (Matsushita *et al.*, *Colectins and Innate Immunity*, (1996); Ji *et al.*, *J Immunol* 150:571-578 (1993). Khả năng của endopeptidaza liên quan đến MBL trong phức hợp MBL-MASP trong việc tác động lên thành phần bổ thể C4 và C2 theo cách giống hệt một cách rõ ràng với tác động của C1s enzym trong phức hợp C1q–$(C1r)_2$–$(C1s)_2$ của con đường cổ điển của bổ thể đề xuất rằng có phức hợp MBL–MASPs tương tự về mặt chức năng với phức hợp C1q–$(C1r)_2$–$(C1s)_2$. Phức hợp C1q–$(C1r)_2$–$(C1s)_2$ được hoạt hóa bởi sự tương tác giữa C1q với vùng Fc của IgG hoặc IgM kháng thể có mặt trong phức hợp miễn dịch. Điều này mang lại sự tự hoạt hóa cho C1r proenzym, từ đó, hoạt hóa C1s proenzym mà sau đó tác động đến thành phần bổ thể C4 và C2.

Hóa học lượng pháp của phức hợp MBL-MASP khác với hóa học lượng pháp được phát hiện ra đối với phức hợp C1q–$(C1r)_2$–$(C1s)_2$ ở chỗ các MBL oligome khác nhau có vẻ kết hợp với MASP-1/MAp19 hoặc MASP-2/MASP-3 với các tỷ lệ khác nhau (Dahl *et al.*, Immunity 15:127-135 (2001). Phần lớn MASP và MAp19 được tìm thấy trong huyết thanh không được tạo phức hợp với MBL (Thiel *et al.*, *J Immunol* 165:878-887 (2000)) và có thể kết hợp một phần với ficolin, nhóm lectin vừa được mô tả mà có miền giống fibrinogen có thể liên kết với các gốc N-axetylglucosamin trên bề mặt vi khuẩn (Le *et al.*, *FEBS Lett* 425:367 (1998); Sugimoto *et al.*, *J. Biol Chem* 273:20721 (1998)). Trong số đó, L-ficolin, H-ficolin và M-ficolin của người kết hợp với MASP cũng như với MAp19 và có thể hoạt hóa con đường lectin khi liên kết với cấu trúc hydrat cacbon cụ thể được nhận diện bởi ficolin (Matsushita *et al.*, *J Immunol* 164:2281-2284 (2000); Matsushita *et al.*, *J*

Immunol 168:3502-3506 (2002)). Ngoài ficolin và MBL, lectin colectin giống MBL, gọi là CL-11, đã được nhận biết là phân tử nhận diện con đường lectin (Hansen et al. *J Immunol* 185:6096-6104 (2010); Schwaeble et al. *PNAS* 108:7523-7528 (2011)). Có bằng chứng rõ rệt nhấn mạnh tầm quan trọng sinh lý của các phân tử nhận diện hydrat cacbon thay thế này và do đó quan trọng là nên hiểu rằng MBL không phải là thành phần nhận diện duy nhất của con đường hoạt hóa lectin và sự thiếu hụt MBL không có sai sót đối với thiếu hụt con đường lectin. Sự tồn tại có thể có của dãy phức hợp nhận diện hydrat cacbon thay thế liên quan về mặt cấu trúc với MBL có thể mở rộng phổ cấu trúc vi khuẩn mà khởi phát đáp ứng trực tiếp của hệ miễn dịch bẩm sinh thông qua sự hoạt hóa của bổ thể.

Tất cả các phân tử nhận diện con đường lectin được đặc trưng bởi mô-típ liên kết MASP cụ thể trong vùng thân đồng nhất colagen của chúng (Wallis et al. *J. Biol Chem* 279:14065-14073 (2004)). Điểm liên kết MASP trong MBL, CL-11 và ficolin được đặc trưng bởi mô-típ riêng biệt trong miền này: Hyp-Gly-Lys-Xaa-Gly-Pro, trong đó Hyp là hydroxyprolin và Xaa thường là gốc béo. Đột biến điểm trong trình tự này phá vỡ sự liên kết MASP.

1. Cấu trúc tương ứng, trình tự, vị trí nhiễm sắc thể và biến thể ghép của MASP-1 và MASP-3

Fig.2 là sơ đồ đại cương minh họa cấu trúc miền của MASP-1 polypeptit của người (SEQ ID NO:8), MASP-3 polypeptit của người (SEQ ID NO:2) và MAp44 polypeptit của người và các exon mã hóa chúng. Như được thể hiện trên Fig.2, serin proteaza MASP-1 và MASP-3 gồm có sáu miền riêng biệt được bố trí như được tìm thấy trong C1r và C1s; tức là, (I) miền C1r/C1s/VEGF nhím biển/protein hình thái xương (hoặc CUBI) đầu tận N; (II) miền giống yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF); (III) miền CUB thứ hai (CUBII); (IV và V) hai miền protein kiểm soát bổ thể (CCP1 và CCP2); và (VI) miền serin proteaza (SP).

Trình tự axit amin thu được từ cADN của MASP-1 người và chuột nhắt (Sato *et al.*, *Int Immunol* 6:665-669 (1994); Takada *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*

196:1003-1009 (1993); Takayama *et al.*, *J. Immunol* 152:2308-2316 (1994)), MASP-2 người, chuột nhắt, và chuột cống (Thiel *et al.*, *Nature* 386:506-510 (1997); Endo *et al.*, *J Immunol* 161:4924-30 (1998); Stover *et al.*, *J. Immunol* 162:3481-3490 (1999); Stover *et al.*, *J. Immunol* 163:6848-6859 (1999)), cũng như MASP-3 người (Dahl *et al.*, *Immunity* 15:127-135 (2001)) chỉ ra rằng các proteaza này là serin peptidaza có bộ ba đặc trưng của gốc His, Asp và Ser trong miền xúc tác giả định của chúng (Số gia nhập ngân hàng gen: MASP-1 của người: BAA04477.1 (SEQ ID NO:8); MASP-1 của chuột nhắt: BAA03944; MASP-1 của chuột cống: AJ457084; MASP-3 của người: AAK84071 (SEQ ID NO:2); MASP-3 của chuột nhắt: AB049755, như được gia nhập trên Ngân hàng gen vào ngày 2/15/2012 (SEQ ID NO:3); MASP-3 của chuột cống (SEQ ID NO:4); MASP-3 của gà (SEQ ID NO:5); MASP-3 của thỏ (SEQ ID NO:6); và khỉ đuôi dài (SEQ ID NO:7).

Như cũng được thể hiện trên Fig.2, khi chuyển hóa zymogen thành dạng có hoạt tính, chuỗi nặng (alpha, hoặc chuỗi A) và chuỗi nhẹ (beta, hoặc chuỗi B) được phân chia để thu được chuỗi A liên kết bằng disulphua và chuỗi B nhỏ hơn tượng trưng cho miền serin proteaza. Proenzym MASP-1 chuỗi đơn được hoạt hóa (giống proenzym C1r và C1s) bằng cách phân cắt liên kết Arg-Ile nằm giữa miền CCP thứ hai (miền V) và miền serin proteaza (miền VI). Proenzym MASP-2 và MASP-3 được coi là được hoạt hóa theo cách tương tự với proenzym của MASP-1. Mỗi MASP protein tạo ra homodime và kết hợp một cách riêng rẽ với MBL và ficolin theo cách phụ thuộc vào Ca^{++}.

MASP-1 polypeptit của người (SEQ ID NO:8) và MASP-3 polypeptit của người (SEQ ID NO:2) bắt nguồn từ một gen cấu trúc (Dahl *et al.*, *Immunity* 15:127-135 (2001), đã được sắp xếp đến vùng 3q27–28 của nhánh dài của nhiễm sắc thể 3 (Takada *et al.*, *Genomics* 25:757-759 (1995)). Thể phiên mã mARN của MASP-3 và MASP-1 được tạo ra từ thể phiên mã sơ cấp bằng quy trình ghép/polyadenyl hóa thay thế. Sản phẩm dịch mã MASP-3 gồm có chuỗi alpha, chung cho cả MASP-1 và MASP-3, và chuỗi beta (miền serin proteaza), là duy nhất cho MASP-3. Như được thể hiện trên Fig.2, gen MASP-1 của người bao gồm 18 exon. cADN của MASP-1

của người được mã hóa bởi exon 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17 và 18. Như cũng được thể hiện trên Fig.2, gen MASP 3 của người bao gồm mười hai exon. cADN của MASP-3 của người (được nêu trong SEQ ID NO:1) được mã hóa bởi các exon 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 và 12. Việc ghép thay thế thu được protein gọi là protein liên quan đến MBL 44 ("MAp44)", bắt nguồn từ exon 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 và 9.

MASP-1 polypeptit của người (SEQ ID NO: 8 từ Ngân hàng gen BAA04477.1) có 699 gốc axit amin, bao gồm peptit dẫn hướng có 19 gốc. Khi peptit dẫn hướng được bỏ qua, thì phân tử khối tính được của MASP-1 là 76976 Da. Như được thể hiện trên Fig.2, trình tự axit amin của MASP-1b chứa bốn điểm glycosyl hóa liên kết với N. Các miền của protein MASP-1 của người (tham khảo SEQ ID NO:8) được thể hiện trên Fig.2 và bao gồm miền C1r/C1s/VEFG nhím biển/protein hình thái xương (CUBI) đầu tận N (aa 25-137 có SEQ ID NO:8), miền giống yếu tố sinh trưởng biểu bì (aa 139-181 có SEQ ID NO:8), miền CUB thứ hai (CUBII) (aa 185-296 có SEQ ID NO:8), cũng như thể tiếp đôi của miền protein kiểm soát bổ thể (CCP1 aa 301-363 và CCP2 aa 367-432 có SEQ ID NO:8) và miền serin proteaza (aa 449-694 có SEQ ID NO:8).

MASP-3 polypeptit của người (SEQ ID NO:2, từ Ngân hàng gen AAK84071) có 728 gốc axit amin (như được thể hiện trên Fig.3), bao gồm peptit dẫn hướng có 19 gốc (được thể hiện dưới dạng các gốc axit amin được gạch chân trên Fig.3).

Khi peptit dẫn hướng được bỏ qua, thì phân tử khối tính được của MASP-3 là 81873 Da. Như được thể hiện trên Fig.2, có bảy điểm glycosyl hóa liên kết với N trong MASP-3. Các miền của protein MASP-3 của người (tham khảo SEQ ID NO:2) được thể hiện trên Fig.2 và bao gồm miền C1r/C1s/VEGF nhím biển/protein hình thái xương (CUBI) đầu tận N (aa 25-137 có SEQ ID NO:2), miền giống yếu tố sinh trưởng biểu bì (aa 139-181 có SEQ ID NO:2), miền CUB thứ hai (CUBII) (aa 185-296 có SEQ ID NO:2), cũng như thể tiếp đôi của miền protein kiểm soát bổ thể (CCP1 aa 299-363 và CCP2 aa 367-432 có SEQ ID NO:2) và miền serin proteaza (aa 450-728 có SEQ ID NO:2).

Sản phẩm dịch mã MASP-3 gồm có chuỗi alpha (chuỗi nặng), chứa miền CUB-1-EGF-CUB-2-CCP-1-CCP-2 (chuỗi alpha: aa 1-448 có SEQ ID NO:2) là chung cho cả MASP-1 và MASP-3, và chuỗi nhẹ (chuỗi beta: aa 449-728 có SEQ ID NO:2), chứa miền serin proteaza, là duy nhất cho MASP-3.

2. So sánh trình tự axit amin của MASP-3 từ các loài khác nhau

Fig.4 là sự sắp xếp thẳng hàng MASP-3 từ nhiều loài thể hiện sự so sánh protein MASP-3 chiều dài đầy đủ từ người (SEQ ID NO:2), khỉ đuôi dài (SEQ ID NO:7), chuột cống (SEQ ID NO:4), chuột (SEQ ID NO:3), gà (SEQ ID NO:5) và thỏ (SEQ ID NO:6). Fig.5 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng nhiều loài của miền serin proteaza (SP) từ người (aa 450-728 có SEQ ID NO:2); thỏ (aa 450-728 có SEQ ID NO:6); chuột (aa aa455-733 có SEQ ID NO:3); chuột cống (aa 455-733 có SEQ ID NO:4) và gà (aa aa448-730 có SEQ ID NO:5).

Như được thể hiện trên Fig.4, có sự bảo toàn trình tự axit amin của MASP-3 polypeptit ở mức cao giữa các loài khác nhau, đặc biệt là trong miền SP (Fig.5). Như cũng được thể hiện trên Fig.5, bộ ba xúc tác (H ở gốc 497; D ở gốc 553 và S ở gốc 664 dựa trên MASP-3 chiều dài đầy đủ của người (SEQ ID NO:2) được bảo toàn trên các loài. Bảng 1 tóm tắt phần trăm đồng nhất của miền MASP-3 SP trên các loài.

Bảng 1: Phần trăm đồng nhất của miền MASP-3 SP trên các loài

	Cyno	Thỏ	Chuột cống	Chuột nhắt	Gà
Người	95%	94%	92%	91%	79%
Cyno		94%	90%	90%	79%
Thỏ			92%	92%	81%
Chuột cống				97%	78%
Chuột nhắt					78%

MASP-3 không có hoạt tính phân hủy protein đối với các cơ chất C4, C2 hoặc C3. Ngược lại, MASP-3 được báo cáo từ đầu là hoạt động như chất ức chế của con đường lectin (Dahl et al., *Immunity* 15:127-135 (2001)). Kết luận này có thể thay đổi do trái ngược với MASP-1 và MASP-2, MASP-3 không phải là enzym tự hoạt hóa (Zundel S. et al., *J Immunol* 172:4342-4350 (2004); Megyeri et al., *J. Biol. Chem.* 288:8922–8934 (2013).

Gần đây, bằng chứng về chức năng sinh lý có thể có của MASP-1 và MASP-3 thu được từ các nghiên cứu ở chuột nhắt chuyển gen bằng cách sử dụng chủng chuột nhắt có sự thiếu hụt MASP-1 và MASP-3 kết hợp. Trong khi chuột nhắt bất hoạt MASP-1/3 có con đường lectin chức năng (Schwaeble et al., *PNAS* 108:7523-7528 (2011)), chúng có vẻ thiếu hoạt tính con đường nhánh (Takahashi et al., *JEM* 207(1):29-37 (2010)). Sự thiếu hoạt tính con đường nhánh có vẻ là do sự thiếu hụt xử lý của yếu tố bổ thể D, mà cần thiết cho hoạt tính con đường nhánh. Trong chuột nhắt bất hoạt MASP-1/3, tất cả các yếu tố D tuần hoàn ở dạng tiền bất hoạt phân hủy protein, trong khi đó trong huyết thanh của chuột nhắt bình thường, về cơ bản là tất cả yếu tố D đều ở dạng có hoạt tính. Phân tích hóa sinh đề xuất rằng MASP-1 có thể có khả năng chuyển hóa yếu tố bổ thể D từ dạng zymogen của nó thành dạng có hoạt tính enzym của nó (Fig.32; Takahashi et al., *JEM* 207(1):29-37 (2010)). MASP-3 cũng phân cắt tiền yếu tố D zymogen và sản sinh ra yếu tố D có hoạt tính *in vitro* (Fig.32; Takahashi et al., *JEM* 207(1):29-37 (2010)). Yếu tố D có mặt dưới dạng enzym có hoạt tính trong hệ tuần hoàn ở các cá thể bình thường, và MASP-1 và MASP-3, cũng như HTRA-1, có thể chịu trách nhiệm về sự hoạt hóa này. Ngoài ra, chuột nhắt có sự thiếu hụt MBL và ficolin kết hợp vẫn tạo ra các nồng độ bình thường của yếu tố D và có con đường nhánh chức năng đầy đủ. Vì thế, các chức năng sinh lý này của MASP-1 và MASP-3 không nhất thiết phải liên quan đến lectin, và vì thế không liên quan đến con đường lectin. MASP-3 tái tổ hợp của chuột nhắt và người dường như là cũng phân cắt yếu tố B và hỗ trợ sự kết lắng C3 trên *S. aureus in vitro* (Fig.29; Iwaki D. et al., *J Immunol* 187(7):3751-8 (2011)).

Vai trò sinh lý ngoài mong đợi đối với MASP-3 thu được từ các nghiên cứu gần đây ở các bệnh nhân có hội chứng 3MC (trước đó được gọi là hội chứng Carnevale, Mingarelli, Malpuech, and Michels; OMIM # 257920). Các bệnh nhân này biểu hiện các bất thường tiến triển nghiêm trọng, bao gồm khe hở vòm miệng, khe hở môi, dị tật sọ não và thiểu năng trí tuệ. Phân tích di truyền nhận biết được ở bệnh nhân 3MC là thuần nhất đối với gen MASP-3 loạn chức năng (Rooryck et al., *Nat Genet.* 43(3):197-203 (2011)). Một nhóm bệnh nhân 3MC khác được phát hiện

ra là thuần nhất đối với đột biến trong gen MASP-1 mà dẫn đến việc không có protein MASP-1 và MASP-3 chức năng. Một nhóm bệnh nhân 3MC khác nữa thiếu gen CL-11 chức năng. (Rooryck et al., *Nat Genet*. 43(3):197-203 (2011)). Vì thế, trục CL-11 MASP-3 có vẻ là có vai trò trong quá trình phát triển phôi. Cơ chế phân tử của con đường phát triển này là không rõ. Tuy nhiên, cơ chế này có thể không được điều tiết bởi quy trình điều khiển bởi bổ thể thông thường do các cá thể có thiếu hụt thành phần bổ thể chung C3 không phát triển hội chứng này. Vì thế, trước phát hiện của các tác giả sáng chế, như được mô tả trong bản mô tả này, vai trò chức năng đối với MASP-3 trong quá trình hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin chưa được thiết lập trước đó.

Cấu trúc của mảnh xúc tác của MASP-1 và MASP-2 đã được xác định bằng kỹ thuật sắc ký tinh thể tia X. Việc so sánh cấu trúc của miền MASP-1 proteaza với các miền của proteaza bổ thể khác cho thấy nền tảng của độ đặc hiệu cơ chất linh hoạt của nó (Dobó et al., *J. Immunol* 183:1207-1214 (2009)). Trong khi khả năng tiếp cận của rãnh liên kết cơ chất của MASP-2 bị hạn chế bởi các vòng bề mặt (Harmat et al., *J Mol Biol* 342:1533-1546 (2004)), thì MASP-1 có túi liên kết cơ chất mở giống với túi của trypsin thay vì các proteaza bổ thể khác. Tính chất như thrombin của cấu trúc MASP-1 là vòng lớn 60 axit amin khác thường (vòng B), vòng này có thể tương tác với các cơ chất. Một đặc điểm thú vị khác của cấu trúc MASP-1 là cầu muối bên trong giữa S1 Asp189 và Arg224. Cầu muối tương tự có thể được tìm thấy trong túi liên kết cơ chất của yếu tố D, mà có thể điều hòa hoạt tính proteaza của nó. C1 và MASP-2 có độ đặc hiệu cơ chất gần như giống hệt. Ngạc nhiên là, một số vòng trong số tám vòng bề mặt của MASP-2, xác định độ đặc hiệu cơ chất, có cấu dạng khá khác nhau so với các cấu dạng của C1. Điều này có nghĩa là hai enzym liên quan về mặt chức năng tương tác với các cơ chất giống nhau theo cách khác. Cấu trúc của zymogen MASP-2 thể hiện miền proteaza bất hoạt có lỗ oxyanion bị phá vỡ và túi liên kết cơ chất (Gál et al., *J Biol Chem* 280:33435-33444 (2005)). Ngạc nhiên là, zymogen MASP-2 thể hiện hoạt tính đáng kể trên cơ chất protein lớn, C4. Có thể là cấu trúc của zymogen MASP-2 khá linh hoạt, thúc đẩy sự chuyển tiếp giữa dạng bất

hoạt và dạng có hoạt tính. Tính linh hoạt này, mà được phản ánh trong cấu trúc, có thể có vai trò trong quá trình tự hoạt hóa.

Phân tích thẩm tách Bắc chỉ ra rằng gan là nguồn chính của mARN của MASP-1 và MASP-2. Bằng cách sử dụng đầu dò cADN đặc hiệu 5' đối với MASP-1, thể phiên mã MASP-1 chính được thấy ở 4,8 kb và một thể nhỏ ở khoảng 3,4 kb, cả hai thể này đều có mặt ở gan người và gan chuột nhắt (Stover et al., *Genes Immunity* 4:374-84 (2003)). mARN của MASP-2 (2,6 kb) và mARN của MAp19 (1,0 kb) được biểu hiện nhiều trong mô gan. MASP-3 được biểu hiện trong gan, và cũng trong nhiều mô khác, bao gồm mô thần kinh (Lynch N. J. et al., *J Immunol* 174:4998-5006 (2005)).

Bệnh nhân có tiền sử bệnh lây nhiễm và bệnh viêm mạn tính được phát hiện ra là có dạng MASP-2 đột biến không có khả năng tạo ra phức hợp MBL–MASP có hoạt tính (Stengaard-Pedersen et al., *N Engl J Med* 349:554-560 (2003)). Một số nhà nghiên cứu đã xác định rằng sự thiếu hụt MBL kéo theo khuynh hướng lây nhiễm thường xuyên ở trẻ em (Super *et al.*, *Lancet* 2:1236-1239 (1989); Garred *et al.*, *Lancet* 346:941-943 (1995) và tính kháng lây nhiễm HIV giảm (Nielsen *et al.*, *Clin Exp Immunol* 100:219-222 (1995); Garred *et al.*, *Mol Immunol* 33 (suppl 1):8 (1996)). Tuy nhiên, các nghiên cứu khác không cho thấy sự tương quan ý nghĩa giữa hàm lượng MBL thấp với sự gia tăng lây nhiễm (Egli et al., PLoS One. 8(1):e51983 (2013); Ruskamp et al., J Infect Dis. 198(11):1707-13 (2008); Israëls et al., Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 95(6):F452-61 (2010)). Trong khi tài liệu này được kết hợp, sự thiếu hụt, hoặc không sử dụng MASP có thể có tác động bất lợi đến khả năng của cá thể trong việc thiết lập ngay lập tức hàng rào không phụ thuộc vào kháng thể kháng một số mầm bệnh nhất định.

Dữ liệu hỗ trợ cho cách hiểu mới, nhấn mạnh các điều kiện thử nghiệm truyền thống mà không có Ca^{++} và các kết quả thu được bằng cách sử dụng bộ điều kiện sinh lý hơn bao gồm Ca^{++}

Một vài bằng chứng thử nghiệm chặt chẽ và độc lập được nêu trong bản mô

tả này hướng đến kết luận rằng đường hoạt hóa con đường lectin của bổ thể sẽ hoạt hóa bổ thể thông qua hai cơ chế tác động độc lập: i) LEA-2: con đường điều khiển bởi MASP-2 điều tiết quá trình opsonin hóa điều khiển bởi bổ thể, hướng hóa chất (Schwaeble et al., *PNAS* 108:7523-7528 (2011)), và quá trình phân hủy tế bào, và ii) LEA-1: đường hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-3 mới mà khởi phát quá trình hoạt hóa bổ thể bằng cách tạo ra convertaza con đường nhánh C3bBb thông qua quá trình phân cắt và hoạt hóa của yếu tố B trên bề mặt chất hoạt hóa, sau đó xúc tác quá trình kết lắng C3b và hình thành của convertaza con đường nhánh C3bBb, có thể dẫn đến việc phân hủy tế bào cũng như opsonin hóa vi khuẩn. Ngoài ra, như được mô tả trong bản mô tả này, việc hoạt hóa không phụ thuộc vào lectin riêng rẽ của yếu tố B và/hoặc yếu tố D bởi MASP-1, MASP-3, hoặc HTRA-1, hoặc việc kết hợp bất kỳ của ba dạng này, cũng có thể dẫn đến việc hoạt hóa bổ thể thông qua con đường nhánh.

Sự hoạt hóa điều khiển bởi MASP-3 phụ thuộc vào con đường lectin của con đường nhánh có vẻ là đóng góp vào quá trình phân cắt qua trung gian yếu tố D đã được thiết lập tốt của yếu tố B liên kết C3b để đạt được tốc độ hoạt hóa tối ưu đối với sự phân hủy phụ thuộc vào bổ thể thông qua đợt hoạt hóa cuối cùng để phân hủy tế bào vi khuẩn thông qua quá trình hình thành phức hợp tấn công màng (MAC) C5b-9 trên bề mặt tế bào (Fig.12-Fig.13). Sự kiện bị hạn chế tốc độ này có vẻ là đòi hỏi sự kết hợp tối ưu do nó có thiếu sót khi không có hoạt tính chức năng MASP-3 cũng như khi không có hoạt tính chức năng yếu tố D. Như được mô tả trong các ví dụ từ 1 đến 4 ở đây, các tác giả sáng chế phát hiện ra chức năng của con đường lectin phụ thuộc vào MASP-3 này khi nghiên cứu kiểu hình của thiếu hụt MASP-2 và ức chế MASP-2 trong mô hình chuột nhắt thử nghiệm khi lây nhiễm *N. menigitidis*. Chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 hướng đích gen và chuột nhắt loại dại được điều trị bằng chất ức chế MASP-2 dựa trên kháng thể có tính kháng cao đối với lây nhiễm *N. meningitidis* thử nghiệm (xem Fig.6-Fig.10). Khi liều lây nhiễm được điều chỉnh để đạt được tỷ lệ chết khoảng 60% ở các con loại dại đẻ cùng một lứa, thì tất cả các con chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 hoặc đã rút cạn MASP-2 không còn bị nhiễm bệnh và sống sót (xem Fig.6 và Fig.10). Mức độ kháng cực kỳ cao này được phản ánh ở sự

gia tăng đáng kể hoạt tính diệt khuẩn của huyết thanh trong huyết thanh của chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 hoặc đã rút cạn MASP-2. Các thử nghiệm khác nữa cho thấy rằng hoạt tính diệt khuẩn này phụ thuộc vào quá trình phân hủy vi khuẩn điều khiển bởi con đường nhánh. Huyết thanh chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B, hoặc yếu tố D, hoặc C3 không thể hiện hoạt tính diệt khuẩn đối với *N. meningitidis*, chỉ ra rằng con đường nhánh là thiết yếu để điều khiển đợt hoạt hóa cuối cùng. Kết quả đáng ngạc nhiên là huyết thanh chuột nhắt thiếu hụt MBL-A và MBL-C (cả hai đều là phân tử nhận diện con đường lectin mà nhận diện *N. meningitidis*) cũng như huyết thanh chuột nhắt thiếu hụt serin proteaza liên quan đến con đường lectin MASP-1 và MASP-3 mất toàn bộ hoạt tính phân hủy vi khuẩn đối với *N. meningitidis* (Fig.13). Tài liệu gần đây (Takahashi M. et al., *JEM* 207: 29-37 (2010)) và nghiên cứu trình bày trong bản mô tả này (Fig.32) cho thấy rằng MASP-1 có thể chuyển hóa dạng zymogen của yếu tố D thành dạng có hoạt tính enzym của nó và có thể giải thích phần nào sự mất hoạt tính phân hủy thông qua sự vắng mặt của yếu tố D có hoạt tính enzym trong các huyết thanh này. Điều này không giải thích cho việc thiếu hoạt tính diệt khuẩn ở chuột nhắt thiếu hụt MBL do các con chuột nhắt này có yếu tố D có hoạt tính enzym bình thường (Banda et al., *Mol Imunol* 49(1-2):281-9 (2011)). Đáng chú ý là, khi thử nghiệm huyết thanh của người từ các bệnh nhân có rối loạn liệt gen thể nhiễm sắc định hình 3MC dạng hiếm (Rooryck C, et al., *Nat Genet*. 43(3):197-203) có các đột biến khiến cho miền serin proteaza của MASP-3 loạn chức năng, thì không có hoạt tính diệt khuẩn kháng *N. meningitidis* nào có thể phát hiện được (n.b.: các huyết thanh này có MASP-1 và yếu tố D, nhưng không có MASP-3).

Giả thuyết rằng huyết thanh của người cần có hoạt tính phụ thuộc vào MASP-3 điều tiết bởi con đường lectin để phát triển hoạt tính diệt khuẩn được củng cố hơn nữa nhờ việc quan sát thấy rằng huyết thanh của người thiếu hụt MBL cũng không thể phân hủy *N. meningitidis* (các hình vẽ từ Fig.11 đến Fig.12). MBL là phân tử nhận diện con đường lectin duy nhất của người liên kết với mầm bệnh này. Do MASP-3 không tự hoạt hóa, các tác giả sáng chế giả thiết rằng hoạt tính phân hủy vi khuẩn trong huyết thanh thiếu hụt MASP-2 cao hơn có thể được giải thích bằng sự

hoạt hóa ưu tiên của MASP-3 thông qua MASP-1 do, khi không có MASP-2, tất cả các phức hợp hoạt hóa con đường lectin liên kết với bề mặt vi khuẩn sẽ được nạp MASP-1 hoặc MASP-3. Do MASP-3 đã được hoạt hóa phân cắt cả yếu tố D (Fig.32) và yếu tố B để tạo ra các dạng có hoạt tính enzym tương ứng của chúng *in vitro* (Fig.30 và Iwaki D., et al., *J. Immunol.*187(7):3751-3758 (2011)), nên chức năng khả thi nhất của MASP-3 là tạo điều kiện cho việc hình thành C3 convertaza của con đường nhánh (tức là, C3bBb).

Trong khi bắt buộc phải có dữ liệu về vai trò phụ thuộc vào lectin, nhiều thử nghiệm đề xuất rằng MASP-3 và MASP-1 không nhất thiết phải là bắt buộc để có chức năng trong phức hợp với phân tử lectin. Các thử nghiệm như vậy được thể hiện trên Fig.28B cho thấy khả năng của MASP-3 trong việc hoạt hóa con đường nhánh (như được thể hiện bằng sự kết lắng C3b trên *S. aureus*) trong các điều kiện (tức là, sự có mặt của EGTA) trong đó các phức hợp với lectin không có mặt. Fig.28A cho thấy rằng sự kết lắng trong các điều kiện này phụ thuộc vào yếu tố B, yếu tố D, và yếu tố P, tất cả các thành phần quan trọng của con đường nhánh. Ngoài ra, sự hoạt hóa yếu tố D bởi MASP-3 và MASP-1 (Fig.32), và sự hoạt hóa yếu tố B bởi MASP-3 (Fig.30) có thể diễn ra *in vitro* khi không có lectin. Cuối cùng, các nghiên cứu về sự tan máu ở hồng cầu chuột nhắt khi có mặt huyết thanh của người cho thấy vai trò rõ rệt đối với cả MBL và MASP-3 đối với việc phân hủy tế bào. Tuy nhiên, sự thiếu hụt MBL không tái lập hoàn toàn độ nghiêm trọng khi thiếu hụt MASP-3, trái ngược với sự thiếu hụt được mong đợi nếu tất cả các MASP-3 chức năng được tạo phức với MBL. Vì thế, các tác giả sáng chế không mong muốn bị ràng buộc bởi khái niệm là tất cả các vai trò đối với MASP-3 (và MASP-1) được thể hiện ở đây đều có thể được quy cho chức năng liên quan đến lectin một cách riêng rẽ.

Sự nhận biết về hai nhánh tác động của con đường lectin, cũng như chức năng không phụ thuộc vào lectin có thể có của MASP-1, MASP-3, và HTRA-1, là cơ hội mới cho các can thiệp trị liệu để điều trị một cách hiệu quả các mầm gây bệnh cho người đã được xác định gây ra bởi sự hoạt hóa bổ thể dư thừa khi có mặt mầm bệnh vi khuẩn hoặc tế bào chủ đã thay đổi hoặc chất lắng chuyển hóa. Như được mô tả

trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, khi không có mặt MASP-3 và khi có mặt MASP-1, con đường nhánh không được hoạt hóa trên cấu trúc bề mặt (xem Fig.15-Fig.16, Fig.28B, Fig.34-Fig.35A,B, Fig.38-Fig.39). Do con đường nhánh này quan trọng trong quá trình điều khiển sự kiện hạn chế tốc độ dẫn đến sự phân hủy vi khuẩn cũng như phân hủy tế bào (Mathieson PW, et al., *J Exp Med* 177(6):1827-3 (1993)), các kết quả của họ cho thấy rằng MASP-3 đã được hoạt hóa đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính phân hủy của bổ thể. Như được thể hiện trên Fig.12-Fig.13, Fig.19-Fig.21, Fig.36-Fig.37, và Fig.39-Fig.40, trong huyết thanh của bệnh nhân 3MC thiếu MASP-3 nhưng không thiếu MASP-1, đợt hoạt hóa phân hủy cuối cùng của bổ thể bị thiếu hụt. Dữ liệu được thể hiện trên Fig.12 và Fig.13 thể hiện sự mất hoạt tính phân hủy vi khuẩn khi không có mặt hoạt tính chức năng MASP-3 và/hoặc MASP-1/MASP-3. Tương tự, sự mất hoạt tính tan máu trong huyết thanh của người thiếu hụt MASP-3 (Fig.19-Fig.21, Fig.36-Fig.37 và Fig.39-Fig.40), kết hợp với khả năng khôi phục sự tan máu bằng cách bổ sung MASP-3 tái tổ hợp (Fig.39-Fig.40), củng cố một cách mạnh mẽ cho kết luận rằng sự hoạt hóa của con đường nhánh trên bề mặt đích (cần thiết để điều khiển quá trình phân hủy qua trung gian bổ thể) phụ thuộc vào sự có mặt của MASP-3 đã được hoạt hóa. Do đó, dựa trên cách hiểu mới về con đường lectin được nêu chi tiết ở trên, sự hoạt hóa con đường nhánh của bề mặt đích phụ thuộc vào LEA-1, và/hoặc sự hoạt hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và/hoặc yếu tố D, mà cũng được điều tiết bởi MASP-3, và từ đó, các chất ngăn chặn sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 sẽ ngăn chặn sự hoạt hóa con đường nhánh trên bề mặt đích.

Phần mô tả về vai trò thiết yếu của quá trình khởi phát hoạt hóa con đường nhánh phụ thuộc vào MASP-3 chỉ ra rằng con đường nhánh này không phải là con đường hoạt hóa bổ thể độc lập, tồn tại một mình như được mô tả trong hầu như tất cả các giáo trình y học hiện có và các tạp chí gần đây đề cập đến bổ thể. Quan điểm khoa học nắm bắt rộng rãi hiện nay là con đường nhánh được hoạt hóa trên bề mặt của một số đích cụ thể (vi khuẩn, zymosan, và hồng cầu thỏ) thông qua việc lan rộng sự hoạt hóa "dè dặt" C3 tự phát. Tuy nhiên, việc không có sự hoạt hóa con đường

nhánh bất kỳ trong huyết thanh của chuột nhắt thiếu hụt cả MASP-1 và MASP-3 và huyết thanh người bệnh 3MC trên cả đĩa được phủ zymosan và hai vi khuẩn khác nhau (*N. meningitidis* và *S. aureus*), và việc giảm sự tan máu trong hồng cầu ở huyết thanh thiếu hụt MASP-3 từ người và chuột nhắt chỉ ra rằng việc khởi phát sự hoạt hóa con đường nhánh trên các bề mặt này đòi hỏi MASP-3 chức năng. Vai trò bắt buộc đối với MASP-3 có thể phụ thuộc vào lectin hoặc không phụ thuộc vào lectin, và dẫn đến việc hình thành C3 convertaza của con đường nhánh và phức hợp C5, tức là C3bBb và C3bBb(C3b)n, một cách tương ứng. Vì thế, các tác giả sáng chế đã nêu ra sự tồn tại của đường khởi phát khó nắm bắt trước đó của con đường nhánh trong bản mô tả này. Đường khởi phát này phụ thuộc vào (i) LEA-1, nhánh hoạt hóa mới được phát hiện ra của con đường lectin, và/hoặc (ii) vai trò không phụ thuộc vào lectin của protein MASP-3, MASP-1, và HTRA-1.

3. Sử dụng chất ức chế MASP-3 để điều trị các bệnh và tình trạng bệnh lý liên quan đến con đường nhánh

Như được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao (ví dụ, có ái lực liên kết thấp hơn 500 pM) đã cho thấy là ức chế hoàn toàn con đường nhánh ở đối tượng là động vật có vú như loài gặm nhấm và động vật không phải linh trưởng ở nồng độ mol thấp hơn nồng độ của đích MASP-3 (ví dụ, ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb) (xem trong các ví dụ từ 11 đến 21). Như được mô tả trong Ví dụ 11, việc sử dụng liều đơn của kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao, mAb 13B1, cho chuột nhắt dẫn đến việc loại bỏ gần như hoàn toàn hoạt tính tổng thể của bổ thể con đường nhánh trong ít nhất 14 ngày. Như cũng được mô tả trong Ví dụ 12, trong nghiên cứu được thực hiện trong mô hình động vật được thiết lập tốt liên quan đến PNH, đã chứng minh được rằng mAb 13B1 cải thiện một cách đáng kể khả năng sống sót của tế bào hồng cầu giống PNH và bảo vệ tế bào hồng cầu giống PNH tốt hơn đáng kể so với việc ức chế mà C5 làm được. Như được mô tả trong Ví dụ 13, cũng được cho thấy rằng mAb 13B1 làm giảm tỷ lệ mắc và độ nghiêm trọng của bệnh ở mô hình chuột nhắt mắc bệnh viêm khớp. Các kết quả trong ví dụ này cho thấy rằng mAb ức chế MASP-3 có

ái lực cao tiêu biểu 13B1, 10D12 và 4D5 có hiệu quả cao trong việc phong bế con đường nhánh ở động vật linh trưởng. Việc dùng liều đơn của mAb 13B1, 10D12 hoặc 4D5 cho khỉ đuôi dài dẫn đến việc loại bỏ duy trì hoạt tính con đường nhánh tổng thể kéo dài trong khoảng 16 ngày. Mức độ loại bỏ con đường nhánh ở khỉ đuôi dài được điều trị bằng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao là tương đương với mức độ loại bỏ đạt được nhờ phong bế yếu tố D *in vitro* và *in vivo*, chỉ ra sự phong bế hoàn toàn sự chuyển hóa của yếu tố D bởi kháng thể ức chế MASP-3. Do đó, mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao có tính hữu ích trị liệu trong điều trị bệnh cho các bệnh nhân mắc bệnh liên quan đến siêu hoạt tính của con đường nhánh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế con đường nhánh ở đối tượng là động vật có vú cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng này dùng chế phẩm chứa kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với miền serin proteaza của MASP-3 của người (các gốc axit amin từ 450 đến 728 của SEQ ID NO:2) với ái lực cao (có K_D thấp hơn 500 pM), ở lượng có tác dụng để ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh ở đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng này mắc bệnh hoặc rối loạn liên quan đến con đường nhánh, (tức là, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tăng hoạt tính của con đường nhánh), như ví dụ, hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD, bao gồm AMD ướt và khô), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, chứng đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS), ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) hoặc TMA liên quan đến cấy ghép), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân

máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ, như được mô tả thêm dưới đây.

A. Vai trò của MASP-3 trong bệnh hemoglobin niệu kịch phát ban đêm và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Tổng quan về PNH

Hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), đôi khi còn được đề cập đến là hội chứng Marchiafava-Micheli, là bệnh tiềm ẩn mắc phải đe dọa sự sống của máu. PNH có thể tự phát triển, được đề cập đến là "PNH nguyên phát" hoặc trong ngữ cảnh các rối loạn tủy xương khác như thiếu máu không tái tạo, được đề cập đến là "PNH thứ phát." Phần lớn các trường hợp là PNH nguyên phát. PNH được đặc trưng bởi sự phá hủy do bổ thể cảm ứng của các tế bào hồng cầu (tan máu), số lượng tế bào hồng cầu thấp (thiếu máu), chứng huyết khối và suy tủy xương. Các kết quả thu được trong phòng thử nghiệm về PNH cho thấy sự thay đổi nhất quán với chứng thiếu máu tan máu nội mạch: hemoglobin thấp, lactat dehydrogenaza tăng, số lượng hồng cầu lưới tăng (tế bào hồng cầu chưa thuần thục được giải phóng bởi tủy xương để thay thế tế bào bị phá hủy), bilirubin tăng (sản phẩm bị phá hủy của hemoglobin), khi không có kháng thể liên kết RBC tự phản ứng là nguyên nhân có thể có.

Dấu hiệu đặc trưng của PNH là sự tan máu mạn tính qua trung gian bổ thể do sự hoạt hóa đã được điều hòa tăng của thành phần bổ thể tận cùng gây ra, bao gồm phức hợp tấn công màng, trên bề mặt của RBC tuần hoàn. RBC của PNH trải qua sự hoạt hóa bổ thể không kiểm soát được và sự tan máu do không có mặt chất điều hòa bổ thể CD55 và CD59 trên bề mặt của chúng (Lindorfer, M.A., et al., *Blood* 115(11):2283-91 (2010), Risitano, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011)). CD55 và CD59 được biểu hiện nhiều trên RBC bình thường và kiểm soát sự hoạt hóa bổ thể. CD55 hoạt động như chất điều hòa âm của con đường nhánh, ức chế sự tổ hợp của phức hợp C3 convertaza của con đường nhánh (C3bBb)

và thúc đẩy sự phân rã của convertaza tạo thành trước đó, vì thế ngăn chặn sự hình thành của phức hợp tấn công màng (MAC). CD59 ức chế phức hợp tấn công màng của bổ thể một cách trực tiếp bằng cách liên kết phức hợp C5b678 và ngăn chặn việc C9 liên kết và polyme hóa.

Trong khi tình trạng tan máu và thiếu máu là dấu hiệu lâm sàng nổi bật của PNH, bệnh này là rối loạn huyết học phức tạp mà còn bao gồm chứng huyết khối và suy tủy xương là một phần kết quả lâm sàng (Risitano et al, Mini Reviews in Med Chem, 11:528-535 (2011)). Ở cấp độ phân tử, PNH là do sự lan rộng dòng vô tính bất thường của các tế bào gốc tạo máu thiếu gen PIG A chức năng gây ra. PIG A là gen liên kết với X mã hóa glycosyl-phosphatidyl inositol transferaza cần thiết cho sự biểu hiện ổn định trên bề mặt của glycoprotein nhóm A neo GPI, bao gồm CD55 và CD59. Đối với nguyên nhân hiện có trong nghiên cứu, tế bào gốc tạo máu có gen PIG A loạn chức năng phát sinh do kết quả của đột biến soma tự phát có thể trải qua quá trình lan rộng dòng vô tính đến điểm mà thế hệ con của chúng cấu thành một phần đáng kể của tập hợp tế bào tạo máu ngoại vi. Dù cả hồng cầu và thế hệ lympho bào của dòng vô tính tế bào gốc đột biến đều thiếu CD55 và CD59, chỉ có RBC trải qua quá trình phân hủy hiển nhiên sau khi chúng đi vào hệ tuần hoàn.

Việc điều trị hiện có đối với PNH bao gồm truyền máu đối với chứng thiếu máu, chống đông máu đối với chứng huyết khối và sử dụng kháng thể đơn dòng eculizumab (Soliris®), kháng thể này bảo vệ tế bào máu để không phá hủy miễn dịch bằng cách ức chế hệ thống bổ thể (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med.* 350(6):552-559 (2004)). Eculizumab (Soliris®) là kháng thể đơn dòng được làm giống như của người hướng đích thành phần bổ thể C5, ngăn chặn sự phân cắt của nó bởi C5 convertaza, từ đó ngăn chặn sự sản sinh C5a và sự tổ hợp MAC. Việc điều trị cho các bệnh nhân mắc PNH bằng eculizumab dẫn đến việc làm giảm sự tan máu nội mạch, như được đo bằng lactat dehydrogenaza (LDH), dẫn đến sự ổn định hemoglobin và không phụ thuộc vào truyền máu ở khoảng một nửa số bệnh nhân (Risitano et al, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11(6) (2011)). Dù là gần như tất cả các bệnh nhân đều trải qua liệu pháp với eculizumab đạt được mức LDH bình thường hoặc gần như bình

thường (do kiểm soát được tình trạng tan máu nội mạch), chỉ có khoảng một phần ba số bệnh nhân đạt giá trị hemoglobin khoảng 11gr/dL, và các bệnh nhân còn lại sử dụng eculizumab tiếp tục cho thấy tình trạng thiếu máu từ trung bình đến nghiêm trọng (tức là, phụ thuộc vào việc truyền máu), ở các tỷ lệ gần bằng nhau (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Như được mô tả trong tài liệu Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011), đã chứng minh được rằng các bệnh nhân mắc PNH sử dụng eculizumab chứa mảnh C3 liên kết với các hồng cầu PNH của chúng với các lượng lớn (trong khi các bệnh nhân không được điều trị thì không). Kết quả này dẫn đến việc nhận ra rằng ở các bệnh nhân mắc PNH được điều trị bằng Soliris, RBC của PNH mà không bao giờ tan máu nữa do phong bế C5 có thể tích tụ mảnh C3 liên kết màng với lượng dồi dào, mà hoạt động như opsonin, dẫn đến việc bẫy chúng trong tế bào lưới nội mô thông qua thụ thể C3 cụ thể và tình trạng tan máu ngoại mạch sau đó. Vì thế, trong khi ngăn chặn tình trạng tan máu nội mạch và di chứng mắc phải, liệu pháp eculizumab chuyển hướng một cách đơn giản sự bố trí của các RBC này từ tan máu nội mạch sang tan máu ngoại mạch, dẫn đến việc tình trạng thiếu máu còn lại về cơ bản chưa được điều trị ở nhiều bệnh nhân (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Do đó, các chiến lược trị liệu ngoài việc sử dụng eculizumab là cần thiết cho các bệnh nhân đang phát triển tình trạng tan máu ngoại mạch qua trung gian mảnh C3, do họ tiếp tục cần được truyền tế bào hồng cầu. Các phương pháp hướng đích mảnh C3 như vậy cho thấy tính hữu ích trong các hệ thống thử nghiệm (Lindorfer et al., *Blood* 115:2283-91, 2010).

Cơ chế khởi phát bổ thể trong PNH

Liên kết nguyên nhân giữa sự biểu hiện trên bề mặt thiếu hụt của các chất điều hòa bổ thể âm CD55 và CD59 trong PNH, kết hợp với độ hiệu nghiệm của eculizumab trong việc ngăn chặn chứng tan máu nội mạch, xác định một cách rõ ràng PNH là tình trạng bệnh lý được điều tiết bởi hệ thống bổ thể. Mặc dù mô hình này được chấp nhận rộng rãi, bản chất của các sự kiện khởi phát sự hoạt hóa bổ thể, và (các) con đường hoạt hóa bổ thể có liên quan vẫn chưa được giải quyết. Do CD55 và

CD59 điều hòa âm bước khuếch đại cuối cùng trong đợt bổ thể chung cho tất cả các con đường khởi phát bổ thể, sự thiếu hụt các phân tử này sẽ dẫn đến sự hình thành quá mức và sự hợp nhất màng của các phức hợp tấn công màng, bất kể rằng sự hoạt hóa bổ thể được khởi phát bởi con đường lectin, bởi con đường cổ điển hay bởi sự luân chuyển tự phát của con đường nhánh. Vì thế, ở các bệnh nhân mắc PNH, sự kiện hoạt hóa bổ thể bất kỳ mà dẫn đến sự kết lắng bề mặt RBC của C3b có thể khởi phát tình trạng khuếch đại sau đó và tình trạng tan máu bệnh lý (nội mạch và/hoặc ngoại mạch) và thúc đẩy cơn tan máu. Cách hiểu cơ học rõ ràng về các sự kiện phân tử khởi phát cơn tan máu ở các bệnh nhân mắc PNH vẫn khó nắm bắt. Do không có sự kiện khởi phát bổ thể nào là rõ rệt một cách công khai ở các bệnh nhân mắc PNH trải qua cơn tan máu, nên quan điểm phổ biến là sự hoạt hóa bổ thể trong PNH có thể diễn ra tự phát do sự hoạt hóa "dè dặt" ở mức thấp của con đường nhánh, mà sau đó được lan rộng bởi sự kiểm soát không thích hợp sự hoạt hóa bổ thể tận cùng do thiếu CD55 và CD59.

Tuy nhiên, quan trọng là cần phải lưu ý rằng trong lịch sử tự nhiên của nó, PNH thường phát triển hoặc gia tăng sau một số sự kiện nhất định, như lây nhiễm hoặc tổn thương (Risitano, *Biologics* 2:205-222 (2008)), mà đã cho thấy là khởi phát sự hoạt hóa bổ thể. Đáp ứng hoạt hóa bổ thể này không phụ thuộc vào tính miễn dịch ưu tiên của vật chủ đối với mầm bệnh kích động, và do đó có thể không bao gồm con đường cổ điển. Thay vào đó, có vẻ là đáp ứng hoạt hóa bổ thể này được khởi phát bằng cách liên kết lectin với mô hình hydrat cacbon ngoại lai hoặc "tự thay đổi" được biểu hiện trên bề mặt của tác nhân vi khuẩn hoặc mô chủ bị phá hủy. Vì thế, các sự kiện thúc đẩy cơn tan máu trong PNH có liên kết chặt chẽ với sự hoạt hóa bổ thể được khởi phát thông qua lectin. Điều này khiến cho con đường hoạt hóa lectin có khả năng rất cao là tạo ra tác nhân khởi phát mà cuối cùng dẫn đến tình trạng tan máu ở các bệnh nhân mắc PNH.

Bằng cách sử dụng mầm bệnh đã được xác định rõ mà hoạt hóa bổ thể thông qua lectin làm mô hình thử nghiệm để phân chia các đợt hoạt hóa ở cấp độ phân tử, các tác giả sáng chế cho thấy rằng, tùy vào vi khuẩn kích thích, sự hoạt hóa bổ thể

có thể được khởi phát bởi LEA-2 hoặc LEA-1, dẫn đến sự opsonin hóa và/hoặc sự phân hủy. Nguyên tắc giống như vậy của đáp ứng kép (tức là, sự opsonin hóa và/hoặc sự phân hủy) đối với sự kiện khởi phát lectin cũng có thể áp dụng vào các dạng tác nhân lây nhiễm khác, hoặc áp dụng vào sự hoạt hóa bổ thể bởi lectin sau tổn thương mô đối với vật chủ, hoặc các sự kiện hoạt hóa bổ thể điều khiển bởi lectin khác mà có thể thúc đẩy PNH. Trên cơ sở tính đối ngẫu này trong con đường lectin, các tác giả sáng chế suy ra rằng sự hoạt hóa bổ thể được khởi phát bởi LEA-2- và/hoặc LEA-1 ở các bệnh nhân mắc PNH thúc đẩy sự opsonin hóa và/hoặc sự phân hủy của RBC bằng C3b và sự tan máu ngoại mạch và nội mạch sau đó. Do đó, trong thiết lập của bệnh PNH, việc ức chế cả LEA-1 và LEA-2 được mong đợi để điều trị cả tình trạng tan máu nội mạch và ngoại mạch, mang lại ưu điểm có ý nghĩa so với chất ức chế C5 eculizumab.

Đã xác định được rằng, việc phơi nhiễm với *S. pneumoniae* ưu tiên khởi phát sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin của LEA-2, dẫn đến sự opsonin hóa của vi khuẩn này với C3b. Do *S. pneumonia* chống lại tình trạng phân hủy điều tiết bởi MAC, nên sự thanh thải từ hệ tuần hoàn của nó diễn ra thông qua sự opsonin hóa với C3b. Sự opsonin hóa này và sự loại bỏ sau đó khỏi hệ tuần hoàn phụ thuộc vào LEA-2, như được chỉ ra bởi đối chứng vi khuẩn bị tổn thương ở chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 và ở chuột nhắt được điều trị bằng các kháng thể đơn dòng MASP-2 (*PLOS Pathog.*, 8: e1002793. (2012)).

Trong quá trình xác định vai trò của LEA-2 trong các đáp ứng vật chủ bẩm sinh với tác nhân vi khuẩn, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm các mầm bệnh bổ sung. Kết quả khác biệt một cách đáng ngạc nhiên được quan sát thấy khi *Neisseria meningitidis* được nghiên cứu dưới dạng sinh vật mô hình. *N. meningitidis* cũng hoạt hóa bổ thể thông qua lectin, và sự hoạt hóa bổ thể là cần phải có để ngăn chặn lây nhiễm *N. meningitidis* ở vật chủ chưa qua thí nghiệm. Tuy nhiên, LEA-2 không đóng vai trò chức năng bảo vệ vật chủ trong đáp ứng này: như được thể hiện trên Fig.6 và Fig.7, sự phong bế LEA-2 thông qua sự loại bỏ di truyền của MASP-2 không làm giảm khả năng sống sót sau khi nhiễm *N. meningitidis*. Ngược lại, sự phong bế LEA-

2 nhờ loại bỏ MASP-2 cải thiện một cách đáng kể khả năng sống sót (Fig.6 và Fig.7) cũng như điểm ốm yếu (Fig.9) trong các nghiên cứu này. Sự phong bế LEA-2 bằng cách sử dụng kháng thể MASP-2 đạt được kết quả giống như vậy (Fig.10), loại bỏ tác động thứ cấp hoặc bổ sung ở chủng chuột nhắt bất hoạt ở dạng nguyên nhân có thể có. Các kết quả có ích này ở động vật đã loại bỏ LEA-2 có liên quan đến sự loại bỏ nhanh hơn nữa của *N. meningitidis* khỏi máu (Fig.8). Tương tự, như được mô tả trong bản mô tả này, việc ủ *N. meningitidis* với huyết thanh bình thường của người làm tiêu diệt *N. meningitidis* (Fig.11). Việc bổ sung kháng thể đơn dòng chức năng đặc hiệu đối với MASP-2 của người phong bế LEA-2, nhưng không sử dụng kháng thể đơn dòng đối chứng isotyp, có thể làm tăng cường đáp ứng tiêu diệt này. Tuy nhiên, quy trình này phụ thuộc vào lectin và ít nhất một hệ thống bổ thể có một phần chức năng, dưới dạng huyết thanh của người thiếu hụt MBL hoặc huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt không thể tiêu diệt *N. meningitidis* (Fig.11). Tóm lại, các kết quả mới này đề xuất rằng lây nhiễm *N. meningitidis* khi có mặt hệ thống bổ thể chức năng được kiểm soát bởi con đường hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin nhưng không phụ thuộc vào LEA-2.

Giả thuyết rằng LEA-1 có thể là con đường bổ thể chịu trách nhiệm về sự tiêu diệt phụ thuộc vào lectin của *N. meningitidis* được thử nghiệm bằng cách sử dụng mẫu huyết thanh từ bệnh nhân 3MC. Bệnh nhân này là thuần nhất đối với đột biến vô nghĩa trong exon 12 của gen MASP-1/3. Do đó, bệnh nhân này thiếu protein MASP-3 chức năng, nhưng mặt khác lại đủ bổ thể (exon 12 đặc hiệu đối với thể phiên mã MASP-3; đột biến này không có tác động gì đến chức năng hay mức độ biểu hiện MASP-1) (xem tài liệu *Nat Genet* 43(3):197-203 (2011)). Huyết thanh bình thường của người tiêu diệt một cách hiệu quả *N. meningitidis*, nhưng huyết thanh bất hoạt bằng nhiệt thiếu hụt MBL (một trong các phân tử nhận diện cho con đường lectin) và huyết thanh thiếu hụt MASP-3 thì không thể tiêu diệt *N. meningitidis* (Fig.12). Vì thế, LEA-1 có vẻ là điều tiết sự tiêu diệt *N. meningitidis*. Kết quả này được xác nhận bằng cách sử dụng các mẫu huyết thanh từ chủng chuột nhắt bất hoạt. Trong khi huyết thanh chuột nhắt bình thường chứa bổ thể dễ dàng tiêu diệt *N.*

meningitidis, thì huyết thanh chuột nhắt thiếu hụt MBL hoặc thiếu hụt MASP-1/3 không hiệu quả như huyết thanh bất hoạt bằng nhiệt mà thiếu bổ thể chức năng (Fig.13). Ngược lại, huyết thanh thiếu hụt MASP-2 biểu hiện sự tiêu diệt hiệu quả *N. meningitidis*.

Các kết quả này cung cấp bằng chứng cho tính đối ngẫu chưa được biết tính đến nay trong con đường lectin bằng cách tiết lộ sự tồn tại của con đường hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin LEA-2 và LEA-1 riêng rẽ. Trong các ví dụ được nêu chi tiết ở trên, LEA-2 và LEA-1 không dư thừa và điều tiết các kết quả chức năng riêng biệt. Dữ liệu này đề xuất rằng một số dạng chất hoạt hóa con đường lectin nhất định (bao gồm, nhưng không giới hạn ở *S. pneumoniae*) ưu tiên khởi phát sự hoạt hóa bổ thể thông qua LEA-2 dẫn đến sự opsonin hóa, trong khi các dạng khác (ví dụ như *N. meningitidis*) ưu tiên khởi phát sự hoạt hóa bổ thể thông qua LEA-1 và thúc đẩy quá trình phân hủy tế bào. Tuy nhiên, dữ liệu này không nhất thiết phải hạn chế LEA-2 ở quá trình opsonin hóa và LEA-1 ở quá trình phân hủy tế bào, do cả hai con đường này trong các thiết lập khác đều có thể điều tiết quá trình opsonin hóa và/hoặc phân hủy.

Trong ngữ cảnh hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin bởi *N. meningitidis*, nhánh LEA-2 và nhánh LEA-1 có vẻ là cạnh tranh với nhau, do sự phong bế LEA-2 làm tăng cường sự phá hủy phân hủy phụ thuộc vào LEA-1 của sinh vật *in vitro* (Fig.13). Như được nêu chi tiết ở trên, kết quả này có thể được giải thích bởi việc phức hợp lectin MASP-1 có nhiều khả năng nằm trong phạm vi lân cận gần với phức hợp lectin MASP-3 hơn khi không có MASP-2, mà sẽ tăng cường sự hoạt hóa LEA-1 và từ đó thúc đẩy sự phân hủy *N. meningitides* hiệu quả hơn. Do sự phân hủy *N. meningitidis* là cơ chế bảo vệ chính ở vật chủ chưa qua thí nghiệm, nên sự phong bế LEA-2 *in vivo* làm tăng độ thanh thải *N. meningitidis* và dẫn đến việc tăng cường tiêu diệt.

Mặc dù các ví dụ được nêu ở trên minh họa các tác dụng đối lập của LEA-2 và LEA-1 đối với các kết quả sau khi nhiễm *N. meningitidis*, vẫn có thể có các thiết lập khác khi cả LEA-2 và LEA-1 đều có thể hiệp đồng để mang lại một kết quả nhất

định. Như được mô tả chi tiết dưới đây, trong các trường hợp khác về sự hoạt hóa bổ thể bệnh lý thông qua lectin như các trường hợp có mặt trong quá trình hoạt hóa bổ thể điều khiển bởi PNH, LEA-2- và LEA-1 có thể kết hợp theo cách hiệp đồng để góp phần vào bệnh lý tổng thể của PNH. Ngoài ra, như được mô tả trong bản mô tả này, MASP-3 cũng góp phần vào quá trình chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và yếu tố D, có thể diễn ra khi không có Ca++, thường dẫn đến sự chuyển hóa C3bB thành C3bBb và tiền yếu tố D thành yếu tố D, mà cũng có thể góp phần vào bệnh lý của PNH.

Hoạt tính sinh học và hoạt tính chức năng được mong đợi ở PNH

Phần này mô tả các tác dụng ức chế sự phong bế LEA-2 và LEA-1 đến sự tan máu ở mô hình *in vitro* của PNH. Các kết quả này củng cố tính hữu ích của chất phong bế LEA-2 (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể liên kết với và phong bế chức năng của MASP-2) và chất phong bế LEA-1 (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể liên kết với và phong bế chức năng hoạt hóa qua trung gian MASP-1 của MASP-3, MASP-3, hoặc cả hai) trong việc điều trị cho đối tượng mắc một hoặc nhiều dạng của bệnh PNH, và cả việc sử dụng chất ức chế LEA-2 và/hoặc LEA-1, và/hoặc sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3, không phụ thuộc vào lectin (bao gồm chất ức chế MASP-2, chất ức chế MASP-3, và chất ức chế MASP-2/MASP-3 hoặc MASP-1/MASP-2 đặc hiệu kép hoặc hai đặc hiệu, và chất ức chế MASP-1/MASP-2/MASP-3 đặc hiệu pan) để cải thiện các tác động của tình trạng tan máu ngoại mạch qua trung gian mảnh C3 ở các bệnh nhân mắc PNH trải qua liệu pháp bằng chất ức chế C5 như eculizumab.

Chất ức chế MASP-2 ngăn chặn tình trạng opsonin hóa và tan máu ngoại mạch của PNH RBC thông qua hệ lưới nội mô

Như được nêu chi tiết ở trên, các bệnh nhân mắc PNH bắt đầu thiếu máu do hai cơ chế thanh thải RBC riêng biệt khỏi hệ tuần hoàn: tan máu nội mạch thông qua sự hoạt hóa của phức hợp tấn công màng (MAC), và tan máu ngoại mạch sau khi opsonin hóa bằng C3b và sự thanh thải sau đó sau khi liên kết và hấp thụ thụ thể bổ

thể bởi hệ lưới nội mô. Tình trạng tan máu nội mạch được ngăn chặn ở mức độ lớn khi bệnh nhân được điều trị bằng eculizumab. Do eculizumab phong bế cơ chế tác động phân hủy cuối cùng mà diễn ra theo chiều thuận với cả sự kiện hoạt hóa khởi phát bổ thể cũng như sự opsonin hóa kế tiếp, eculizumab không ngăn chặn tình trạng tan máu ngoại mạch (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Thay vào đó, RBC đã trải qua quá trình tan máu ở các bệnh nhân không được điều trị mắc PNH có thể tích tụ protein C3b đã được hoạt hóa trên bề mặt của chúng, mà gia tăng mức độ hấp thụ bởi hệ lưới nội mô và tăng cường mức độ tan máu ngoại mạch của chúng. Vì thế, việc điều trị bằng eculizumab chuyển hướng một cách có hiệu quả sự bố trí RBC từ tan máu nội mạch sang tan máu ngoại mạch tiềm ẩn. Do đó, một số bệnh nhân mắc PNH được điều trị bằng eculizumab vẫn thiếu máu. Do đó, các chất ngăn chặn sự hoạt hóa bổ thể ngược và ngăn chặn sự opsonin hóa của RBC của PNH có thể đặc biệt thích hợp để ngăn chặn tình trạng tan máu ngoại mạch đôi khi được phát hiện thấy bằng eculizumab.

Dữ liệu ở vi khuẩn được trình bày ở đây đề xuất rằng LEA-2 thường là đường nổi bật để opsonin hóa phụ thuộc vào lectin. Ngoài ra, khi mức độ opsonin hóa phụ thuộc vào lectin (được đo dưới dạng mức kết lắng C3b) được đánh giá trên ba bề mặt hoạt hóa lectin nguyên mẫu (mannan, Fig.17A; zymosan, Fig.17B, và S. pneumoniae; Fig.17C), thì LEA-2 có vẻ là đường nổi bật để opsonin hóa phụ thuộc vào lectin trong các điều kiện sinh lý (tức là, khi có mặt Ca^{++} trong đó tất cả các con đường bổ thể đang hoạt động). Trong các điều kiện thử nghiệm này, huyết thanh thiếu hụt MASP-2 (thiếu LEA-2) về cơ bản là ít hiệu quả hơn trong việc opsonin hóa bề mặt thử nghiệm so với huyết thanh WT. Huyết thanh thiếu hụt MASP-1/3 (thiếu LEA-1) cũng bị ảnh hưởng, mặc dù tác động này ít được bộc lộ hơn nhiều khi so với huyết thanh thiếu LEA-2. Mức độ đóng góp tương ứng của LEA-2 và LEA-1 vào quá trình opsonin hóa điều khiển bởi lectin còn được minh họa trên Fig.18A–Fig.18C. Trong khi con đường nhánh của bổ thể đã được báo cáo là hỗ trợ cho quá trình opsonin hóa của bề mặt hoạt hóa lectin khi không có con đường lectin hoặc con đường cổ điển (Selander et al., *J Clin Invest* 116(5):1425-1434 (2006)), thì con đường

nhánh khi phân lập (được đo trong điều kiện thử nghiệm không có Ca^{++}) về cơ bản có vẻ là ít hiệu quả hơn so với quy trình khởi phát bởi LEA-2- và LEA-1 được mô tả trong bản mô tả này. Bằng phép ngoại suy, dữ liệu này đề xuất rằng sự opsonin hóa của RBC của PNH tốt hơn là cũng có thể được khởi phát bởi LEA-2 và, đến phạm vi nhỏ hơn là, bởi LEA-1 (có thể được khuếch đại bởi con đường nhánh vòng khuếch đại), thay cho kết quả hoạt hóa con đường nhánh không phụ thuộc vào lectin. Do đó, chất ức chế LEA-2 có thể được mong đợi là có hiệu quả nhất trong việc hạn chế sự opsonin hóa và ngăn chặn tình trạng tan máu ngoại mạch trong PNH. Tuy nhiên, thực tế cho thấy rằng lectin, khác với MBL, như ficolin, liên kết với cấu trúc phi hydrat cacbon như protein được axetyl hóa, và MASP-3 tốt hơn là kết hợp với H-ficolin (Skjoedt et al., *Immunobiol.* 215:921-931, 2010), cũng để ngỏ khả năng có được vai trò ý nghĩa đối với LEA-1 trong quá trình opsonin hóa RBC liên quan đến PNH. Do đó, chất ức chế LEA-1 được mong đợi là có tác dụng chống opsonin hóa bổ sung, và việc kết hợp chất ức chế LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là tối ưu và điều tiết lợi ích điều trị mạnh nhất trong việc hạn chế sự opsonin hóa và sự tan máu ngoại mạch ở các bệnh nhân mắc PNH. Vì thế, LEA-2 và LEA-1 tác động theo hướng cộng hợp hoặc hiệp đồng để thúc đẩy sự opsonin hóa, và chất ức chế LEA-1/LEA-2 phản ứng chéo hoặc hai đặc hiệu được mong đợi là có hiệu quả nhất trong việc ngăn chặn sự opsonin hóa và sự tan máu ngoại mạch ở PNH.

Vai trò của chất ức chế MASP-3 trong PNH

Sử dụng mô hình *in vitro* của PNH, các tác giả sáng chế cho thấy rằng sự hoạt hóa bổ thể và sự tan máu thu được ở PNH thực sự được khởi phát bởi sự hoạt hóa LEA-2 và/hoặc LEA-1, và đó không phải là chức năng độc lập của con đường nhánh. Các nghiên cứu này sử dụng RBC nhạy mannan của các chủng chuột nhắt khác nhau, bao gồm RBC từ chuột nhắt thiếu hụt Crry (chất điều hòa âm quan trọng của con đường bổ thể tận cùng ở chuột nhắt) cũng như RBC từ chuột nhắt thiếu hụt CD55/CD59, thiếu các chất điều hòa bổ thể giống nhau mà không có ở các bệnh nhân mắc PNH). Khi RBC thiếu hụt Crry nhạy mannan được cho tiếp xúc với huyết thanh của người đủ bổ thể, thì RBC làm tan máu một cách hiệu quả ở nồng độ trong huyết

thanh bằng 3% (Fig.19 và Fig.20) trong khi huyết thanh đủ bổ thể (HI: được bất hoạt bằng nhiệt) không làm tan máu. Đáng chú ý, huyết thanh đủ bổ thể mà LEA-2 được phong bế bằng cách bổ sung kháng thể MASP-2 đã làm giảm hoạt tính tan máu, và 6% huyết thanh là cần thiết cho việc tan máu hiệu quả. Các quan sát tương tự cũng được thực hiện khi RBC thiếu hụt CD55/CD59 được thử nghiệm (Fig.22). Huyết thanh của người đủ bổ thể được bổ sung kháng thể đơn dòng MASP-2 (tức là, huyết thanh mà LEA-2 được ức chế) ít hiệu quả hơn trong việc hỗ trợ tan máu khoảng hai lần so với huyết thanh không được điều trị. Ngoài ra, huyết thanh được phong bế LEA-2 (tức là, được điều trị bằng kháng thể đơn dòng kháng MASP-2) với các nồng độ cao hơn là cần thiết để thúc đẩy sự tan máu hiệu quả của các WT RBC không được điều trị so với huyết thanh không được điều trị (Fig.21).

Thậm chí ngạc nhiên hơn nữa là, huyết thanh từ bệnh nhân 3MC thuần nhất đối với protein MASP-3 loạn chức năng (và do đó thiếu LEA-1) hoàn toàn không thể làm tan máu RBC thiếu hụt Crry nhạy mannan (Fig.20 và Fig.21). Một kết quả tương tự được quan sát thấy khi RBC bình thường không được làm nhạy được sử dụng: như được thể hiện trên Fig.21, huyết thanh thiếu hụt LEA-1 được phân lập từ bệnh nhân 3MC hoàn toàn không hiệu quả trong việc điều tiết sự tan máu. Tóm lại, dữ liệu này chỉ ra rằng, trong khi LEA-2 góp phần đáng kể vào đáp ứng tan máu nội mạch, thì LEA-1 là con đường khởi phát bổ thể chiếm ưu thế dẫn đến sự tan máu. Vì thế, trong khi chất phong bế LEA-2 được mong đợi là làm giảm đáng kể sự tan máu nội mạch của RBC ở các bệnh nhân mắc PNH, thì chất phong bế LEA-1 được mong đợi là có tác dụng tuyệt đối hơn và loại bỏ sự tan máu điều khiển bởi bổ thể ở mức độ lớn.

Cần lưu ý rằng huyết thanh của bệnh nhân 3MC thiếu hụt LEA-1 được sử dụng trong nghiên cứu này có con đường nhánh đã được thu hẹp lại nhưng có chức năng khi được thử nghiệm trong các điều kiện thử nghiệm con đường nhánh thông thường (Fig.15). Kết quả này đề xuất rằng LEA-1 mang lại sự đóng góp vào quá trình tan máu lớn hơn so với hoạt tính con đường nhánh như được định nghĩa theo cách thông thường trong thiết lập thử nghiệm của PNH này. Bằng cách suy luận, ngụ ý

rằng chất phong bế LEA-1 sẽ ít nhất là hiệu quả như các chất phong bế các dạng khác của con đường nhánh trong ngăn chặn hoặc điều trị chứng tan máu nội mạch ở các bệnh nhân mắc PNH.

Vai trò của chất ức chế MASP-2 trong PNH

Dữ liệu được trình bày ở đây đề xuất cơ chế gây bệnh thiếu máu sau đây ở PNH: sự tan máu nội mạch do sự hoạt hóa đã được điều hòa tăng của thành phần bổ thể tận cùng và sự phân hủy của RBC bằng cách hình thành MAC, được khởi phát chủ yếu, mặc dù không phải dành riêng, bởi LEA-1, và sự tan máu ngoại mạch gây ra bởi sự opsonin hóa của RBC bởi C3b, có vẻ là được khởi phát chủ yếu bởi LEA-2. Trong khi vai trò có thể thấy rõ đối với LEA-2 trong việc khởi phát sự hoạt hóa bổ thể và thúc đẩy sự hình thành MAC và sự tan máu là rõ ràng, quy trình này về cơ bản có vẻ ít hiệu quả hơn so với sự hoạt hóa bổ thể khởi phát bởi LEA-1 dẫn đến sự tan máu. Vì thế, chất phong bế LEA-2 được mong đợi là làm giảm đáng kể tình trạng tan máu nội mạch ở các bệnh nhân mắc PNH, mặc dù hoạt tính trị liệu này được mong đợi chỉ là một phần. Bằng cách so sánh, mong đợi là có sự giảm cơ bản hơn nữa mức độ tan máu nội mạch ở các bệnh nhân mắc PNH đối với chất phong bế LEA-1.

Tình trạng tan máu ngoại mạch, cơ chế phá hủy RBC ít đột ngột nhưng quan trọng không kém mà dẫn đến thiếu máu ở PNH, chủ yếu là kết quả của quá trình opsonin hóa bởi C3b, có vẻ là chủ yếu được điều tiết bởi LEA-2. Vì thế, chất phong bế LEA-2 có thể được mong đợi là ưu tiên ngăn chặn sự opsonin hóa RBC và sự tan máu ngoại mạch kế tiếp ở PNH. Hoạt tính trị liệu độc nhất này của chất phong bế LEA-2 được mong đợi là mang lại lợi ích điều trị có ý nghĩa cho tất cả các bệnh nhân mắc PNH do hiện không có liệu pháp điều trị nào tồn tại đối với các bệnh nhân mắc PNH trải qua quá trình bệnh lý này.

Chất ức chế LEA-2 dưới dạng điều trị bổ sung cho chất ức chế LEA-1 hoặc chất phong bế bổ thể tận cùng

Dữ liệu được trình bày ở đây nêu chi tiết về hai cơ chế gây bệnh đối với việc thanh thải RBC và thiếu máu ở PNH mà có thể được hướng đích, một cách riêng rẽ hoặc kết hợp, bởi các nhóm chất trị liệu riêng biệt: sự tan máu nội mạch được khởi phát chủ yếu, mặc dù không phải là dành riêng, bởi LEA-1 và vì thế được mong đợi là được ngăn chặn một cách hiệu quả bởi chất phong bế LEA-1, và tình trạng tan máu ngoại mạch do sự opsonin hóa C3b chủ yếu được điều khiển bởi LEA-2, và vì thế được ngăn chặn một cách hiệu quả bởi chất phong bế LEA-2.

Cũng được ghi chép rõ ràng trong tài liệu rằng cả cơ chế tan máu nội mạch và ngoại mạch đều dẫn đến thiếu máu ở các bệnh nhân mắc PNH (Risitano et al., *Blood* 113:4094-4100 (2009)). Do đó, được mong đợi rằng chất phong bế LEA-1 mà ngăn chặn tình trạng tan máu nội mạch kết hợp với chất phong bế LEA-2 mà chủ yếu là ngăn chặn tình trạng tan máu ngoại mạch sẽ hiệu quả hơn trong việc ngăn chặn hiện tượng thiếu máu phát triển ở các bệnh nhân mắc PNH so với một mình một trong hai chất này. Trên thực tế, việc kết hợp chất phong bế LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là ngăn chặn tất cả các cơ chế khởi phát bổ thể có liên quan ở PNH và vì thế ngăn chặn tất cả các triệu chứng thiếu máu ở PNH.

Cũng đã biết rằng chất phong bế C5 (như eculizumab) ngăn chặn một cách có hiệu quả tình trạng tan máu nội mạch nhưng không can thiệp vào quá trình opsonin hóa. Điều này khiến cho một số bệnh nhân mắc PNH được điều trị kháng C5 mắc chứng thiếu máu cơ bản còn lại do tình trạng tan máu ngoại mạch được điều tiết bởi LEA-2 vẫn chưa được điều trị. Do đó, mong đợi rằng chất phong bế C5 (như eculizumab) mà ngăn chặn tình trạng tan máu nội mạch kết hợp với chất phong bế LEA-2 mà làm giảm tình trạng tan máu ngoại mạch sẽ hiệu quả hơn trong việc ngăn chặn hiện tượng thiếu máu phát triển ở các bệnh nhân mắc PNH so với một mình một trong hai chất này.

Các chất khác mà phong bế vòng khuếch đại tận cùng của hệ thống bổ thể dẫn đến sự hoạt hóa C5 và sự kết lắng MAC (bao gồm, nhưng không giới hạn ở các chất phong bế properdin, yếu tố B hoặc yếu tố D hoặc tăng cường hoạt tính ức chế của yếu tố I, yếu tố H hoặc các yếu tố ức chế bổ thể khác) cũng được mong đợi là ức chế

tình trạng tan máu nội mạch. Tuy nhiên, các chất này không được mong đợi là can thiệp vào quá trình opsonin hóa qua trung gian LEA-2 ở các bệnh nhân mắc PNH. Điều này khiến cho một số bệnh nhân mắc PNH được điều trị bằng các chất như vậy mắc chứng thiếu máu cơ bản còn lại do tình trạng tan máu ngoại mạch được điều tiết bởi LEA-2 chưa được điều trị. Do đó, được mong đợi rằng việc điều trị bằng các chất như vậy nhằm ngăn chặn tình trạng tan máu nội mạch kết hợp với chất phong bế LEA-2 mà tối thiểu hóa tình trạng tan máu ngoại mạch sẽ hiệu quả hơn so với một mình một trong hai chất này trong việc ngăn chặn hiện tượng thiếu máu phát triển ở các bệnh nhân mắc PNH. Trên thực tế, việc kết hợp các chất này và chất phong bế LEA-2 được mong đợi là ngăn chặn tất cả các cơ chế phá hủy RBC có liên quan đến PNH và vì thế ngăn chặn tất cả các triệu chứng thiếu máu ở PNH.

Sử dụng kháng thể nhiều đặc hiệu, hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu pan của LEA-1 và LEA-2 để điều trị PNH

Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, và vì thế ngăn chặn kết hợp tất cả các sự kiện hoạt hóa bổ thể điều tiết tình trạng tan máu nội mạch cũng như tan máu ngoại mạch, được mong đợi là mang lại kết quả lâm sàng tốt nhất cho các bệnh nhân mắc PNH. Kết quả này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp sẽ phong bế một cách có hiệu quả tình trạng tan máu nội mạch cũng như tan máu ngoại mạch và ngăn chặn hiện tượng thiếu máu ở PNH. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và hạn chế LEA-2 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế thêm LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách

đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và hạn chế LEA-2 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế thêm LEA-2. Dựa trên độ tương tự ở trình tự và cấu trúc protein tổng thể, cũng có thể hình dung được rằng, kháng thể bình thường có hai điểm liên kết giống hệt có thể được phát triển mà liên kết đặc hiệu với MASP-1 và MASP-2 và MASP-3 theo hướng chức năng, vì thế đạt được sự phong bế chức năng LEA-1 và LEA-2. Kháng thể có hoạt tính ức chế pan-MASP như vậy được mong đợi là ngăn chặn cả tình trạng tan máu nội mạch cũng như tan máu ngoại mạch và vì thế điều trị một cách có hiệu quả hiện tượng thiếu máu ở các bệnh nhân mắc PNH.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như PNH.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển PNH bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ mắc PNH ở đối tượng đó.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm chứa lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ mắc PNH ở đối tượng đó, như, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258

hoặc SEQ ID NO:259, (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161. Theo một số phương án, dược phẩm này làm tăng khả năng sống sót của tế bào hồng cầu ở đối tượng mắc PNH. Theo một số phương án, trong đó đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển PNH có một hoặc nhiều triệu chứng được chọn từ nhóm bao gồm (i) dưới nồng độ hemoglobin bình thường, (ii) dưới nồng độ tiểu cầu bình thường; (iii) trên nồng độ hồng cầu lưới bình thường, và (iv) trên nồng độ bilirubin bình thường. Theo một số phương án, dược phẩm này được dùng toàn thân (ví dụ, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch hoặc dưới dạng chất xông hít) cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển PNH. Theo một số phương án, đối tượng mắc hoặc có nguy cơ PNH trước đó đã trải qua, hoặc hiện đang trải qua quá trình điều trị bằng chất ức chế bổ thể tận cùng mà ức chế sự phân cắt của protein bổ thể C5. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho đối tượng này dùng chất ức chế bổ thể tận cùng mà ức chế sự phân cắt của protein bổ thể C5. Theo một số phương án, chất ức chế bổ thể tận cùng là kháng thể kháng C5 được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một số phương án, chất ức chế bổ thể tận cùng là eculizumab.

B. Vai trò của MASP-3 trong bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già và các phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD) là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến suy giảm thị lực và mù ở người lớn tuổi và chiếm lên đến 50% số trường hợp mù ở các nước phát triển. Tỷ lệ hiện hành của AMD là khoảng 3% ở người trưởng thành và tăng lên theo độ tuổi để mà gần như hai phần ba dân số trên 80 tuổi sẽ có một số dấu hiệu. Ước tính được rằng có trên 1,75 triệu cá thể tại Hoa Kỳ có AMD tiến triển và tỷ lệ hiện hành đang tăng lên do độ tuổi của dân số và được dự đoán là đạt gần 3 triệu trước năm 2020 (Friedman, D.S., et al., Arch. Ophthalmol. 122:564-572, 2004). AMD là sự bất thường của biểu bì sắc tố võng mạc (retinal pigment epithelium-RPE) mà dẫn đến sự thoái hóa các thụ thể quang của võng mạc trung tâm đè lên, hoặc điểm vàng, và mất thị giác trung tâm. AMD dạng sớm và dạng giữa được đặc trưng bởi sự

kết lắng tiến triển của drusen, vật chất màu vàng chứa lipit, protein, lipoprotein, và mảnh vỡ tế bào, trong không gian dưới võng mạc liền kề với RPE, cùng với các bất thường sắc tố trong võng mạc. AMD tiến triển bao gồm hai dạng lâm sàng chia nhỏ: AMD teo địa lý phi thần kinh-mạch ('khô') và AMD tiết dịch thần kinh-mạch ('ướt'). Mặc dù AMD khô chiếm 80-90% số AMD tiến triển, phần lớn hiện tượng mất thị lực đột ngột và nghiêm trọng lại xuất hiện ở các bệnh nhân có AMD ướt. Chưa biết được liệu hai dạng AMD này là các kiểu hình khác nhau bắt nguồn từ các bệnh lý tương tự hay hai tình trạng bệnh lý riêng biệt. Hiện nay không có liệu pháp nào được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) phê duyệt để điều trị AMD khô. Các lựa chọn điều trị được FDA phê duyệt cho AMD ướt bao gồm tiêm trong thủy tinh thể các thuốc chống tạo mạch (ranibizumab, pegaptanib natri, aflibercept), liệu pháp laze, liệu pháp laze quang động, và kính viễn vọng cấy ghép.

Căn bệnh và sinh lý bệnh học của AMD là phức tạp và chưa hiểu được hoàn toàn. Một vài bằng chứng củng cố cho vai trò rối loạn điều hòa của hệ thống bổ thể trong quá trình sinh bệnh AMD. Các nghiên cứu liên quan đến gen đã nhận biết các locus gen liên quan đến AMD, bao gồm các gen mã hóa một phạm vi protein bổ thể, yếu tố, và chất điều hòa. Sự liên quan chặt chẽ nhất là với các dạng đa hình trong gen của yếu tố bổ thể H (CFH), với các đồng hợp tử biến thể Y402H có sự gia tăng nguy cơ phát triển AMD gấp khoảng 6 lần và dị hợp tử gấp khoảng 2,5 lần so với kiểu gen không có nguy cơ (Khandhadia, S., et al., *Immunobiol.* 217:127-146, 2012). Các đột biến trong các gen mã hóa con đường bổ thể khác cũng liên quan đến sự tăng hoặc giảm nguy cơ mắc AMD, bao gồm yếu tố bổ thể B (CFB), C2, C3, yếu tố I, và protein liên quan đến CFH 1 và 3 (Khandhadia et al.). Các nghiên cứu hóa mô miễn dịch và hệ protein ở mắt được hiến từ các bệnh nhân AMD cho thấy rằng protein của tầng bổ thể được làm tăng và nằm trong drusen (Issa, P.C., et al., Graefes. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249:163-174, 2011). Ngoài ra, các bệnh nhân AMD có sự hoạt hóa bổ thể tổng thể gia tăng như được đo trong máu ngoại biên (Issa et al., 2011, nêu trên).

Con đường nhánh của bổ thể có vẻ là liên quan đến quá trình sinh bệnh AMD nhiều hơn so với con đường cổ điển. C1q, thành phần nhận diện thiết yếu đối với sự

hoạt hóa của con đường cổ điển, không được phát hiện ra trong drusen bằng phân tích hóa mô miễn dịch (Mullins et al., *FASEB J.* 14:835 846, 2000; Johnson et al., *Exp. Eye Res.* 70:441 449, 2000). Các nghiên cứu liên quan đến di truyền bao gồm gen CFH và gen CFB. Các protein này liên quan đến vòng khuếch đại con đường nhánh, với CFH là chất ức chế pha lỏng và CFB là thành phần proteaza hoạt hóa của con đường nhánh. Biến thể Y402H của CFH ảnh hưởng đến sự tương tác với phối tử liên kết, bao gồm sự liên kết với protein phản ứng với C, heparin, M protein, và glycosaminoglycan. Sự liên kết đã thay đổi này với phối tử có thể làm giảm sự liên kết với bề mặt tế bào, từ đó có thể dẫn đến việc giảm sự thoái biến qua trung gian yếu tố I của mảnh hoạt hóa C3b và suy giảm sự điều hòa C3 convertaza nhánh, dẫn đến sự hoạt hóa quá mức của con đường nhánh (Khandhadia et al., 2012, nêu trên). Các biến thể trong gen CFB liên quan đến tác dụng bảo vệ để phát triển AMD. Biến thể chức năng fB32Q có ái lực liên kết với C3b ít hơn 4 lần so với biến thể nguy cơ fB32R, dẫn đến việc giảm sự hình thành C3 convertaza (Montes, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 106:4366-4371, 2009).

Cơ chế khởi phát bổ thể trong AMD

Các nghiên cứu về liên kết di truyền ở người được nêu ở trên đề xuất vai trò quan trọng đối với hệ thống bổ thể trong quá trình sinh bệnh AMD. Ngoài ra, sản phẩm hoạt hóa bổ thể cũng tồn tại với lượng lớn trong drusen (Issa, P.C., et al., Graefes. *Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249:163-174, 2011), một tổn thương bệnh lý đặc trưng ở cả AMD ướt và khô. Tuy nhiên, bản chất của các sự kiện khởi phát sự hoạt hóa bổ thể, và (các) con đường hoạt hóa bổ thể có liên quan vẫn chưa được hiểu một cách toàn vẹn.

Quan trọng là cần lưu ý rằng các kết lắng drusen gồm có mảnh vỡ tế bào và phế phẩm oxy hóa có nguồn gốc từ võng mạc tích tụ ở dưới RPE khi mắt già đi. Ngoài ra, ứng kích oxy hóa có vẻ là có vai trò quan trọng (Cai et al; *Front Biosci.*, 17:1976-95, 2012), và đã cho thấy là gây ra sự hoạt hóa bổ thể trong RPE (*J Biol Chem.*, 284(25):16939-47, 2009). Được hiểu một cách rộng rãi rằng cả ứng kích oxy hóa và tổn thương tế bào hoặc tổn thương mô đều hoạt hóa lectin trong hệ thống bổ

thể. Ví dụ, Collard et al. đã cho thấy rằng tế bào nội mô được tiếp xúc với ứng kích oxy hóa khởi phát sự kết lắng bổ thể ở mức nhiều được điều tiết bởi lectin (Collard CD et al., *Mol Immunol.*, 36(13-14):941-8, 1999; Collard C.D. et al., *Am J Pathol.*, 156(5):1549-56, 2000), và việc ngăn chặn sự liên kết lectin và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin làm cải thiện các kết quả trong mô hình thử nghiệm về tổn thương do ứng kích oxy hóa (Collard C.D. et al., *Am J Pathol.*,156(5):1549-56, 2000). Vì thế, có vẻ là có khả năng rằng phế phẩm oxy hóa có trong drusen cũng hoạt hóa bổ thể thông qua lectin. Bằng cách suy luận, sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin có thể có vai trò nòng cốt trong quá trình sinh bệnh AMD.

Vai trò của hệ thống bổ thể đã được đánh giá trong mô hình chuột nhắt mắc AMD. Trong mô hình chuột nhắt phá hủy nhẹ, mô hình thử nghiệm về sự thoái hóa thụ thể quang qua trung gian ứng kích oxy hóa, chuột nhắt bất hoạt có loại bỏ con đường cổ điển (C1qα-/- trên nền C57BL/6) có độ nhạy với sự phá hủy nhẹ tương tự so với các con loại dại đẻ cùng một lứa, trong khi đó việc loại bỏ yếu tố bổ thể D của con đường nhánh (CFD-/-) dẫn đến việc bảo vệ để tránh phá hủy nhẹ (Rohrer, B. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:5282-5289, 2007). Trong mô hình chuột nhắt về sự phân bố thần kinh-mạch trong màng mạch (CNV) được cảm ứng bởi kỹ thuật ngưng kết quang học laze của màng Bruch, chuột nhắt bất hoạt không có yếu tố bổ thể B (CFB-/-) được bảo vệ khỏi CNV so với chuột nhắt loại dại (Rohrer, B. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:3056-3064, 2009). Trong cùng mô hình đó, việc sử dụng trong tĩnh mạch dạng tái tổ hợp của yếu tố bổ thể H đã được hướng đích đến các điểm hoạt hóa bổ thể (CR2-fH) làm giảm mức độ CNV. Tác dụng bảo vệ này được quan sát xem liệu CR2-fH được sử dụng tại thời điểm tổn thương do laze hay trị liệu (sau tổn thương do laze). Phiên bản trị liệu cho người của CR2-fH (TT30) cũng hiệu nghiệm ở mô hình CNV của chuột (Rohrer, B. et al. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*,28:402-409, 2012). Do fB được hoạt hóa bởi LEA-1, và do MASP-1 và MASP-3 góp phần vào quá trình thuần thục của yếu tố D, nên các kết quả này chỉ ra rằng chất ức chế LEA-1 có thể có lợi ích trị liệu ở các bệnh nhân AMD. Ngoài ra, các kết quả được báo cáo từ nghiên cứu pha 2 gần đây đã cho thấy rằng việc tiêm trong thủy

tinh thể hằng tháng với Lampalizumab (trước đây được đề cập đến là FCFD4514S và kháng yếu tố D, là mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể đơn dòng được làm giống như của người được định hướng kháng yếu tố D) làm giảm sự tiến triển diện tích teo địa lý ở các bệnh nhân có tình trạng teo địa lý thứ phát đối với AMD (Yaspan B.L. et al., *Sci Transl. Med.* 9, Issue 395, June 21, 2017).

Các nghiên cứu thử nghiệm ban đầu ở mô hình loài gặm nhấm mắc AMD sử dụng chuột nhắt thiếu hụt MBL không hỗ trợ cho vai trò quan trọng đối với con đường lectin trong quá trình hoạt hóa bổ thể sinh bệnh (Rohrer et al., *Mol Immunol.* 48:e1-8, 2011). Tuy nhiên, MBL là duy nhất trong số một vài lectin, và các lectin khác với MBL có thể khởi phát sự hoạt hóa bổ thể trong AMD. Thực tế, nghiên cứu trước đó của các tác giả sáng chế đã cho thấy rằng MASP-2, serin proteaza hạn chế tốc độ thực sự cần thiết cho chức năng con đường lectin, đóng vai trò quan trọng trong AMD. Như được mô tả trong Patent Mỹ số 7919094 (được chỉ định cho Omeros Corporation), được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn, chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 và chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể MASP-2 được bảo vệ trong mô hình chuột nhắt có CNV được cảm ứng bằng laze, một mô hình tiền lâm sàng hợp lệ của AMD ướt (Ryan et al., *Tr Am Opth Soc LXXVII*:707-745, 1979). Vì thế, chất ức chế LEA-2 được mong đợi là ngăn chặn hiệu quả CNV và cải thiện các kết quả ở các bệnh nhân AMD.

Vì thế, theo như trên đây, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có lợi ích trị liệu độc lập trong AMD. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho phổ rộng hơn của nhóm con các bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (dạng ướt và khô) bằng cách sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP 1, chất ức chế MASP 3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP 1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc tình trạng bệnh lý như vậy. Chế phẩm ức chế MASP 1, MASP 3, hoặc MASP 1/3 có thể được sử dụng khu trú vào mắt, như bằng cách rửa, dùng trong thủy tinh thể, hoặc sử dụng chế phẩm dưới dạng gel, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ. Theo một cách khác, chất ức chế MASP 1, MASP 3, hoặc MASP 1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một phương án, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế còn bao gồm việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 ở đối tượng mắc bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3 hoặc MASP1/3 cho đối tượng cần điều trị. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện ở các bệnh nhân AMD khi so sánh với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và hoạt tính phong bế LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng

thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chế phẩm ức chế MASP 2 có thể được sử dụng khu trú vào mắt, như bằng cách rửa, tiêm trong thủy tinh thể hoặc sử dụng cục bộ chế phẩm dưới dạng gel, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ. Theo một cách khác, chất ức chế MASP 2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và tùy ý chế phẩm ức chế MASP 2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị AMD. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị AMD.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như AMD.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển AMD bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ

trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ mắc AMD ở đối tượng đó. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển AMD bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm chứa lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ mắc AMD ở đối tượng đó, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259, (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

C. Vai trò của MASP-3 trong tổn thương do tái tưới máu-thiếu máu cục bộ và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Thiếu máu cục bộ trong mô là cơ sở cho một phổ rộng các rối loạn lâm sàng. Mặc dù sự khôi phục theo thời gian của dòng máu là thiết yếu để bảo toàn mô thiếu máu cục bộ, từ lâu đã nhận ra rằng sự tái tưới máu, có thể diễn ra tự phát hoặc thông qua sự can thiệp trị liệu, có thể dẫn đến sự tổn thương mô hơn nữa, một hiện tượng đã được gọi là tổn thương do tái tưới máu thiếu máu cục bộ (I/R) (Eltzschig, H.K. and Tobias, E., *Nat. Med.* 17:1391-1401, 2011). Tổn thương I/R có thể ảnh hưởng đến một cơ quan, như tim (hội chứng vành cấp tính), thận (tổn thương thận cấp tính), ruột (I/R ruột), và não (đột quỵ). Tổn thương I/R cũng có thể ảnh hưởng đến nhiều cơ quan, như sau chấn thương lớn và hồi sức (suy đa cơ quan), ngừng tuần hoàn (tổn thương não giảm oxy, tổn thương thận cấp tính), bệnh mạch ngoại biên, và bệnh tế bào liềm (hội chứng ngực cấp tính, tổn thương thận cấp tính). Ca phẫu thuật lớn có thể liên quan đến tổn thương I/R, bao gồm phẫu thuật tim (suy tim cấp sau khi lắp tim phổi nhân tạo), phẫu thuật ngực (tổn thương lưng cấp tính), phẫu thuật mạch

ngoại biên (hội chứng khoang), phẫu thuật mạch (tổn thương thận cấp tính), và cấy ghép cơ quan rắn (suy mảnh ghép cấp). Hiện nay không có liệu pháp đặc hiệu nào hướng đích tổn thương I/R và cần phải có các liệu pháp hiệu quả nhằm tối đa hóa mức độ cứu chữa mô trong vùng thiếu máu cục bộ và cải thiện kết quả chức năng trong các thiết lập chung này.

Sinh lý bệnh học của tổn thương I/R là phức tạp và được đặc trưng bởi đáp ứng viêm mạnh sau tái tưới máu. Sự hoạt hóa của hệ thống bổ thể được chỉ ra là yếu tố quan trọng trong tổn thương I/R và việc ức chế hoạt tính bổ thể có hiệu nghiệm ở các mô hình động vật khác nhau (Diepenhorst, G.M.P. et al., *Ann. Surg.* 249:889-899, 2009). Tầm quan trọng tương đối của con đường cổ điển, lectin, và nhánh trong tổn thương I/R bị làm cho không ổn định ở mức lớn và có thể khác nhau tùy thuộc vào các cơ quan bị ảnh hưởng. Gần đây, tính khả dụng của chuột nhắt bất hoạt thiếu hụt các protein bổ thể đặc hiệu và chất ức chế đặc hiệu đối với con đường đã tạo ra dữ liệu chỉ ra con đường lectin và con đường nhánh trong tổn thương I/R.

Vai trò của con đường nhánh trong tổn thương I/R ở dạ dày-ruột được nghiên cứu bằng cách sử dụng chuột nhắt thiếu hụt yếu tố D (-/-) và dị hợp tử (+/-) (Stahl, G.L., et al. *Am. J. Pathol.* 162:449-455, 2003). Sau thiếu máu cục bộ thoáng qua ở dạ dày-ruột, tổn thương ở ruột và phổi được làm giảm nhưng không được ngăn chặn ở chuột nhắt thiếu hụt yếu tố D so với chuột nhắt dị hợp tử, và việc bổ sung yếu tố D của người vào chuột nhắt có yếu tố D (-/-) làm phục hồi tổn thương I/R. Cùng một mô hình được đánh giá trong chuột nhắt thiếu hụt C1q và thiếu hụt MBL-A/C và các kết quả cho thấy rằng tổn thương I/R ở dạ dày-ruột không phụ thuộc vào sự hoạt hóa C1q và con đường cổ điển, nhưng sự hoạt hóa MBL và con đường lectin là cần thiết đối với tổn thương ruột (Hart, M.L., et al. *J. Immunol.* 174:6373-6380, 2005). Ngược lại, phân tử nhận diện C1q của con đường cổ điển chịu trách nhiệm về tổn thương phổi sau I/R ruột (Hart, M.L., et al. *J. Immunol.* 174:6373-6380, 2005). Một giả thuyết rằng sự hoạt hóa của bổ thể trong tổn thương I/R diễn ra thông qua sự liên kết IgM tự nhiên với các tự kháng nguyên có mặt trên bề mặt của mô thiếu máu cục bộ (nhưng không bình thường), ví dụ, chuỗi nặng myosin không phải cơ typ II. Trong

mô hình chuột nhắt tổn thương I/R ở dạ dày-ruột, phức hợp miễn dịch từ mô ruột được đánh giá về sự có mặt của các yếu tố khởi phát trong con đường cổ điển (C1q), lectin (MBL), hoặc nhánh (yếu tố B) (Lee, H., et al., *Mol. Immunol.* 47:972-981, 2010). Các kết quả này cho thấy rằng C1q và MBL được phát hiện ra trong khi đó yếu tố B không được phát hiện ra trong các phức hợp miễn dịch này, chỉ ra sự liên quan giữa con đường cổ điển và con đường lectin nhưng không liên quan với con đường nhánh. Trong cùng mô hình đó, chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B không được bảo vệ khỏi tổn thương mô khu trú, mang lại sự hỗ trợ hơn nữa cho sự thiếu liên quan của con đường nhánh. Vai trò của con đường lectin trong tổn thương I/R ở dạ dày-ruột được đánh giá trực tiếp trong chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 và các kết quả này cho thấy rằng tổn thương dạ dày-ruột được làm giảm ở các con chuột nhắt này so với đối chứng loại dại; việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng MASP-2 có tính bảo vệ tương tự (Schwaeble, W.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:7523-7528, 2011). Kết hợp lại, các kết quả này củng cố thêm về sự liên quan của con đường lectin trong tổn thương I/R ở dạ dày-ruột, với dữ liệu đối lập về sự liên quan của con đường nhánh.

Trong mô hình chuột nhắt tổn thương I/R cơ tim, vai trò gây bệnh được thể hiện đối với con đường lectin do chuột nhắt thiếu hụt MBL được bảo vệ khỏi tổn thương cơ tim trong khi đó chuột nhắt thiếu hụt C1q và thiếu hụt C2/fB thì không (Walsh, M.C. et al., *J. Immunol.* 175:541-546, 2005). Việc bảo vệ khỏi tổn thương I/R cơ tim cũng được quan sát thấy ở chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 (Schwaeble, W.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:7523-7528, 2011). Việc điều trị cho chuột cống trong mô hình I/R cơ tim bằng các kháng thể đơn dòng kháng MBL chuột cống dẫn đến việc làm giảm tổn thương do tái tưới máu sau thiếu máu cục bộ (Jordan, J.E., et al., *Circulation* 104:1413 18, 2001). Trong nghiên cứu ở các bệnh nhân nhồi máu cơ tim được điều trị bằng phương pháp phẫu thuật tạo hình mạch, sự thiếu hụt MBL liên quan đến sự giảm tỷ lệ chết 90 ngày so với các đối chứng đủ MBL (M Trendelenburg et al., *Eur Heart J.* 31:1181, 2010). Ngoài ra, các bệnh nhân nhồi máu cơ tim phát triển tình trạng loạn chức năng tim sau phẫu thuật tạo hình mạch có nồng độ MBL cao hơn gấp khoảng ba lần so với các bệnh nhân có sự phục hồi chức năng (Haahr-

Pedersen S., et al., *J Inv Cardiology*, 21:13, 2009). Kháng thể MBL cũng làm giảm sự kết lắng bổ thể trên tế bào nội mô *in vitro* sau ứng kích oxy hóa chỉ ra vai trò đối với con đường lectin trong tổn thương I/R cơ tim (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549 56, 2000). Trong mô hình chuột nhắt ghép tim với mảnh ghép đồng nhất khác chỗ có tổn thương I/R, vai trò của con đường nhánh được nghiên cứu bằng cách sử dụng protein dung hợp đặc hiệu đối với con đường CR2-fH (Atkinson, C., et al., *J. Immunol.* 185:7007-7013, 2010). Việc sử dụng toàn thân CR2-fH ngay sau cấy ghép dẫn đến việc giảm tổn thương I/R cơ tim đến mức độ tương đương với việc điều trị bằng CR2-Crry, mà ức chế tất cả các con đường bổ thể, chỉ ra rằng con đường nhánh có vai trò chủ chốt trong mô hình này.

Trong mô hình chuột nhắt có tổn thương I/R thận, con đường nhánh có liên quan do chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B được bảo vệ để không giảm chức năng thận và và không bị tổn thương tiểu quản, so với chuột nhắt loại dại (Thurman, J.M., et al., *J. Immunol.* 170:1517-1523, 2003). Việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng ức chế đối với yếu tố B ngăn chặn sự hoạt hóa bổ thể và làm giảm tổn thương I/R thận ở chuột (Thurman, J.M., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 17:707-715, 2006). Trong mô hình tổn thương I/R thận hai bên, chuột nhắt thiếu hụt MBL-A/C được bảo vệ để thận không bị phá hủy so với chuột nhắt loại dại và MBL người tái tổ hợp làm đảo ngược tác dụng bảo vệ ở chuột nhắt thiếu hụt MBL-A/C, chỉ ra vai trò đối với MBL trong mô hình này (Moller-Kristensen, M., et al., *Scand. J. Immunol.* 61:426-434, 2005). Trong mô hình chuột cống tổn thương I/R thận một bên, việc ức chế MBL bằng kháng thể đơn dòng đối với MBL-A bảo toàn được chức năng thận sau I/R (van der Pol, P., et al., *Am. J. Transplant.* 12:877-887, 2010). Thú vị là, vai trò của MBL trong mô hình này có vẻ là không bao gồm sự hoạt hóa của thành phần bổ thể tận cùng, do việc điều trị bằng kháng thể C5 không hiệu quả trong ngăn chặn tổn thương thận. Thay vào đó, MBL có vẻ là có tác dụng gây độc trực tiếp trên tế bào hình ống, do các tế bào hình ống ở đầu gần của người được ủ với MBL *in vitro* tiếp nhận MBL với sự chết tế bào sau chương trình sau đó. Trong mô hình lợn có I/R thận, Castellano G. et al., (*Am J Pathol,* 176(4):1648-59, 2010), thử nghiệm chất ức chế C1, mà bất

hoạt cố định C1r và C1s proteaza trong con đường cổ điển và cả MASP-1 và MASP-2 proteaza trong phức hợp MBL của con đường lectin, và phát hiện ra rằng chất ức chế C1 làm giảm sự kết lắng bổ thể trong mao mạch quanh ống và tiểu cầu mạch và làm giảm sự phá hủy ống.

Con đường nhánh có vẻ là có liên quan đến chấn thương sọ não thử nghiệm do chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B đã làm giảm sự hoạt hóa bổ thể tổng thể như được đo bằng nồng độ C5a trong huyết thanh và làm giảm sự chết tế bào thần kinh sau chấn thương so với chuột nhắt loại dại (Leinhase, I., et al., *BMC Neurosci.* 7:55-67, 2006). Ở người đột quỵ, thành phần bổ thể C1q, C3c, và C4d được phát hiện ra bằng cách nhuộm hóa mô miễn dịch trong tổn thương thiếu máu cục bộ, đề xuất sự hoạt hóa thông qua con đường cổ điển (Pedersen, E.D., et al., *Scand. J. Immunol.* 69:555-562, 2009). Việc hướng đích con đường cổ điển ở mô hình động vật có chứng thiếu máu não cục bộ đã đạt được các kết quả kết hợp, trong đó một số nghiên cứu cho thấy sự bảo vệ còn các nghiên cứu khác thì không cho thấy lợi ích (Arumugam, T.V., et al., *Neuroscience* 158:1074-1089, 2009). Các nghiên cứu thử nghiệm và lâm sàng đã cung cấp bằng chứng rõ rệt về sự liên quan của con đường lectin. Trong mô hình đột quỵ thử nghiệm, sự thiếu hụt của MBL hoặc MASP-2 dẫn đến việc làm giảm mức độ nhồi máu so với chuột nhắt loại dại (Cervera A, et al.; *PLoS One* 3;5(2):e8433, 2010; Osthoff M. et al., *PLoS One*, 6(6):e21338, 2011). Ngoài ra, các bệnh nhân đột quỵ có nồng độ MBL thấp có tiên lượng tốt hơn so với đối chứng đủ MBL của chúng (Osthoff M. et al., *PLoS One*, 6(6):e21338, 2011).

Trong mô hình khỉ đầu chó lắp tim phổi nhân tạo, việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng yếu tố D ức chế chứng viêm toàn thân như được đo bằng nồng độ trong huyết tương của C3a, sC5b-9, và IL-6, và làm giảm tổn thương mô cơ tim, chỉ ra sự liên quan của con đường nhánh trong mô hình này (Undar, A., et al., *Ann. Thorac. Surg.* 74:355-362, 2002).

Vì thế, tùy vào cơ quan bị ảnh hưởng bởi I/R, tất cả ba con đường của bổ thể đều có thể đóng góp vào quá trình sinh bệnh và các kết quả bất lợi. Dựa trên các kết quả thử nghiệm và lâm sàng được nêu chi tiết ở trên, chất ức chế LEA-2 được mong

đợi là có tính bảo vệ trong hầu hết các thiết lập của I/R. Sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin của LEA-1 có thể gây ra sự hoạt hóa bổ thể thông qua con đường nhánh ở ít nhất là một số thiết lập. Ngoài ra, sự hoạt hóa bổ thể được khởi phát bởi LEA-2 có thể được khuếch đại hơn nữa bằng vòng khuếch đại con đường nhánh và vì thế gia tăng tổn thương mô liên quan đến I/R. Vì thế, chất ức chế LEA-1 được mong đợi là mang lại lợi ích điều trị cộng hợp hoặc bổ sung ở các bệnh nhân mắc tình trạng bệnh lý liên quan đến thiếu máu cục bộ.

Theo như trên đây, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có các lợi ích trị liệu độc lập trong điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý liên quan đến tái tưới máu thiếu máu cục bộ. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được các lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này. Do đó, việc điều trị hiệu quả tối ưu cho tình trạng bệnh lý liên quan đến I/R bao gồm các thành phần hoạt dược mà, một mình hoặc kết hợp, phong bế cả LEA-1 và LEA-2. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt hơn là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của tổn thương do tái tưới máu thiếu máu cục bộ bằng cách sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP 1, chất ức chế MASP 3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP 1/3, trong chất mang dược cho đối tượng trải qua chứng tái tưới máu thiếu máu cục bộ. Chế phẩm ức chế MASP 1, MASP 3, hoặc MASP 1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong sọ, trong cơ, dưới da, hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, và có thể là qua đường miệng đối với các chất ức

chế không tiết hormon peptit, và thích hợp nhất là bằng cách dùng trong động mạch hoặc dùng trong tĩnh mạch. Việc sử dụng chế phẩm ức chế LEA-1 theo sáng chế một cách thích hợp bắt đầu ngay sau hoặc càng sớm càng tốt sau sự kiện tái tưới máu thiếu máu cục bộ. Trong các trường hợp mà sự tái tưới máu diễn ra trong môi trường đã được kiểm soát (ví dụ, sau khi sửa chữa chứng phình động mạch chủ, cấy ghép cơ quan hoặc tháo chân tay hoặc ngón chân tay bị gãy lìa hoặc bị chấn thương), chất ức chế LEA-1 có thể được sử dụng trước và/hoặc trong và/hoặc sau khi tái tưới máu. Việc sử dụng có thể được lặp lại định kỳ như được xác định bởi bác sĩ để có tác dụng trị liệu tối ưu.

Theo một số phương án, phương pháp được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu liên quan đến ít nhất một quy trình trong số sửa chữa phình động mạch, lắp tim phổi nhân tạo, nối lại mạch kết hợp với cấy ghép cơ quan và/hoặc cấy lại tứ chi/ngón chân tay, đột quỵ, nhồi máu cơ tim, và hồi sức động lực máu sau đột quỵ và/hoặc các quy trình phẫu thuật.

Theo một số phương án, phương pháp này được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu ở đối tượng sắp trải qua, đang trải qua, hoặc đã trải qua cấy ghép cơ quan. Theo một số phương án, phương pháp này được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa tổn thương do tái tưới máu thiếu máu cục bộ ở đối tượng sắp trải qua, đang trải qua, hoặc đã trải qua cấy ghép cơ quan, với điều kiện mảnh ghép cơ quan không phải là mảnh ghép thận.

Theo một phương án, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế còn bao gồm việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 ở đối tượng trải qua sự tái tưới máu thiếu máu cục bộ, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng này. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của tổn thương do tái tưới máu thiếu máu cục bộ khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt

tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chế phẩm ức chế MASP 2 có thể được sử dụng cho đối tượng cần điều trị bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong sọ, trong cơ, dưới da, hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, và có thể là qua đường miệng đối với các chất ức chế không tiết hormon peptit, và thích hợp nhất là bằng cách dùng trong động mạch hoặc dùng trong tĩnh mạch. Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế một cách thích hợp bắt đầu ngay sau hoặc càng sớm càng tốt sau sự kiện tái tưới máu thiếu máu cục bộ. Trong các trường hợp mà sự tái tưới máu diễn ra trong môi trường đã được kiểm soát (ví dụ, sau sửa chữa chứng phình động mạch chủ, cấy ghép cơ quan hoặc tháo chân tay hoặc ngón chân tay bị gãy rời hoặc bị chấn thương), chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng trước và/hoặc trong và/hoặc sau khi tái tưới máu. Việc sử dụng có thể được lặp lại định kỳ như được xác định bởi bác sĩ để có tác dụng trị liệu tối ưu.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và tùy ý chế phẩm ức chế MASP 2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu

hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị hoặc ngăn ngừa tổn thương do tái tưới máu thiếu máu cục bộ. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng trải qua chứng tái tưới máu thiếu máu cục bộ.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như ở đối tượng trải qua chứng tái tưới máu thiếu máu cục bộ.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển chứng tái tưới máu thiếu máu cục bộ bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ tổn thương mô liên quan đến chứng tái tưới máu thiếu máu cục bộ ở đối tượng đó.

D. Vai trò của MASP-3 trong bệnh khớp viêm và không viêm và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Viêm khớp dạng thấp (RA) là bệnh viêm mạn tính của khớp hoạt dịch mà cũng có thể có sự biểu hiện toàn thân. RA ảnh hưởng đến khoảng 1% dân số thế giới, và nữ giới có khả năng bị mắc cao hơn gấp hai đến ba lần. Viêm khớp biểu hiện ở hiện tượng sưng tấy, đau, và giòn. Do bệnh tiến triển, có thể có sự bào mòn và phá hủy khớp, dẫn đến suy giảm phạm vi chuyển động và các dị dạng. Mục đích điều trị trong RA bao gồm ngăn chặn hoặc kiểm soát sự phá hủy khớp, ngăn chặn sự mất chức năng khớp và sự tiến triển bệnh, giảm nhẹ các triệu chứng và cải thiện chất lượng cuộc sống, và đạt được sự thuyên giảm không dùng thuốc. Điều trị dược lý đối với bệnh RA bao gồm thuốc chống thấp khớp cải biến bệnh (DMARD), thuốc giảm

đau, và thuốc chống viêm (glucocorticoit và thuốc chống viêm không steroit). DMARD là phương pháp điều trị quan trọng nhất do chúng có thể cảm ứng sự thuyên giảm lâu dài và trì hoãn hoặc tạm ngừng sự tiến triển phá hủy khớp không hồi phục. Các DMARD truyền thống bao gồm các phân tử nhỏ như metotrexat, sulfasalazin, hydroxycloroquin, muối vàng, leflunomit, D-penixilamin, xyclosporin, và azathioprin. Nếu các DMARD truyền thống là không đủ để kiểm soát bệnh thì một vài sinh chất hướng đích tế bào viêm hoặc chất điều tiết là lựa chọn điều trị có giá trị, như chất ức chế yếu tố di căn khối u (etanercept, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, và golimumab), chất đối kháng xytokin (anakinra và tocilizumab), rituximab, và abatacept.

Mặc dù tính miễn dịch thích ứng rõ ràng là chính đối với quá trình sinh bệnh RA như được chứng minh bởi sự kết hợp di truyền với gen hoạt hóa tế bào T và sự có mặt của các tự kháng thể, nhưng cơ chế miễn dịch bẩm sinh cũng có liên quan (McInnes, I.B. and Schett, G. *New Engl. J. Med.* 365:2205-2219, 2011). Ở bệnh nhân RA, nồng độ dịch hoạt dịch trong mảnh phân cắt con đường nhánh Bb cao hơn gấp vài lần so với mẫu từ các bệnh nhân có chứng viêm khớp cảm ứng bởi tinh thể hoặc bệnh khớp thoái hóa, chỉ ra sự hoạt hóa ưu tiên của con đường nhánh ở các bệnh nhân RA (Brodeur, J.P., et al., *Arthiritis Rheum.* 34:1531-1537, 1991). Trong mô hình thử nghiệm truyền thụ động kháng kháng thể colagen typ II có bệnh viêm khớp, chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B đã giảm tình trạng viêm và sự phá hủy khớp so với chuột nhắt loại dại, trong khi đó chuột nhắt thiếu hụt C4 lại có hoạt tính bệnh tương tự như chuột nhắt loại dại, chỉ ra yêu cầu đối với con đường nhánh và không phải đối với con đường cổ điển trong mô hình này (Banda, N.K. et al., *J. Immunol.* 177:1904-1912, 2006). Trong cùng mô hình thử nghiệm của bệnh viêm khớp cảm ứng bởi kháng thể colagen (CAIA), chuột nhắt chỉ có con đường cổ điển có hoạt tính hoặc chỉ có con đường lectin có hoạt tính không có khả năng phát triển bệnh viêm khớp (Banda, N.K. et al., *Clin. Exp. Immunol.* 159:100-108, 2010). Dữ liệu từ nghiên cứu này đề xuất rằng con đường cổ điển hoặc con đường lectin có khả năng hoạt hóa C3 ở nồng độ thấp *in vitro*. Tuy nhiên, khi không có vòng khuếch đại con đường nhánh,

mức độ kết lắng trong khớp của C3 là không đủ để hình thành bệnh lâm sàng. Bước chủ chốt trong quá trình hoạt hóa của con đường nhánh là bước chuyển hóa zymogen của yếu tố D (tiền yếu tố D) thành yếu tố D thuần thục, mà được điều tiết bởi MASP-1 và/hoặc MASP-3 (Takahashi, M., et al., *J. Exp. Med.* 207:29-37, 2010) và/hoặc HTRA1 (Stanton et al., Evidence That the HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration, được thuyết trình tại Hội thảo của Hiệp hội nghiên cứu về Thị lực và Nhãn khoa năm 2011 vào ngày 4/5/2011). Vai trò của MASP-1/3 được đánh giá trong CAIA của chuột và các kết quả cho thấy rằng chuột nhắt thiếu hụt MASP-1/3 được bảo vệ để không bị bệnh viêm khớp so với chuột nhắt loại dại (Banda, N.K., et al., *J. Immunol.* 185:5598-5606, 2010). Ở chuột nhắt thiếu hụt MASP-1/3, tiền yếu tố D mà không phải yếu tố D thuần thục được phát hiện ra trong huyết thanh trong quá trình tiến triển CAIA, và việc bổ sung yếu tố D của người *in vitro* khôi phục sự hoạt hóa C3 và sự hình thành C5a bằng cách sử dụng huyết thanh từ các con chuột nhắt này. Ngược lại, trong mô hình chuột có pha tác động của bệnh viêm khớp, chuột nhắt thiếu hụt C3 phát triển bệnh viêm khớp rất nhẹ so với chuột nhắt WT trong khi chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B vẫn phát triển bệnh viêm khớp, chỉ ra sự đóng góp độc lập của cả con đường cổ điển/con đường lectin và con đường nhánh (Hietala, M.A. et al., *Eur. J. Immunol.* 34:1208-1216, 2004). Trong mô hình chuột nhắt chuyển gen có thụ thể tế bào T K/BxN có bệnh viêm khớp viêm, chuột nhắt thiếu C4 hoặc C1q phát triển bệnh viêm khớp tương tự với chuột nhắt loại dại trong khi đó chuột nhắt thiếu yếu tố B không phát triển bệnh viêm khớp hoặc chỉ có bệnh viêm khớp nhẹ, cho thấy yêu cầu đối với con đường nhánh và không phải con đường cổ điển trong mô hình này (Ji H. et al., *Immunity* 16:157-168, 2002). Trong mô hình K/BxN, chuột nhắt thiếu MBL-A không được bảo vệ để không bị viêm khớp cảm ứng bởi huyết thanh, nhưng do vai trò của MBL-C không được nghiên cứu, nên vai trò tiềm năng đối với con đường lectin có thể không được loại bỏ (Ji et al., 2002, nêu trên).

Hai nhóm nghiên cứu đã độc lập đề xuất rằng sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin thúc đẩy chứng viêm ở các bệnh nhân RA thông qua sự tương tác của MBL

với các IgG glycoform đặc hiệu (Malhotra et al., *Nat. Med.* 1:237 243, 1995; Cuchacovich et al., *J. Rheumatol.* 23:44 51, 1996). Lưu ý rằng tình trạng thấp khớp liên quan đến sự gia tăng đáng kể IgG glycoform thiếu galactoza (được đề cập đến là IgG0 glycoform) trong vùng Fc của phân tử (Rudd et al., *Trends Biotechnology* 22:524 30, 2004). Phần trăm IgG0 glycoform tăng theo sự tiến triển bệnh của tình trạng thấp khớp, và trở về bình thường khi các bệnh nhân bắt đầu thuyên giảm. *In vivo*, IgG0 được kết lắng trên mô hoạt dịch và MBL có mặt với các nồng độ gia tăng trong dịch hoạt dịch ở các cá thể có RA. Agalactosyl IgG (IgG0) đã kết tụ liên quan đến RA có thể liên kết MBL và do đó có thể khởi phát sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin thông qua LEA-1 và/hoặc LEA-2. Ngoài ra, các kết quả từ nghiên cứu lâm sàng nhắm đến biến thể alen của MBL ở các bệnh nhân RA đề xuất rằng MBL có thể có vai trò tăng cường viêm trong bệnh này (Garred et al., *J. Rheumatol.* 27:26 34, 2000). Do đó, sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin thông qua LEA-1 và/hoặc LEA-2 có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh RA.

Sự hoạt hóa bổ thể cũng đóng vai trò quan trọng trong bệnh viêm khớp dạng thấp độ tuổi thanh thiếu niên (Mollnes, T.E., et al., *Arthiritis Rheum.* 29:1359 64, 1986). Tương tự với RA ở người trưởng thành, trong bệnh viêm khớp dạng thấp độ tuổi thanh thiếu niên, nồng độ trong huyết thanh và dịch hoạt dịch tăng lên của sản phẩm hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh Bb so với C4d (chỉ thị cho sự hoạt hóa cổ điển hoặc LEA-2), chỉ ra rằng sự hoạt hóa bổ thể được điều tiết chủ yếu bởi LEA-1 (El Ghobarey, A.F. et al., *J. Rheumatology* 7:453 460, 1980; Agarwal, A., et al., *Rheumatology* 39:189 192, 2000).

Tương tự, sự hoạt hóa bổ thể đóng vai trò quan trọng trong bệnh viêm khớp vảy nến. Các bệnh nhân có tình trạng bệnh lý này có các sản phẩm hoạt hóa bổ thể tăng lên trong hệ tuần hoàn của chúng, và các tế bào hồng cầu của chúng có vẻ là có chất điều hòa bổ thể CD59 ở hàm lượng thấp hơn (Triolo,. *Clin Exp Rheumatol.*, 21(2):225-8, 2003). Nồng độ bổ thể có liên quan đến hoạt tính bệnh, và có giá trị dự báo cao để xác định kết quả điều trị (Chimenti at al., *Clin Exp Rheumatol.*, 30(1):23-30, 2012). Trên thực tế, các nghiên cứu gần đây đề xuất rằng tác dụng của liệu pháp

kháng TNF đối với tình trạng bệnh lý này được quy cho là do sự điều biến bổ thể (Ballanti et al., *Autoimmun Rev.*, 10(10):617-23, 2011). Mặc dù vai trò chính xác của bổ thể trong bệnh viêm khớp vảy nến chưa được xác định, sự có mặt của các sản phẩm hoạt hóa bổ thể C4d và Bb trong hệ tuần hoàn của các bệnh nhân này đề xuất vai trò quan trọng trong quá trình sinh bệnh. Trên cơ sở các sản phẩm quan sát được, tin rằng LEA-1, và cũng có thể là LEA-2 chịu trách nhiệm về sự hoạt hóa bổ thể bệnh lý ở các bệnh nhân này.

Bệnh viêm xương khớp (OA) là dạng viêm khớp phổ biến nhất, ảnh hưởng đến hơn 25 triệu người tại Hoa Kỳ. OA được đặc trưng bởi sự phá hủy và có thể có sự mất sụn khớp, kèm theo sự hình thành xương mới và tăng sinh hoạt dịch, dẫn đến cơn đau, tình trạng giòn, mất chức năng khớp, và tàn tật. Các khớp thường bị ảnh hưởng bởi OA là tay, cổ, lưng dưới, đầu gối và hông. Bệnh này là bệnh tiến triển và các phương pháp điều trị hiện tại là để giảm nhẹ triệu chứng đau và không làm thay đổi tiền sử tự nhiên của bệnh. Quá trình sinh bệnh OA là không rõ ràng, nhưng vai trò đối với bổ thể đã được chỉ ra. Trong phân tích hệ protein và hệ phiên mã của dịch hoạt dịch từ các bệnh nhân có OA, một vài thành phần của bổ thể được biểu hiện khác thường so với các mẫu từ cá thể khỏe mạnh, bao gồm con đường cổ điển (C1s và C4A) và con đường nhánh (yếu tố B), và cả C3, C5, C7, và C9 (Wang, Q., et al., *Nat. Med.* 17:1674-1679, 2011). Ngoài ra, trong mô hình chuột nhắt có OA được cảm ứng bởi kỹ thuật cắt bỏ sụn chêm y học, chuột nhắt thiếu hụt C5 có hiện tượng mất sụn, hình thành chồi xương và viêm màng hoạt dịch ít hơn so với chuột nhắt dương tính với C5, và việc điều trị cho chuột nhắt loại dại bằng CR2-fH, protein dung hợp ức chế con đường nhánh, làm giảm bớt sự phát triển của OA (Wang et al., 2011 nêu trên).

Virut Ross River (RRV) và virut chikungunya (CHIKV) thuộc nhóm virut sinh ra từ muỗi có thể gây viêm khớp và viêm cơ cấp tính và dai dẳng ở người. Ngoài việc gây ra bệnh ở phạm vi địa phương, các virut này còn có thể gây bệnh dịch liên quan đến hàng triệu cá thể bị lây nhiễm. Bệnh viêm khớp được cho là được khởi phát bởi sự sao chép virut và sự cảm ứng đáp ứng viêm ở vật chủ trong khớp và hệ thống

bổ thể đã được dẫn chứng là thành phần chủ chốt trong quy trình này. Dịch hoạt dịch từ người có chứng viêm đa khớp cảm ứng bởi RRV chứa C3a ở nồng độ cao hơn so với dịch hoạt dịch từ người có OA (Morrison, T.E., et al., *J. Virol.* 81:5132-5143, 2007). Trong mô hình chuột nhắt có bệnh nhiễm RRV, chuột nhắt thiếu hụt C3 phát triển bệnh viêm khớp ít nghiêm trọng hơn so với chuột nhắt loại dại, chỉ ra vai trò của bổ thể (Morrison et al., 2007, nêu trên). Con đường bổ thể đặc hiệu có liên quan được nghiên cứu và chuột nhắt có con đường lectin đã bất hoạt (MBL-A-/- và MBL-C-/-) có bệnh viêm khớp thuyên giảm so với chuột nhắt loại dại. Ngược lại, chuột nhắt có con đường cổ điển (C1q-/-) hoặc con đường nhánh (yếu tố B-/-) đã bất hoạt phát triển bệnh viêm khớp nghiêm trọng, chỉ ra rằng con đường lectin được khởi phát bởi MBL có vai trò thiết yếu trong mô hình này (Gunn, B.M., et al., *PLoS Pathog.* 8:e1002586, 2012). Do bệnh khớp bao gồm sự phá hủy khớp, sự phá hủy khớp ban đầu gây ra bởi các căn bệnh khác nhau có thể khởi phát đợt sóng hoạt hóa bổ thể thứ cấp thông qua LEA-2. Để củng cố cho khái niệm này, nghiên cứu trước đó của các tác giả sáng chế đã cho thấy rằng chuột nhắt MASP-2 KO có tổn thương khớp giảm đi so với chuột nhắt WT trong mô hình cảm ứng bởi colagen của RA.

Dựa theo nội dung chính của bằng chứng được nêu chi tiết ở trên, chất ức chế LEA-1 và LEA-2, một mình hoặc kết hợp, được mong đợi là hữu ích về mặt trị liệu để điều trị bệnh khớp. Do đó, việc điều trị có hiệu quả tối ưu đối với bệnh khớp có thể bao gồm các thành phần hoạt dược, một mình hoặc kết hợp, có thể phong bế cả LEA-1 và LEA-2. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA2. Tốt hơn là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2. Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh khớp viêm và không viêm, bao gồm bệnh viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp

độ tuổi thanh thiếu niên và viêm khớp vảy nến, bằng cách sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP 1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển, bệnh khớp viêm và không viêm. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP 1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc bằng cách dùng qua đường miệng. Theo một cách khác, việc dùng có thể là bằng cách phân phối khu trú, như bằng cách tiêm trong khớp. Chất ức chế LEA-1 có thể được sử dụng định kỳ trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị hoặc kiểm soát tình trạng bệnh lý mạn tính, hoặc có thể là bằng cách dùng một lần hoặc dùng lặp lại trong giai đoạn trước, trong và/hoặc sau chấn thương hoặc tổn thương cấp, bao gồm các quy trình phẫu thuật được thực hiện trên khớp.

Theo một phương án, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế còn bao gồm việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 ở đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển, bệnh khớp viêm và không viêm (bao gồm bệnh viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp độ tuổi thanh thiếu niên và viêm khớp vảy nến), bằng cách sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP1/3 cho đối tượng. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh khớp khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chế phẩm ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng cần điều trị toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất ức chế không tiết hormon peptit. Theo một cách khác, việc sử dụng có thể là bằng cách phân phối khu trú, như bằng cách tiêm trong khớp. Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng định kỳ trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị hoặc kiểm soát tình trạng bệnh lý mạn tính, hoặc có thể là bằng cách dùng một lần hoặc dùng lặp lại trong giai đoạn trước, trong và/hoặc sau chấn thương hoặc tổn thương cấp, bao gồm các quy trình phẫu thuật được thực hiện trên khớp.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và tùy ý chế phẩm ức chế MASP 2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng dùng một lần chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh khớp viêm và không viêm. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng mắc bệnh khớp viêm và không viêm.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như viêm khớp.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm khớp (bệnh khớp dạng viêm và không viêm) bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm chứa lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ mắc viêm khớp ở đối tượng đó, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161. Theo một số phương án, đối tượng này mắc bệnh viêm khớp được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp dạng thấp độ tuổi thanh thiếu niên, viêm cột sống dính khớp, bệnh Behcet, viêm khớp liên quan đến lây nhiễm và viêm khớp vảy nến. Theo một số phương án, dược phẩm được dùng toàn thân (tức là, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch hoặc dưới dạng chất xông hít). Theo một số phương án, dược phẩm được dùng khu trú vào khớp.

E. Vai trò của MASP-3 trong chứng đông máu rải rác trong lòng mạch (dic) và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Đông máu rải rác trong lòng mạch (DIC) là hội chứng của bệnh lý kích thích quá mức hệ đông máu mà có thể có biểu hiện lâm sàng là xuất huyết và/hoặc huyết khối. DIC không diễn ra như tình trạng bệnh lý nguyên phát thay vào đó là kết hợp với các tiến trình bệnh khác nhau, bao gồm phá hủy mô (chấn thương, bỏng, đột quỵ do nhiệt, phản ứng truyền máu, thải loại mảnh ghép cấp), tạo u, lây nhiễm, các bệnh lý phụ khoa (nhau tiền đạo, tắc mạch ối, nhiễm độc thai nghén), và các tình trạng bệnh lý kết hợp như sốc tim, gần chết đuối, nghẽn mạch mỡ, phình động mạch chủ. Chứng giảm tiểu cầu là hiện tượng bất thường thường xuyên ở các bệnh nhân nằm

phòng điều trị tích cực, với tỷ lệ mắc từ 35% đến 44%, và DIC là căn bệnh chiếm khoảng 25% số trường hợp này, tức là, DIC xuất hiện trong khoảng 10% số bệnh nhân ốm yếu trầm trọng (Levi, M. and Opal, S.M. *Crit. Care* 10:222-231, 2006). Sinh lý bệnh học của DIC là tiến trình bệnh cơ bản khởi phát đáp ứng đông máu sinh lý. Tuy nhiên, các chất tiền huyết khối lại áp đảo cơ chế cân bằng đối trọng bình thường đến mức có sự kết lắng không thích hợp của fibrin và tiểu cầu trong hệ tiểu tuần hoàn, dẫn đến chứng thiếu máu cục bộ trong cơ quan, chứng giảm fibrinogen huyết, và chứng giảm tiểu cầu. Việc chẩn đoán DIC là dựa trên sự trình diện lâm sàng trong quá trình ốm yếu hoặc tiến trình cơ bản thích hợp, cùng với các bất thường ở các thông số trong phòng thử nghiệm (thời gian prothrombin, thời gian thromboplastin từng phần, sản phẩm thoái biến fibrin, D-dime, hoặc số lượng tiểu cầu). Phương pháp điều trị cơ bản cho DIC là để giải quyết tình trạng bệnh lý cơ bản mà là chất khởi phát nguyên nhân. Sản phẩm trợ máu dưới dạng tế bào hồng cầu, tiểu cầu, huyết tương mới cấp đông, và chất kết tủa cryo có thể là cần thiết để điều trị hoặc ngăn ngừa các biến chứng lâm sàng.

Vai trò của con đường bổ thể trong DIC đã được nghiên cứu trong một vài nghiên cứu. Sự hoạt hóa bổ thể được đánh giá ở các bệnh nhân là trẻ nhỏ có bệnh nhiễm meningococci so sánh tiến trình lâm sàng liên quan đến kiểu gen MBL (Sprong, T. et al., *Clin. Infect. Dis*. 49:1380-1386, 2009). Khi nhập viện, các bệnh nhân có sự thiếu hụt MBL có C3bc, phức hợp bổ thể tận cùng, C4bc, và C3bBbP với mức độ tuần hoàn thấp hơn so với các bệnh nhân đủ MBL, chỉ ra phạm vi hoạt hóa của bổ thể chung, bổ thể tận cùng, và con đường nhánh hẹp hơn. Ngoài ra, phạm vi hoạt hóa bổ thể toàn thân tương quan với độ nghiêm trọng của bệnh và các thông số của DIC và các bệnh nhân thiếu hụt MBL có tiến trình lâm sàng nhẹ hơn so với các bệnh nhân đủ MBL. Do đó, mặc dù sự thiếu hụt MBL là yếu tố nguy cơ cho tính mẫn cảm đối với các bệnh nhiễm, sự thiếu hụt MBL trong khi sốc nhiễm trùng huyết có thể liên quan đến độ nghiêm trọng bệnh thấp hơn.

Như được thể hiện trong các ví dụ từ 1 đến 4 ở đây, các nghiên cứu thử nghiệm đã nhấn mạnh sự đóng góp quan trọng của MBL và MASP-1/3 trong đáp ứng miễn

dịch bẩm sinh với *Neisseria menigitidis*, tác nhân gây bệnh của bệnh nhiễm meningococci. Huyết thanh thiếu hụt MBL từ chuột nhắt hoặc người, huyết thanh của người thiếu hụt MASP-3, hoặc chuột nhắt bất hoạt MASP-1/3 có ít hiệu quả hơn trong việc hoạt hóa bổ thể và phân hủy meningococci *in vitro* so với huyết thanh loại dại. Tương tự, chuột bất hoạt MASP-1/3 chưa qua thí nghiệm mẫn cảm hơn với bệnh nhiễm neisseria so với các đối chứng loại dại của chúng. Vì thế, khi không có tính miễn dịch thích ứng, con đường LEA-1 góp phần vào tính kháng vật chủ bẩm sinh đối với bệnh nhiễm neisseria. Ngược lại, LEA-1 gia tăng sự hoạt hóa bổ thể bệnh lý khởi phát đáp ứng vật chủ có hại, bao gồm DIC.

Trong mô hình chuột có chứng huyết khối động mạch, chuột nhắt vô hiệu MBL và bất hoạt MASP-1/-3 đã giảm tình trạng hình thành cục đông máu do FeCl3 so với chuột nhắt loại dại hoặc vô hiệu C2/yếu tố B, và sự thiếu hụt được khôi phục bằng MBL người tái tổ hợp (La Bonte, L.R., et al., *J. Immunol.* 188:885-891, 2012). *In vitro*, huyết thanh chuột nhắt vô hiệu MBL hoặc bất hoạt MASP-1/-3 đã giảm tình trạng phân cắt cơ chất thrombin so với huyết thanh chuột nhắt loại dại hoặc vô hiệu C2/yếu tố B; việc bổ sung MASP-1 tái tổ hợp của người khôi phục tình trạng phân cắt cơ chất thrombin trong huyết thanh chuột nhắt bất hoạt MASP-1/-3 (La Bonte et al., 2012, nêu trên). Các kết quả này chỉ ra rằng phức hợp MBL/MASP, cụ thể là MASP-1, đóng vai trò chủ chốt trong quá trình hình thành cục đông. Vì thế, LEA-1 có thể đóng vai trò quan trọng trong chứng huyết khối bệnh lý, bao gồm DIC.

Các nghiên cứu thử nghiệm đã thiết lập vai trò quan trọng như nhau cho LEA-2 trong chứng huyết khối bệnh lý. Các nghiên cứu *in vitro* còn cho thấy rằng LEA-2 tạo ra liên kết phân tử giữa hệ bổ thể và hệ đông máu. MASP-2 có hoạt tính giống yếu tố Xa và hoạt hóa prothrombin thông qua quá trình phân cắt để tạo ra thrombin, mà sau đó có thể thanh thải fibrinogen và thúc đẩy sự hình thành cục đông fibrin (cũng xem trong tài liệu Krarup et al., *PLoS One,* 18:2(7):e623, 2007).

Các nghiên cứu riêng rẽ đã cho thấy rằng phức hợp lectin-MASP có thể thúc đẩy sự hình thành cục đông, sự kết lắng fibrin và sự giải phóng fibrinopeptit trong quy trình phụ thuộc vào MASP-2 (Gulla et al., *Immunology,* 129(4):482-95, 2010).

Vì thế, LEA-2 thúc đẩy sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin cùng lúc của bổ thể và hệ đông máu.

Các nghiên cứu *in vitro* cũng cho thấy rằng MASP-1 có hoạt tính giống thrombin (Presanis J.S., et al., *Mol Immunol*, 40(13):921-9, 2004), và phân cắt fibrinogen và yếu tố XIII (Gulla K. C. et la., *Immunology*, 129(4):482-95, 2010), đề xuất rằng LEA-1 có thể hoạt hóa con đường đông máu một cách độc lập hoặc phối hợp với LEA-2.

Dữ liệu được nêu chi tiết ở trên đề xuất rằng LEA-1 và LEA-2 tạo ra các liên kết độc lập giữa sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin và sự đông máu. Vì thế, theo như trên đây, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có các lợi ích trị liệu độc lập trong điều trị cho đối tượng mắc chứng đông máu rải rác trong lòng mạch. Theo một số phương án, đối tượng này mắc chứng đông máu rải rác trong lòng mạch thứ phát với nhiễm trùng huyết, chấn thương, lây nhiễm (vi khuẩn, virut, nấm, ký sinh trùng), bệnh ác tính, thải loại mảnh ghép, phản ứng truyền máu, biến chứng sản khoa, phình động mạch, suy gan, đột quỵ do nhiệt, bỏng, tiếp xúc với bức xạ, sốc, hoặc phản ứng nhiễm độc nghiêm trọng (ví dụ, rắn cắn, côn trùng cắn, phản ứng truyền máu). Theo một số phương án, chấn thương là chấn thương thần kinh. Theo một số phương án, bệnh nhiễm là bệnh nhiễm vi khuẩn, như bệnh nhiễm *Neisseria meningitidis*.

Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được các lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này. Do cả LEA-1 và LEA-2 đều được biết đến là được hoạt hóa bởi các tình trạng bệnh lý dẫn đến DIC (ví dụ, bệnh nhiễm hoặc chấn thương), nên chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2, riêng rẽ hoặc kết hợp, được mong đợi là có tính hữu ích trị liệu để điều trị bệnh DIC. Chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2 có thể ngăn chặn các cơ chế tương tác chéo khác nhau giữa bổ thể và quá trình đông máu. Vì thế, chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2 có thể có tác dụng bổ sung, cộng hợp hoặc hiệp đồng trong ngăn chặn DIC và các rối loạn huyết khối khác.

Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho phổ rộng hơn của các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết và liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng chứng đông máu rải rác trong lòng mạch ở đối tượng cần điều trị bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP 3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng trải qua, hoặc có nguy cơ phát triển, chứng đông máu rải rác trong lòng mạch. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng này ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát. Để điều trị hoặc ngăn ngừa DIC thứ phát với chấn thương hoặc sự kiện cấp tính khác, chế phẩm ức chế LEA-1 có thể được sử dụng ngay sau tổn thương do chấn thương hoặc theo hướng phòng ngừa trước, trong, ngay sau, hoặc trong vòng từ một đến bảy ngày hoặc lâu hơn, như trong vòng từ 24 giờ đến 72 giờ, sau tổn thương do chấn thương gây ra hoặc các tình huống như phẫu thuật ở các bệnh nhân dường như có nguy cơ mắc DIC. Theo một số phương án, chế phẩm ức chế LEA-1 có thể được sử dụng một cách thích hợp ở dạng liều lượng tác động nhanh,

như bằng cách phân phối trong tĩnh mạch hoặc trong động mạch một liều lớn dung dịch chứa chế phẩm ức chế LEA-1.

Theo một phương án, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế còn bao gồm việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của chứng đông máu rải rác trong lòng mạch ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng đó. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đông máu rải rác trong lòng mạch khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng cần điều trị ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có

thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát. Đối với DIC thứ phát với chấn thương hoặc sự kiện cấp tính khác, chế phẩm ức chế MASP-2 có thể được sử dụng ngay sau tổn thương do chấn thương hoặc theo hướng phòng ngừa trước, trong, ngay sau, hoặc trong vòng từ một đến bảy ngày hoặc lâu hơn, như trong vòng từ 24 giờ đến 72 giờ, sau tổn thương do chấn thương gây ra hoặc các tình huống như phẫu thuật ở các bệnh nhân dường như có nguy cơ mắc bệnh DIC. Theo một số phương án, chế phẩm ức chế MASP-2 có thể được sử dụng một cách thích hợp ở dạng liều lượng tác động nhanh, như bằng cách phân phối trong tĩnh mạch hoặc trong động mạch một liều lớn dung dịch chứa chế phẩm ức chế MASP-2.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và tùy ý chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của chứng đông máu rải rác trong lòng mạch ở đối tượng cần điều trị. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng trải qua, hoặc có nguy cơ phát triển chứng đông máu rải rác trong lòng mạch.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như đông máu rải rác trong lòng mạch.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển đông máu rải rác trong lòng mạch bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm

nguy cơ phát triển chứng đông máu rải rác trong lòng mạch, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

F. Vai trò của MASP-3 trong bệnh mao mạch huyết khối (TMA), bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (AHUS) và ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Bệnh mao mạch huyết khối (TMA) dùng để chỉ nhóm các rối loạn được đặc trưng về mặt lâm sàng bởi chứng giảm tiểu cầu, chứng thiếu máu tan máu mao mạch, và chứng thiếu máu cục bộ biến đổi trong cơ quan. Các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của TMA là sự hoạt hóa tiểu cầu và sự hình thành microthrombi trong các tiểu động mạch và tiểu tĩnh mạch nhỏ. TMA cổ điển là hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS) và ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP). HUS được phân biệt với TTP bởi sự có mặt của bệnh suy thận cấp. HUS xuất hiện ở hai dạng: HUS liên quan đến tiêu chảy (D+) hoặc HUS điển hình, và HUS âm tính với tiêu chảy (D-) hoặc không điển hình (aHUS).

HUS

D+HUS liên quan đến tình trạng ốm do tiêu chảy báo trước thường do *Escherichia coli* O157 hoặc một chủng vi khuẩn sản sinh độc tố Shiga khác gây ra, chiếm trên 90% số trường hợp HUS ở trẻ em, và là nguyên nhân phổ biến nhất gây bệnh suy thận cấp ở trẻ em. Mặc dù lây nhiễm *Escherichia coli* O157 ở người là tương đối thường xuyên, phần trăm bệnh tiêu chảy ra máu tiến triển thành D+HUS nằm trong khoảng từ 3% đến 7% trong các trường hợp rải rác và từ 20% đến 30% trong một số đợt bùng phát dịch (Zheng, X.L. and Sadler, J.E., Annu. Rev. Pathol.

3:249-277, 2008). HUS thường diễn ra trong từ 4 đến 6 ngày sau khi phát bệnh tiêu chảy và khoảng hai phần ba trẻ em cần phải thẩm tách trong pha cấp tính của bệnh. Việc điều trị D+HUS mang tính hỗ trợ do không có phương pháp điều trị đặc hiệu nào cho thấy là có hiệu quả. Việc tiên lượng D+HUS được ưu tiên, với phần lớn các bệnh nhân phục hồi được chức năng thận.

Quá trình sinh bệnh của D+HUS bao gồm độc tố Shiga sản sinh bởi vi khuẩn liên kết với các màng trên tế bào nội mô vi mạch, bạch cầu đơn nhân, và tiểu cầu. Hệ vi mạch của thận thường bị ảnh hưởng nhiều nhất. Sau khi liên kết, độc tố này được tiếp nhận, dẫn đến việc giải phóng chất điều tiết tiền viêm và cuối cùng là sự chết tế bào. Được cho là sự phá hủy tế bào nội mô khởi phát chứng huyết khối vi mạch thận bằng cách thúc đẩy sự hoạt hóa của tầng đông máu. Có bằng chứng về sự hoạt hóa của hệ thống bổ thể trong D+HUS. Ở trẻ em có D+HUS, nồng độ trong huyết tương của Bb và SC5b-9 gia tăng tại thời điểm nhập viện so với các đối chứng bình thường và, vào ngày 28 sau khi ra viện, nồng độ trong huyết tương về chuẩn (Thurman, J.M. et al., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4:1920-1924, 2009). Độc tố Shiga 2 (Stx2) được phát hiện ra là hoạt hóa bổ thể người trong pha lỏng *in vitro*, chủ yếu thông qua con đường nhánh do sự hoạt hóa tiếp diễn khi có mặt axit etylen glycol tetraaxetic mà phong bế con đường cổ điển (Orth, D. et al., *J. Immunol.* 182:6394-6400, 2009). Ngoài ra, yếu tố H liên kết Stx2 và không liên kết yếu tố I, và trì hoãn hoạt tính đồng yếu tố của yếu tố H trên bề mặt tế bào (Orth et al, 2009, nêu trên). Các kết quả này đề xuất rằng độc tố Shiga có thể gây ra sự phá hủy thận thông qua các cơ chế tiềm ẩn, bao gồm tác dụng gây độc trực tiếp, và gián tiếp thông qua sự hoạt hóa của bổ thể hoặc sự ức chế các chất điều hòa bổ thể. Tác động của độc tố đến nội mô mạch được mong đợi là làm hoạt hóa bổ thể thông qua LEA-2, như được chứng minh bởi hiệu quả của việc phong bế MASP-2 trong ngăn chặn tổn thương do tái tưới máu qua trung gian bổ thể trong các tầng mạch khác nhau như được mô tả trong tài liệu Schwaeble, W.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:7523-7528, 2011.

Trong mô hình chuột có HUS được cảm ứng bởi việc tiêm đồng thời độc tố Shiga và lipopolysacarit, chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B ít giảm tiểu cầu hơn và được

bảo vệ để không bị suy thận so với chuột nhắt loại dại, chỉ ra sự hoạt hóa phụ thuộc vào LEA-1 của con đường nhánh trong chứng huyết khối vi mạch (Morigi, M. et al., *J. Immunol.* 187:172-180, 2011). Như được mô tả trong bản mô tả này, trong cùng mô hình đó, việc sử dụng kháng thể MASP-2 cũng có hiệu quả và làm tăng khả năng sống sau thách thức STX, chỉ ra con đường bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 trong chứng huyết khối vi mạch.

Dựa trên phần mô tả ở trên đây, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có lợi ích trị liệu độc lập trong điều trị hoặc ngăn ngừa HUS. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng hơn của các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.aHUS

HUS không điển hình là bệnh hiếm, với tỷ lệ mắc được ước tính ở Hoa Kỳ là 2 trên một triệu người (Loirat, C. and Fremeaux-Bacchi, V. Orphanet *J. Rare Dis.* 6:60-90, 2011). HUS không điển hình có thể phát triển ở độ tuổi bất kỳ, mặc dù phần lớn bệnh nhân phát bệnh khi là trẻ em. HUS không điển hình là dạng không đồng nhất: một số trường hợp là do di truyền, một số là do tái phát, và một số được khởi phát bởi ốm do lây nhiễm, thường là dải hô hấp trên hoặc viêm dạ dày ruột. Sự phát bệnh aHUS thường là đột ngột và hầu hết các bệnh nhân cần phải thẩm tách khi nhập viện. Các biểu hiện ngoài thận xuất hiện trong khoảng 20% bệnh nhân và có thể liên quan đến hệ thần kinh trung ương, nhồi máu cơ tim, hoại tử do thiếu máu cục bộ ngoại biên, hoặc suy đa cơ quan. Việc điều trị aHUS bao gồm điều trị hỗ trợ cho chứng loạn chức năng cơ quan, truyền huyết tương hoặc trao đổi huyết tương, và eculizumab, kháng thể đơn dòng được làm giống như của người hướng đích C5 mà

mới được phê duyệt để sử dụng ở Hoa Kỳ và Liên bang Châu Âu. Việc tiên lượng đối với aHUS không được tốt như đối với D+HUS, với tỷ lệ chết khoảng 25% trong giai đoạn cấp và hầu hết các đối tượng còn sống đều phát triển bệnh thận giai đoạn cuối.

HUS không điển hình dưới dạng bệnh rối loạn điều hòa bổ thể đặc trưng ở chỗ khoảng 50% số bệnh nhân có đột biến ở các gen mã hóa protein điều hòa bổ thể (Zheng and Sadler, 2008 nêu trên). Hầu hết các đột biến đều được thấy trong yếu tố H (FH); các đột biến khác bao gồm protein đồng yếu tố màng (MCP), yếu tố I (FI), yếu tố B, và C3. Các nghiên cứu chức năng cho thấy rằng các đột biến trong FH, MCP, và FI dẫn đến sự mất chức năng và do đó hoạt hóa bổ thể nhiều hơn, trong khi đó các đột biến trong yếu tố B lại có được chức năng. Các tác động của các đột biến này chủ yếu ảnh hưởng đến con đường nhánh. Các bất thường di truyền này là yếu tố nguy cơ chứ không phải là nguyên nhân duy nhất gây bệnh do khoảng 50% thành viên trong gia đình mang đột biến không biểu hiện bệnh trước độ tuổi 45 (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2011 nêu trên).

Yếu tố H là protein kiểm soát bổ thể mà bảo vệ mô chủ khỏi sự tấn công bổ thể của con đường nhánh. FH điều hòa vòng khuếch đại con đường nhánh theo ba cách: nó là đồng yếu tố đối với FI, phân cắt C3b, nó ức chế sự hình thành C3 convertaza của con đường nhánh, C3bBb, và nó liên kết với polyanion trên bề mặt tế bào và cơ chất mô và ngăn chặn sự kết lắng C3b (Atkinson, J.P. and Goodship, T.H.J., *J. Exp. Med.* 6:1245-1248, 2007). Phần lớn các đột biến FH ở các bệnh nhân aHUS xuất hiện trong miền lặp liên ứng ngắn đầu tận C của protein, dẫn đến sự liên kết thiếu hụt của FH với heparin, C3b, và nội mô, nhưng không làm thay đổi sự điều hòa C3 trong huyết tương nằm giữa các miền đầu tận N (Pickering, M.C. et al., *J. Exp. Med.* 204:1249-1256, 2007). Chuột nhắt thiếu hụt FH có sự hoạt hóa C3 trong huyết tương chưa được kiểm soát và phát triển theo hướng tự phát bệnh viêm thận tiểu cầu tăng sinh màng typ II, nhưng không phát triển aHUS. Tuy nhiên, chuột nhắt thiếu hụt FH biểu hiện theo hướng chuyển gen protein FH của chuột nhắt mà tương đương về mặt chức năng với thể đột biến FH người liên quan đến aHUS phát triển

theo hướng tự phát aHUS nhưng không phát triển chứng viêm thận tiểu cầu tăng sinh màng typ II, cung cấp bằng chứng *in vivo* rằng việc kiểm soát thiếu hụt sự hoạt hóa con đường nhánh trong nội mô thận là sự kiện chủ chốt trong quá trình sinh bệnh aHUS liên quan đến FH (Pickering et al., 2007 nêu trên). Một dạng khác của aHUS liên quan đến FH xuất hiện ở các bệnh nhân có các tự kháng thể kháng FH dẫn đến việc mất hoạt tính chức năng FH; hầu hết các bệnh nhân này có đột biến khuyết gen mã hóa năm protein liên quan đến FH (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2011, nêu trên).

Tương tự với FH, MCP ức chế sự hoạt hóa bổ thể bằng cách điều hòa sự kết lắng C3b trên các tế bào đích. Đột biến MCP tạo ra protein có hoạt tính liên kết C3b và đồng yếu tố thấp, vì thế cho phép sự hoạt hóa con đường nhánh bị rối loạn điều hòa. FI là serin proteaza phân cắt C3b và C4b khi có mặt các đồng yếu tố, như FH và MCP, và từ đó ngăn chặn sự hình thành của C3 và C5 convertaza và ức chế cả con đường bổ thể nhánh và cổ điển. Hầu hết đột biến aHUS liên quan đến FI dẫn đến việc giảm hoạt tính FI để thoái biến C3b và C4b (Zheng and Stadler, 2008, nêu trên). FB là zymogen mang điểm xúc tác của convertaza con đường nhánh C3bBb. Phân tích chức năng cho thấy rằng đột biến FB liên quan đến aHUS dẫn đến việc hoạt hóa con đường nhánh tăng lên (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2011, nêu trên). Đột biến dị hợp tử trong C3 liên quan đến aHUS. Hầu hết các đột biến C3 cảm ứng sự thiếu hụt C3 để liên kết MCP, dẫn đến việc tăng khả năng liên kết với C3b của FB và tăng sự hình thành của C3 convertaza (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2011, nêu trên). Vì thế, aHUS là bệnh liên quan mật thiết đến các đột biến trong gen bổ thể mà dẫn đến sự kiểm soát không đầy đủ của vòng khuếch đại con đường nhánh. Do vòng khuếch đại con đường nhánh phụ thuộc vào hoạt tính phân hủy protein của yếu tố B, và do cần phải có LEA-1 để hoạt hóa yếu tố B (bằng cách phân cắt phụ thuộc vào MASP-3 hoặc bằng cách phân cắt qua trung gian yếu tố D trong đó MASP-1 góp phần vào quá trình thuần thục của yếu tố D), nên chất phong bế LEA-1 được mong đợi là ngăn chặn sự hoạt hóa bổ thể chưa được kiểm soát trong các cá thể mẫn cảm. Do đó, được mong đợi rằng chất phong bế LEA-1 sẽ điều trị bệnh aHUS một cách hiệu quả.

Trong khi vai trò chính của vòng khuếch đại con đường nhánh đã mất điều hòa trong aHUS được chấp nhận một cách rộng rãi, các tác nhân khởi phát khởi phát sự hoạt hóa bổ thể và các con đường phân tử có liên quan vẫn chưa được giải đáp. Không phải tất cả các cá thể mang các đột biến nêu trên đều phát triển aHUS. Trên thực tế, các nghiên cứu di truyền đã đề xuất rằng sự thâm nhập của aHUS là chỉ ~50% (Sullivan M. et al., *Ann Hum Genet* 74:17-26 2010). Tiền sử tự nhiên của bệnh đề xuất rằng aHUS thường phát triển nhất sau sự kiện khởi phát như giai đoạn lây nhiễm hoặc tổn thương. Tác nhân lây nhiễm đã được biết rõ là hoạt hóa hệ thống bổ thể. Khi không có tính miễn dịch thích ứng tồn tại từ trước đó, thì sự hoạt hóa bổ thể bởi các tác nhân lây nhiễm có thể chủ yếu được khởi phát thông qua LEA-1 hoặc LEA-2. Vì thế, sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin được khởi phát bởi lây nhiễm có thể là tác nhân khởi phát cho sự khuếch đại bệnh lý sau đó của quá trình hoạt hóa bổ thể ở các cá thể bị ảnh hưởng từ trước bởi aHUS, mà cuối cùng có thể dẫn đến sự tiến triển bệnh. Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế bao gồm việc điều trị cho bệnh nhân mắc aHUS thứ phát với lây nhiễm bằng cách sử dụng lượng có tác dụng của chất ức chế LEA-1 hoặc chất ức chế LEA-2.

Các dạng tổn thương khác đối với mô chủ sẽ hoạt hóa bổ thể thông qua LEA-2, đặc biệt là tổn thương đối với nội mô mạch. Các tế bào nội mô mạch ở người chịu ứng kích oxy hóa, ví dụ, đáp ứng bằng cách biểu hiện các gốc bề mặt liên kết lectin và hoạt hóa con đường LEA-2 của bổ thể (Collard et al., *Am J. Pathol* 156(5):1549-56, 2000). Tổn thương mạch sau thiếu máu cục bộ/tái tưới máu cũng hoạt hóa bổ thể thông qua LEA-2 *in vivo* (Moller-Kristensen et al., *Scand J Immunol* 61(5):426-34, 2005). Sự hoạt hóa con đường lectin trong thiết lập này có các hậu quả bệnh lý cho vật chủ, và như được thể hiện trong Ví dụ 22 và ví dụ 23, sự ức chế LEA-2 bằng cách phong bế MASP-2 làm ngăn chặn hơn nữa sự tổn thương mô chủ và các hậu quả bất lợi (cũng xem trong tài liệu Schwaeble PNAS, 2011, nêu trên).

Vì thế, các quy trình khác thúc đẩy aHUS cũng được biết đến là hoạt hóa LEA-1 hoặc LEA-2. Do đó, có khả năng là con đường LEA-1 và/hoặc LEA-2 có thể tượng trưng cho cơ chế hoạt hóa bổ thể ban đầu mà được khuếch đại một cách không

thích hợp theo cách mất điều hòa ở các cá thể bị ảnh hưởng di truyền từ trước đối với aHUS, vì thế khởi phát quá trình sinh bệnh aHUS. Bằng cách suy luận, các chất ngăn chặn sự hoạt hóa của bổ thể thông qua LEA-1 và/hoặc LEA-2 được mong đợi là ngăn chặn sự tiến triển bệnh hoặc làm giảm sự trầm trọng ở các cá thể mẫn cảm với aHUS.

Để củng cố thêm cho khái niệm này, các nghiên cứu gần đây đã nhận biết *Streptococcus-pneumoniae* là tác nhân gây bệnh quan trọng trong các trường hợp aHUS ở trẻ nhỏ. (Lee, C.S. et al, *Nephrology*, 17(1):48-52 (2012); Banerjee R. et al., *Pediatr Infect Dis J.*, 30(9):736-9 (2011)). Căn bệnh đặc biệt này có vẻ là có tiên lượng bất lợi, với tỷ lệ chết đáng kể và trạng thái bệnh lâu dài. Đáng chú ý là, các trường hợp này liên quan đến các lây nhiễm không phải trong ruột dẫn đến các biểu hiện của bệnh mao mạch, ure huyết và chứng tan máu mà không có dấu hiệu của các đột biến đồng thời trong gen bổ thể đã được biết đến là ảnh hưởng từ trước đến aHUS. Quan trọng là nên lưu ý rằng, *S. pneumoniae* đặc biệt hiệu quả trong việc hoạt hóa bổ thể, và vì thế chủ yếu là thông qua LEA-2. Vì thế, trong trường hợp HUS không phải trong ruột liên quan đến bệnh nhiễm *pneumococcal*, các biểu hiện của bệnh mao mạch, ure huyết và tan máu được mong đợi là chủ yếu được điều khiển bằng cách hoạt hóa LEA-2, và các chất phong bế LEA-2, bao gồm kháng thể MASP-2, được mong đợi là ngăn chặn sự tiến triển của aHUS hoặc làm giảm độ nghiêm trọng bệnh ở các bệnh nhân này. Do đó, một khía cạnh khác của sáng chế bao gồm việc điều trị cho bệnh nhân mắc aHUS không phải trong ruột liên quan đến lây nhiễm *S. pneumoniae* bằng cách sử dụng lượng có tác dụng của chất ức chế MASP-2.

TTP

Ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) là rối loạn đe dọa sự sống của hệ đông máu gây ra bởi các rối loạn chức năng tự miễn hoặc di truyền mà hoạt hóa đợt đông máu hoặc hệ thống bổ thể (George, JN, *N Engl J Med*; 354:1927-35, 2006). Điều này tạo ra nhiều cục đông cực nhỏ, hoặc các cục máu tụ, trong các mạch máu nhỏ trong toàn bộ cơ thể, mà là dấu hiệu đặc trưng của TMA. Các tế bào hồng cầu chịu ứng suất cắt, ứng suất này phá hủy màng của chúng, dẫn đến tình trạng tan máu nội mạch. Dòng máu giảm thu được và tổn thương nội mô dẫn đến sự phá hủy cơ

quan, bao gồm não, tim, và thận. TTP được đặc trưng lâm sàng bởi chứng giảm tiểu cầu, chứng thiếu máu tan máu mao mạch, các thay đổi thần kinh, suy thận và sốt. Trong giai đoạn trước khi trao đổi huyết tương, mức độ rủi ro là 90% trong giai đoạn cấp tính. Thậm chí với trao đổi huyết tương, sự sống sót trong sáu tháng là khoảng 80%.

TTP có thể bắt nguồn từ sự ức chế di truyền hoặc ức chế mắc phải của enzym ADAMTS-13, metalloproteaza chịu trách nhiệm về việc phân cắt các multime lớn của yếu tố von Willebrand (vWF) thành các đơn vị nhỏ hơn. Sự ức chế hoặc sự thiếu hụt ADAMTS-13 cuối cùng dẫn đến sự gia tăng đông máu (Tsai, H. *J Am Soc Nephrol* 14: 1072–1081, 2003). ADAMTS-13 điều hòa hoạt tính của vWF; khi không có ADAMTS-13, vWF tạo ra các multime lớn hơn mà có khả năng cao hơn trong việc liên kết tiểu cầu và ảnh hưởng từ trước đến sự kết tụ tiểu cầu và chứng huyết khối trong hệ vi mạch ở các bệnh nhân.

Nhiều đột biến trong ADAMTS13 đã được nhận biết ở các cá thể có TTP. Bệnh này cũng có thể phát triển do các tự kháng thể kháng ADAMTS-13. Ngoài ra, TTP có thể phát triển khi ung thư vú, dải dạ dày-ruột, hoặc tuyến tiền liệt (George JN., *Oncology* (Williston Park). 25:908-14, 2011), mang thai (tam cá nguyệt thứ hai hoặc sau khi sinh), (George JN., *Curr Opin Hematol* 10:339-344, 2003), hoặc liên quan đến các bệnh, như HIV hoặc các bệnh tự miễn như bệnh luput ban đỏ hệ thống (Hamasaki K, et al., *Clin Rheumatol*. 22:355-8, 2003). TTP cũng có thể bị gây ra bởi một số liệu pháp dùng thuốc, bao gồm heparin, quinin, thành phần điều tiết miễn dịch, chất hóa trị ung thư (bleomyxin, xisplatin, xytosin arabinosit, daunomyxin gemxitabin, mitomyxin C, và tamoxifen), xyclosporin A, thuốc tránh thai dùng qua đường miệng, penixilin, rifampin và các thuốc kháng tiểu cầu bao gồm ticlopidin và clopidogrel (Azarm, T. et al., *J Res Med Sci*., 16: 353–357, 2011). Các yếu tố hoặc tình trạng bệnh lý khác liên quan đến TTP là các độc tố như nọc độc ong, nhiễm trùng huyết, tạo mảnh trong lách, cấy ghép, viêm mạch, phẫu thuật mạch, và các bệnh nhiễm như *Streptococcus pneumoniae* và cytomegalovirut (Moake JL., *N Engl J Med*., 347:589–600, 2002). TTP do sự thiếu hụt ADAMTS-13 chức năng tạm thời

có thể xuất hiện dưới dạng hậu quả của tổn thương tế bào nội mô liên quan đến lây nhiễm *S. pneumoniae* (*Pediatr Nephrol*, 26:631-5, 2011).

Trao đổi huyết tương là phương pháp điều trị tiêu chuẩn cho TTP (Rock GA, et al., *N Engl J Med* 325:393-397, 1991). Trao đổi huyết tương thay thế hoạt tính ADAMTS-13 ở các bệnh nhân bằng các thiếu hụt di truyền và loại bỏ các tự kháng thể ADAMTS-13 ở các bệnh nhân có TTP tự miễn mắc phải này (Tsai, H-M, *Hematol Oncol Clin North Am.*, 21(4): 609–v, 2007). Các chất bổ sung như thuốc ức chế miễn dịch thường được bổ sung vào liệu pháp (George, JN, *N Engl J Med*, 354:1927-35, 2006). Tuy nhiên, sự trao đổi huyết tương lại không thành công ở khoảng 20% bệnh nhân, sự tái phát bệnh thì xảy ra ở hơn một phần ba bệnh nhân, và liệu pháp huyết tương tinh chế thì đắt đỏ và cần có kỹ thuật. Ngoài ra, nhiều bệnh nhân không thể dung nạp liệu pháp trao đổi huyết tương. Do đó, vẫn thực sự cần có phương pháp điều trị bổ sung và tốt hơn cho TTP.

Do TTP là rối loạn của đợt đông máu, nên việc điều trị bằng các chất đối kháng của hệ thống bổ thể có thể hỗ trợ việc làm ổn định và chữa bệnh. Trong khi sự hoạt hóa bệnh lý của con đường bổ thể nhánh được kết hợp với aHUS, vai trò của việc hoạt hóa bổ thể trong TTP là ít rõ rệt. Sự thiếu hụt chức năng của ADAMTS13 là quan trọng đối với tính mẫn cảm với TTP, tuy nhiên nó không đủ để gây ra các giai đoạn cấp tính. Các yếu tố môi trường và/hoặc các biến thể di truyền khác có thể góp phần vào quá trình biểu hiện TTP. Ví dụ, các gen mã hóa protein liên quan đến sự điều hòa đợt đông máu, vWF, chức năng tiểu cầu, các thành phần của bề mặt mạch nội mô, hoặc hệ thống bổ thể có thể liên quan đến sự phát triển bệnh mao mạch huyết khối cấp tính (Galbusera, M. et al., *Haematologica*, 94: 166–170, 2009). Cụ thể, sự hoạt hóa bổ thể đã cho thấy là đóng vai trò quan trọng; huyết thanh từ bệnh mao mạch huyết khối liên quan đến sự thiếu hụt ADAMTS-13 đã cho thấy là gây kết lắng C3 và MAC và sự hoạt hóa ưa trung tính sau đó mà có thể được loại bỏ bằng cách bất hoạt bổ thể (Ruiz-Torres MP, et al., *Thromb Haemost*, 93:443-52, 2005). Ngoài ra, gần đây đã cho thấy rằng, có nồng độ C4d, C3bBbP, và C3a gia tăng trong giai đoạn cấp tính của TTP (M. Réti et al., *J Thromb Haemost*. 10(5):791-798, 2012),

nhất quán với sự hoạt hóa của con đường cổ điển, con đường lectin và con đường nhánh. Lượng hoạt hóa bổ thể gia tăng trong giai đoạn cấp tính này có thể khởi phát sự hoạt hóa con đường tận cùng và chịu trách nhiệm về tình trạng trầm trọng hơn nữa của bệnh TTP.

Vai trò của ADAMTS-13 và vWF trong TTP rõ ràng là chịu trách nhiệm về sự hoạt hóa và kết tụ tiểu cầu và vai trò sau đó của chúng trong ứng suất cắt và kết lắng trong các bệnh mao mạch. Tiểu cầu đã hoạt hóa tương tác với và khởi phát cả con đường cổ điển và con đường nhánh của bổ thể. Sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian tiểu cầu làm tăng chất điều tiết viêm C3a và C5a (Peerschke E. et al., *Mol Immunol*, 47:2170-5 (2010)). Vì thế tiểu cầu có thể nhằm làm đích của quá trình hoạt hóa bổ thể cổ điển trong TTP di truyền hoặc tự miễn.

Như được mô tả ở trên, sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin của bổ thể, theo hoạt tính giống thrombin của MASP-1 và sự hoạt hóa prothombin qua trung gian LEA-2, là con đường phân tử nổi bật liên kết tổn thương nội mô với chứng đông máu và chứng huyết khối vi mạch xuất hiện trong HUS. Tương tự, sự hoạt hóa của LEA-1 và LEA-2 có thể điều khiển một cách trực tiếp hệ đông máu trong TTP. Sự hoạt hóa con đường LEA-1 và LEA-2 có thể được khởi phát đáp ứng với tổn thương nội mô ban đầu gây ra bởi sự thiếu hụt ADAMTS-13 trong TTP. Do đó, được mong đợi là chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2, bao gồm nhưng không giới hạn ở các kháng thể phong bế chức năng MASP-2, chức năng MASP-1, chức năng MASP-3, hoặc chức năng MASP-1 và MASP-3 sẽ giảm nhẹ các bệnh mao mạch liên quan đến chứng đông máu trong vi mạch, chứng huyết khối, và chứng tan máu ở các bệnh nhân mắc TTP.

Các bệnh nhân mắc TTP thường nằm phòng cấp cứu với một hoặc nhiều triệu chứng sau: ban xuất huyết, suy thận, tiểu cầu thấp, thiếu máu và/hoặc huyết khối, bao gồm đột quỵ. Tiêu chuẩn điều trị hiện nay cho TTP bao gồm phân phối trong ống thông (ví dụ, trong tĩnh mạch hoặc dạng ống thông khác) liệu pháp huyết tương tinh chế thay thế trong giai đoạn hai tuần hoặc lâu hơn, thường là ba lần một tuần, nhưng lên đến hằng ngày. Nếu thử nghiệm này dương tính về sự có mặt của chất ức

chế ADAMTS13 (tức là, kháng thể nội sinh kháng ADAMTS13), thì liệu pháp huyết tương tinh chế có thể được tiến hành kết hợp với liệu pháp ức chế miễn dịch (ví dụ, corticosteroit, rituxan, hoặc xyclosporin). Các đối tượng có TTP khó chữa (khoảng 20% bệnh nhân TTP) không đáp ứng với liệu pháp huyết tương tinh chế trong ít nhất hai tuần.

Theo như trên đây, theo một phương án, trong thiết lập của chẩn đoán TTP ban đầu, hoặc ở đối tượng có một hoặc nhiều triệu chứng nhất quán với sự chẩn đoán TTP (ví dụ, tình trạng liên lụy đến hệ thần kinh trung ương, chứng giảm tiểu cầu nghiêm trọng (số lượng tiểu cầu thấp hơn hoặc bằng 5000/μL nếu không có aspirin, thấp hơn hoặc bằng 20000/μL nếu có aspirin), tình trạng liên lụy đến tim nghiêm trọng, tình trạng liên lụy đến phổi nghiêm trọng, nhồi máu hoặc hoại tử dạ dày-ruột), sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng với lượng có tác dụng của chất ức chế LEA-2 (ví dụ, kháng thể MASP-2) hoặc chất ức chế LEA-1 (ví dụ, kháng thể MASP-1 hoặc MASP-3) làm liệu pháp hàng đầu khi không có liệu pháp huyết tương tinh chế, hoặc kết hợp với liệu pháp huyết tương tinh chế. Dưới dạng liệu pháp hàng đầu, chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác. Theo một số phương án, chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 được sử dụng cho đối tượng như là liệu pháp hàng đầu khi không có liệu pháp huyết tương tinh chế để tránh các biến chứng tiềm ẩn của liệu pháp huyết tương tinh chế, như xuất huyết, lây nhiễm, và tiếp xúc với rối loạn và/hoặc dị ứng di truyền trong đối tượng cho huyết tương, hoặc ở đối tượng kháng liệu pháp huyết tương tinh chế, hoặc trong thiết lập mà liệu pháp huyết tương tinh chế không có giá trị. Theo một số phương án, chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 được sử dụng cho đối tượng mắc TTP kết hợp (bao gồm sử dụng đồng thời) với chất ức chế miễn dịch (ví dụ, corticosteroit, rituxan hoặc xyclosporin) và/hoặc kết hợp với ADAMTS-13 đậm đặc.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước sử dụng chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 cho đối tượng mắc TTP thông qua ống thông (ví

dụ, trong tĩnh mạch) trong khoảng thời gian thứ nhất (ví dụ, pha cấp tính kéo dài ít nhất một ngày đến một tuần hoặc hai tuần) sau đó sử dụng chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 dưới da cho đối tượng trong khoảng thời gian thứ hai (ví dụ, pha mạn tính trong ít nhất hai tuần hoặc lâu hơn). Theo một số phương án, việc sử dụng trong khoảng thời gian thứ nhất và/hoặc thứ hai diễn ra khi không có liệu pháp huyết tương tinh chế. Theo một số phương án, phương pháp này được sử dụng cho đối tượng nhằm duy trì để ngăn chặn không cho đối tượng mắc một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến TTP.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc TTP khó chữa (tức là, đối tượng không đáp ứng với liệu pháp lọc huyết tương ít nhất hai tuần), bằng cách sử dụng lượng chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 có tác dụng làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của TTP. Theo một phương án, chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 được sử dụng cho đối tượng có TTP khó chữa trên cơ sở mạn tính, trong khoảng thời gian ít nhất hai tuần hoặc lâu hơn thông qua việc dùng dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước xác định nồng độ của ít nhất một yếu tố bổ thể (ví dụ, C3, C5) ở đối tượng trước khi điều trị, và tùy ý trong khi điều trị, trong đó việc xác định nồng độ của ít nhất một yếu tố bổ thể giảm đi so với giá trị tiêu chuẩn hoặc đối tượng khỏe mạnh đối chứng là chỉ báo cho nhu cầu về việc tiếp tục điều trị bằng chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng, dưới da hoặc trong tĩnh mạch, chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển, TTP. Việc điều trị tốt hơn là hằng ngày, nhưng cũng có thể không thường xuyên như hằng tháng. Việc điều trị được tiếp tục cho đến khi số lượng tiểu cầu ở đối tượng cao hơn 150000/ml trong ít nhất hai ngày liên tiếp.

Tóm lại, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có lợi ích trị liệu độc lập trong điều trị TMA, bao gồm HUS, aHUS và TTP. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau được mong đợi là đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng hơn của các nhóm con bệnh nhân mắc các dạng biến thể của TMA. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh mao mạch huyết khối, như hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP 1, chất ức chế MASP 3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP 1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh mao mạch huyết khối. Chế phẩm ức chế MASP 1, MASP 3, hoặc MASP 1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một phương án, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế còn bao gồm việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh mao mạch huyết khối, như hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình

(aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh mao mạch huyết khối. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh mao mạch huyết khối khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được ví dụ, bằng cách sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, đối tượng này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và tùy ý chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng dùng một lần chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh mao mạch huyết khối ở đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển, bệnh mao mạch huyết khối. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như bệnh mao mạch huyết khối (ví dụ, hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS), hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP).

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh mao mạch huyết khối (ví dụ,hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS), hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh mao mạch huyết khối (ví dụ, hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS), ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), hoặc TMA liên quan đến mảnh ghép (TA-TMA), như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257,

SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

G. Vai trò của MASP-3 trong bệnh hen suyễn và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Hen suyễn là bệnh viêm mạn tính phổ biến của đường thở. Khoảng 25 triệu người ở Hoa Kỳ có bệnh hen suyễn, bao gồm bảy triệu trẻ em dưới 18 tuổi, với hơn một nửa trải qua ít nhất một đợt tấn công của bệnh hen suyễn mỗi năm, dẫn đến hơn 1,7 triệu ca cấp cứu và 450000 ca nhập viện hằng năm (địa chỉ website toàn cầu là gov/health/prof/lung/asthma/naci/asthma-info/index.htm., được truy cập vào 4/5/2012). Bệnh này không đồng nhất với nhiều kiểu hình lâm sàng. Kiểu hình phổ biến nhất là hen suyễn dị ứng. Các kiểu hình khác bao gồm hen suyễn không dị ứng, bệnh hô hấp trở nặng do aspirin, hen suyễn sau lây nhiễm, hen suyễn do nghề nghiệp, hen suyễn do kích thích với không khí, và hen suyễn do thể dục. Dấu hiệu chính của bệnh hen suyễn dị ứng bao gồm tăng đáp ứng đường thở (AHR) với các thể kích thích đặc hiệu và không đặc hiệu khác nhau, sản sinh quá mức dịch nhầy đường thở, bệnh phổi tăng bạch cầu ưa eozin, và gia tăng nồng độ của huyết thanh IgE. Các triệu chứng của bệnh hen suyễn bao gồm ho, thở khò khè, tức ngực, và thở ngắn. Mục đích của việc điều trị hen suyễn là kiểm soát bệnh và tối thiểu hóa độ trầm trọng, các triệu chứng hằng ngày, và cho phép các bệnh nhân hoạt động thể chất. Việc điều trị hiện nay chỉ dẫn các điều trị từng bước đã được khuyến cáo cho đến khi đạt được sự kiểm soát bệnh hen suyễn. Bước điều trị đầu tiên là dưới dạng chất chủ vận β2 tác động nhanh cần thiết dạng xông hít, sau đó đến bổ sung các thuốc kiểm soát như corticosteroit dạng xông hít, chất chủ vận β2 tác động lâu dạng xông hít, thuốc biến đổi leukotrien, theophylin, glucocorticosteroit dùng qua đường miệng, và kháng thể đơn dòng kháng IgE.

Mặc dù hen suyễn có nguồn gốc từ nhiều yếu tố, thường được chấp nhận rằng bệnh này phát sinh do đáp ứng miễn dịch không thích hợp với các kháng nguyên môi trường phổ biến trong các cá thể mẫn cảm di truyền. Bệnh hen suyễn liên quan đến sự hoạt hóa bổ thể và độc tố phản vệ (AT) C3a và C5a có tính chất tiền viêm và điều

hòa miễn dịch liên quan đến sự phát triển và điều biến của đáp ứng dị ứng (Zhang, X. and Kohl, *J. Expert. Rev. Clin. Immunol.*, 6:269-277, 2010). Tuy nhiên, sự liên quan tương đối của con đường cổ điển, con đường nhánh, và con đường lectin của bổ thể trong bệnh hen suyễn chưa được hiểu rõ. Con đường nhánh có thể được hoạt hóa trên bề mặt của các dị ứng nguyên và con đường lectin có thể được hoạt hóa thông qua việc nhận diện cấu trúc polysacarit của dị ứng nguyên, cả hai quy trình đều dẫn đến việc hình thành AT. Bổ thể có thể được hoạt hóa bằng các con đường khác nhau tùy thuộc vào dị ứng nguyên gây bệnh có liên quan. Bào tử vi khuẩn cỏ dị ứng ở mức cao thuộc họ Parietaria chẳng hạn rất hiệu quả trong việc thúc đẩy sự hoạt hóa phụ thuộc vào MBL của C4, ám chỉ LEA-2. Ngược lại, dị ứng nguyên ve bụi nhà không cần phải có MBL để hoạt hóa bổ thể (Varga et al. *Mol Immunol.*, 39(14):839-46, 2003).

Các tác nhân môi trường khởi phát bệnh hen suyễn có thể hoạt hóa bổ thể bằng con đường nhánh. Ví dụ, sự tiếp xúc *in vitro* của huyết thanh người với khói thuốc hoặc các hạt thải diesel dẫn đến việc hoạt hóa bổ thể và tác dụng này không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của EDTA, đề xuất sự hoạt hóa là thông qua con đường nhánh chứ không phải con đường cổ điển (Robbins, R.A. et al, *Am. J. Physiol.* 260: L254-L259, 1991; Kanemitsu, H., et al., *Biol. Pharm. Bull.* 21:129-132, 1998). Vai trò của con đường bổ thể trong viêm đường thở dị ứng được đánh giá ở mô hình thách thức và nhạy albumin trứng của chuột nhắt. Chuột nhắt loại đại phát triển AHR và viêm đường thở đáp ứng với thách thức dị ứng nguyên dạng khí. Protein dung hợp Crry-Ig ức chế tất cả các con đường hoạt hóa bổ thể, là protein hiệu quả để ngăn chặn AHR và viêm phổi khi được sử dụng toàn thân hoặc khu trú bằng cách xông hít trong mô hình albumin trứng của chuột nhắt có viêm phổi dị ứng (Taube et al., *Am J Respir Crit Care Med.*, 168(11):1333-41, 2003).

So với chuột nhắt loại dại, chuột nhắt thiếu hụt yếu tố B thể hiện ít AHR và viêm đường thở hơn trong khi đó chuột nhắt thiếu hụt C4 có các tác dụng tương tự như chuột nhắt loại dại (Taube, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:8084-8089, 2006). Các kết quả này hỗ trợ cho vai trò đối với con đường nhánh và không liên

quan đến con đường cổ điển trong mô hình thách thức dị ứng nguyên dạng khí của chuột. Bằng chứng khác về tầm quan trọng của con đường nhánh được đưa ra trong nghiên cứu ở yếu tố H (FH) bằng cách sử dụng cùng một mô hình chuột nhắt (Takeda, K., et al., *J. Immunol.* 188:661-667, 2012). FH là chất điều hòa âm của con đường nhánh và tác động để ngăn chặn tổn thương tự ghép của bản thân các mô. FH nội sinh được phát hiện ra là có mặt trong đường thở trong thách thức dị ứng nguyên và việc ức chế FH với chất đối kháng cạnh tranh tái tổ hợp làm tăng mức độ AHR và viêm đường thở (Takeda et al., 2012, nêu trên). Việc phân phối để điều trị bệnh của CR2-fH, protein khảm liên kết vùng liên kết iC3b/C3d của CR2 với vùng điều hòa bổ thể của FH hướng đích hoạt tính điều hòa bổ thể của fH đến các vị trí tồn tại sự hoạt hóa bổ thể, bảo vệ sự phát triển của AHR và sự xâm nhập bạch cầu ưa eozin vào đường thở sau thách thức dị ứng nguyên (Takeda et al., 2012, nêu trên). Tác dụng bảo vệ được thể hiện với albumin trứng cũng như dị ứng nguyên cỏ phấn hương, là dị ứng nguyên có liên quan ở người.

Vai trò của sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin trong bệnh hen suyễn được đánh giá trong mô hình chuột nhắt có bệnh hen suyễn do nấm (Hogaboam et al., *J. Leukocyte Biol.* 75:805 814, 2004). Các nghiên cứu này sử dụng chuột nhắt thiếu hụt về mặt di truyền lectin liên kết manan A (MBL-A), protein liên kết hydrat cacbon có chức năng như thành phần nhận diện sự hoạt hóa của con đường bổ thể lectin. Chuột nhắt MBL-A(+/+) và MBL-A(-/-) nhạy *Aspergillus. fumigatus* được kiểm tra vào ngày 4 và 28 sau thách thức i.t. bằng *A. fumigatus conidia.* AHR trong chuột nhắt MBL-A(-/-) đã được làm nhạy được làm giảm đáng kể ở cả hai lần sau thách thức bào tử đính so với nhóm MBL-A (+/+) đã được làm nhạy. Nồng độ TH2 xytokin trong phổi (IL-4, IL-5 và IL-13) giảm đi đáng kể ở chuột nhắt MBL-A(-/-) nhạy *A. fumigatus* so với nhóm loại dại vào ngày 4 sau bào tử đính. Các kết quả này chỉ ra rằng MBL-A và con đường lectin có vai trò chính trong quá trình phát triển và duy trì AHR trong bệnh hen suyễn mạn tính do nấm.

Các kết quả được nêu chi tiết ở trên đề xuất mối liên quan của sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin trong quá trình sinh bệnh hen suyễn. Dữ liệu thử nghiệm đề

xuất rằng sự hoạt hóa yếu tố B đóng vai trò nòng cốt. Theo vai trò cơ bản đối với LEA-1 trong quá trình hoạt hóa phụ thuộc vào lectin của yếu tố B và quá trình hoạt hóa của con đường nhánh sau đó, được mong đợi rằng chất phong bế LEA-1 sẽ có lợi cho việc điều trị một số dạng hen suyễn được điều tiết bởi con đường nhánh. Vì thế việc điều trị này có thể đặc biệt hữu ích đối với hen suyễn do ve bụi nhà, hoặc hen suyễn gây ra bởi tác nhân khởi phát trong môi trường như khói thuốc hoặc khí thải diesel. Mặt khác, đáp ứng hen suyễn được khởi phát bởi bào tử vi khuẩn cỏ có thể tạo ra sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Do đó, chất phong bế LEA-2 được mong đợi là đặc biệt hữu ích trong điều trị tình trạng bệnh hen suyễn ở nhóm nhỏ bệnh nhân này.

Dựa theo dữ liệu được nêu chi tiết ở trên, các tác giả sáng chế tin rằng LEA-1 và LEA-2 điều tiết sự hoạt hóa bổ thể bệnh lý trong bệnh hen suyễn. Tùy thuộc vào tác nhân dị ứng kích thích, LEA-1 hoặc LEA-2 có thể tốt hơn là có liên quan. Vì thế, chất phong bế LEA-1 được kết hợp với chất phong bế LEA-2 có thể có tính hữu ích trong điều trị nhiều dạng hen suyễn bất kể căn bệnh cơ bản. Chất phong bế LEA-1 và LEA-2 có thể có tác dụng bổ sung, cộng hợp hoặc hiệp đồng trong ngăn ngừa, điều trị hoặc đẩy lùi viêm phổi và các triệu chứng của bệnh hen suyễn.

Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh hen suyễn, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hen suyễn. Chế phẩm ức chế

MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một phương án, phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế còn bao gồm việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh hen suyễn, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hen suyễn. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh hen suyễn khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và tùy ý chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng dùng một lần chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh hen suyễn ở đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hen suyễn. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như hen suyễn.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hen suyễn bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh hen suyễn, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

H. Vai trò của MASP-3 trong bệnh viêm cầu thận màng-tăng sinh, và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Viêm thận tiểu cầu tăng sinh màng (MPGN) là rối loạn thận được đặc trưng về mặt hình thái bởi sự tăng sinh tế bào gian mao mạch và sự dày đặc của vách mao dẫn cầu thận do sự mở rộng dưới nội mô của gian mao mạch. MPGN được phân loại dưới dạng nguyên phát (còn được đề cập đến là vô căn) hoặc thứ phát, với các bệnh cơ bản như bệnh lây nhiễm, bệnh phức hợp miễn dịch toàn thân, khối u, bệnh gan mạn tính, và các bệnh khác. MPGN vô căn bao gồm ba dạng hình thái. MPGN typ I, hoặc cổ điển, được đặc trưng bởi sự kết lắng dưới nội mô của phức hợp miễn dịch và sự hoạt hóa của con đường bổ thể cổ điển. Typ II, hoặc viêm cầu thận màng-tăng sinh (DDD), được đặc trưng bởi sự kết lắng đặc cộng hợp trong màng. Typ III được đặc trưng bởi sự kết lắng cộng hợp dưới biểu mô. MPGN vô căn là bệnh hiếm, chiếm khoảng 4 đến 7% nguyên nhân gây bệnh thận cơ bản của hội chứng thận hư (Alchi, B. and Jayne, D. *Pediatr. Nephrol*. 25:1409-1418, 2010). MPGN chủ yếu ảnh hưởng đến trẻ em và người trưởng thành trẻ và có thể có mặt ở dạng hội chứng thận hư, hội chứng thận cấp, đạm niệu không triệu chứng và huyết niệu, hoặc huyết niệu tái phát với lượng máu lớn. Rối loạn chức năng thận xảy ra ở phần lớn các bệnh nhân và bệnh này có chu trình tiến triển chậm, với khoảng 40% bệnh nhân phát triển bệnh thận giai đoạn cuối trong vòng 10 năm chẩn đoán (Alchi and Jayne, 2010, nêu trên). Lựa chọn điều trị hiện nay bao gồm corticosteroit, chất ức chế miễn dịch, chế độ kháng tiểu cầu, và trao đổi huyết tương.

DDD được chẩn đoán bởi sự không có mặt globulin miễn dịch và sự có mặt C3 bằng cách nhuộm huỳnh quang miễn dịch các mẫu sinh thiết thận, và kính hiển vi điện tử thể hiện các kết lắng ưa osmium mật độ đặc trưng dọc theo màng nền cầu thận. DDD gây ra bởi rối loạn điều hòa con đường nhánh của bổ thể (Sethi et al, *Clin J Am Soc Nephrol*. 6(5):1009-17, 2011), có thể bắt nguồn từ một số cơ chế khác nhau. Tính bất thường của hệ thống bổ thể phổ biến nhất trong DDD là sự có mặt của yếu tố thận C3 mà là các tự kháng thể đối với C3 convertaza của con đường nhánh

(C3bBb), làm tăng thời gian bán rã của nó và do đó hoạt hóa con đường này (Smith, R.J.H. et al., *Mol. Immunol.* 48:1604-1610, 2011). Các bất thường ở con đường nhánh khác bao gồm tự kháng thể yếu tố H phong bế chức năng của yếu tố H, đạt được đột biến C3 chức năng, và sự thiếu hụt di truyền của yếu tố H (Smith et al., 2011, nêu trên). Các báo cáo gần đây cho thấy rằng việc điều trị bằng eclizumab (kháng thể đơn dòng kháng C5) kéo theo các cải thiện chức năng thận ở hai bệnh nhân có DDD (Daina, E. et al., *New Engl. J. Med.* 366:1161-1163, 2012; Vivarelli, M. et al., *New Engl. J. Med.* 366:1163-1165, 2012), đề xuất vai trò nguyên nhân đối với sự hoạt hóa bổ thể trong các hậu quả ở thận.

Dựa trên dữ liệu lâm sàng di truyền, chức năng và hóa mô miễn dịch và chính xác ở trên, vai trò chính đối với bổ thể trong quá trình sinh bệnh DDD được thiết lập tốt. Vì thế, các can thiệp ngăn chặn cơ chế gây bệnh của quá trình hoạt hóa bổ thể, hoặc các sản phẩm hoạt hóa bổ thể sau đó, được mong đợi là hữu ích trị liệu để điều trị tình trạng bệnh lý này.

Mặc dù dữ liệu di truyền ở người đề xuất rằng sự kiểm soát không thích hợp hoặc sự hoạt hóa quá mức của vòng khuếch đại con đường nhánh đóng vai trò chủ chốt, các sự kiện khởi phát bổ thể vẫn chưa được nhận biết. Các nghiên cứu hóa mô miễn dịch trong sinh thiết thận chỉ ra bằng chứng về sự kết lắng MBL trong mô có bệnh, đề xuất sự liên quan của con đường lectin trong quá trình khởi phát sự hoạt hóa bổ thể bệnh lý trong DDD (Lhotta et al, *Nephrol Dial Transplant.*, 14(4):881-6, 1999). Tầm quan trọng của con đường nhánh cũng được chứng thực trong mô hình thử nghiệm. Chuột nhắt thiếu hụt yếu tố H phát triển chứng đạm niệu tiến triển và đặc trưng tổn thương bệnh lý ở thận trong tình trạng bệnh lý ở người (Pickering et al., *Nat Genet.*, 31(4):424, 2002). Pickering et al. cũng cho thấy rằng việc loại bỏ yếu tố B, mà điều tiết sự hoạt hóa phụ thuộc vào LEA-1 của con đường nhánh, bảo vệ hoàn toàn chuột nhắt thiếu hụt yếu tố H khỏi bệnh DDD (Pickering et al., *Nat Genet.*, 31(4):424, 2002).

Vì thế được mong đợi rằng các chất phong bế LEA-1 sẽ phong bế một cách có hiệu quả sự hoạt hóa phụ thuộc vào lectin của con đường nhánh, và vì thế mang

lại sự điều trị có hiệu quả cho DDD. Dựa trên việc vòng khuếch đại con đường nhánh được làm rối loạn điều hòa ở các bệnh nhân DDD, cũng có thể còn mong đợi rằng các chất phong bế vòng khuếch đại sẽ có hiệu quả. Do chất hướng đích LEA-1 phong bế MASP-1 hoặc MASP-1 và MASP-3 ức chế quá trình thuần thục của yếu tố D, nên các chất này được dự đoán là phong bế một cách có hiệu quả vòng khuếch đại con đường nhánh.

Như được nêu chi tiết ở trên, sự kết lắng MBL đã nói đến được phát hiện ra ở các mẫu thận có bệnh, nhấn mạnh sự liên quan có thể có của sự kiện hoạt hóa điều khiển bởi lectin trong quá trình sinh bệnh DDD. Mỗi khi tổn thương mô ban đầu đến các mao mạch cầu thận được thiết lập, có khả năng là diễn ra sự liên kết MBL bổ sung với nội mô cầu thận bị tổn thương và các cấu trúc gian mao mạch cơ bản. Các tổn thương mô như vậy đã được biết rõ là dẫn đến sự hoạt hóa của LEA-2, vì thế có thể gây ra sự hoạt hóa bổ thể hơn nữa. Do đó, chất phong bế LEA-2 cũng được mong đợi là có tính hữu ích trong việc ngăn chặn thêm sự hoạt hóa bổ thể ở các cấu trúc cầu thận bị tổn thương, và vì thế đoán trước được nhiều hơn sự tiến triển bệnh đối với suy thận giai đoạn cuối.

Dữ liệu được nêu chi tiết ở trên đề xuất rằng LEA-1 và LEA-2 thúc đẩy các quy trình hoạt hóa bổ thể bệnh lý riêng rẽ trong DDD. Vì thế, chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2, một mình hoặc kết hợp được mong đợi là hữu ích để điều trị DDD.

Khi được sử dụng kết hợp, chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2 được mong đợi là hiệu nghiệm hơn so với một mình một trong hai chất này, hoặc hữu ích để điều trị các giai đoạn khác nhau của bệnh. Vì thế, chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2 có thể có tác dụng bổ sung, cộng hợp hoặc hiệp đồng trong ngăn ngừa, điều trị hoặc đẩy lùi rối loạn chức năng thận liên quan đến DDD.

Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA2. Tốt nhất là, chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2 có chức năng ức chế có thể được bao gồm trong

một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận màng-tăng sinh, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP 1, chất ức chế MASP 3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP 1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm cầu thận màng-tăng sinh. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận màng-tăng sinh, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm cầu thận màng-tăng sinh. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận màng-tăng sinh, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm cầu thận màng-tăng sinh.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện

trong điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận màng-tăng sinh khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Đối tượng này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và/hoặc chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa MASP-2 và/hoặc chất ức chế MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận màng-tăng sinh ở đối tượng cần điều trị. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng

tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như viêm cầu thận màng-tăng sinh.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm cầu thận màng-tăng sinh bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển viêm cầu thận màng-tăng sinh, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

I. Vai trò của MASP-3 trong bệnh viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch (NCGN) là dạng viêm thận tiểu cầu tiến triển nhanh trong đó vách mao dẫn cầu thận biểu hiện các dấu hiệu viêm mà có một lượng nhỏ phức hợp miễn dịch kết lắng dễ phát hiện ra hoặc kháng thể kháng màng nền cầu thận. Tình trạng bệnh lý này liên quan đến sự giảm nhanh chức năng thận. Hầu hết các bệnh nhân có NCGN được phát hiện ra là có các tự kháng thể bào tương kháng dạng ưa bạch cầu trung tính (ANCA) và vì thế thuộc nhóm bệnh gọi là viêm mạch liên quan đến ANCA. Viêm mạch là rối loạn ở mạch máu được đặc trưng bởi sự viêm và sự hoại tử fibrinoit của thành mạch. Viêm mạch hệ thống được

phân loại dựa trên kích thước mạch: lớn, trung bình, và nhỏ. Một vài dạng viêm mạch mạch nhỏ liên quan đến sự có mặt của ANCA, cụ thể là bệnh u hạt Wegener, viêm đa mạch cực nhỏ, hội chứng Churg-Strauss, và viêm mạch hạn chế ở thận (NCGN). Chúng cũng có thể là biểu hiện của các tình trạng bệnh lý cơ bản như luput ban đỏ hệ thống. Kháng nguyên đích đối với ANCA bao gồm proteinaza-3 (PR3) và myeloperoxidaza (MPO). NCGN nghèo miễn dịch là bệnh hiếm, với tỷ lệ mắc được báo cáo là khoảng 4 trên một triệu ở Wessex, Anh Quốc (Hedger, N. et al., *Nephrol. Dial. Transplant*. 15:1593-1599, 2000). Trong loạt 128 bệnh nhân có NCGN nghèo miễn dịch ở Wessex, 73% dương tính với ANCA và 59% bệnh nhân cần phải có thẩm tách ban đầu và 36% cần thẩm tách dài hạn. Các phương pháp điều trị cho NCGN nghèo miễn dịch bao gồm corticosteroit và chất ức chế miễn dịch như xyclophosphamit và azathioprin. Các lựa chọn điều trị bổ sung cho bệnh mạch liên quan đến ANCA bao gồm rituximab và trao đổi huyết tương (Chen, M. and Kallenberg, C.G.M. *Nat. Rev. Rheumatol*. 6:653-664, 2010).

Mặc dù NCGN được đặc trưng bởi một lượng nhỏ bổ thể kết lắng, con đường nhánh của bổ thể có liên quan đến quá trình sinh bệnh của nó. Đánh giá sinh thiết thận ở 7 bệnh nhân có NCGN nghèo miễn dịch liên quan đến MPO-ANCA phát hiện ra sự có mặt của phức hợp tấn công màng, C3d, yếu tố B, và yếu tố P (không được phát hiện ra trong các sinh thiết từ các đối chứng bình thường hoặc các bệnh nhân có bệnh thay đổi ở mức nhỏ), trong khi đó C4d và lectin liên kết manoza không được phát hiện ra, đề xuất sự hoạt hóa có chọn lọc của con đường nhánh (Xing, G.Q. et al. *J. Clin. Immunol*. 29:282-291, 2009). NCGN thử nghiệm có thể được cảm ứng bởi việc truyền IgG kháng MPO vào chuột nhắt loại dại hoặc tế bào lách kháng MPO vào chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch (Xiao, H. et al. *J. Clin. Invest*. 110:955-963, 2002). Trong mô hình chuột nhắt có NCGN này, vai trò của con đường hoạt hóa bổ thể đặc hiệu được nghiên cứu bằng cách sử dụng chuột nhắt bất hoạt. Sau khi tiêm IgG kháng MPO, chuột nhắt C4-/- phát triển bệnh thận tương tự như chuột nhắt loại dại trong khi đó chuột nhắt C5-/- và yếu tố B-/- không phát triển bệnh thận, chỉ ra rằng con đường nhánh là có liên quan trong mô hình này và con đường cổ điển và

con đường lectin thì không (Xiao, H. et al. *Am. J. Pathol.* 170:52-64, 2007). Ngoài ra, việc ủ MPO-ANCA hoặc PR3-ANCA IgG từ các bệnh nhân có tế bào ưa bạch cầu trung tính ở người đã được mồi TNF gây giải phóng các yếu tố mà dẫn đến việc hoạt hóa bổ thể trong huyết thanh bình thường của người như được phát hiện bởi việc tạo ra C3a; tác động này không được quan sát với IgG từ đối tượng khỏe mạnh, đề xuất vai trò gây bệnh tiềm ẩn của ANCA trong quá trình hoạt hóa tế bào ưa bạch cầu trung tính và bổ thể (Xiao et al., 2007, nêu trên).

Dựa trên vai trò được nêu sơ lược ở trên đối với con đường nhánh trong tình trạng bệnh lý này, mong đợi rằng việc ngăn chặn sự hoạt hóa của con đường nhánh sẽ có tính hữu ích trong điều trị NCGN dương tính với ANCA. Dựa trên yêu cầu hoạt hóa fB đối với quá trình sinh bệnh, mong đợi rằng các chất ức chế LEA-1 sẽ đặc biệt hữu ích trong điều trị tình trạng bệnh lý này, và ngăn chặn tình trạng giảm thêm chức năng thận ở các bệnh nhân này.

Một nhóm con các bệnh nhân khác nữa phát triển viêm mạch thận tiến triển hình thành gia tăng kéo theo tình trạng giảm nhanh chức năng thận khi không có ANCA. Dạng tình trạng bệnh lý này được gọi là NCGN âm tính với ANCA và chiếm khoảng một phần ba trong số tất cả các bệnh nhân có NCGN nghèo miễn dịch (Chen et al, *JASN* 18(2): 599-605, 2007). Các bệnh nhân này có xu hướng trẻ hơn, và các hậu quả ở thận có xu hướng đặc biệt nghiêm trọng. (Chen et al., *Nat Rev Nephrol.*, 5(6):313-8, 2009). Dấu hiệu bệnh lý riêng biệt của các bệnh nhân này là sự kết lắng MBL và C4d trong các tổn thương thận (Xing et al., *J Clin Immunol.* 30(1):144-56, 2010). Cường độ nhuộm MBL và C4d trong sinh thiết thận tương quan âm với chức năng thận (Xing et al., 2010, nêu trên). Các kết quả này đề xuất vai trò quan trọng đối với quá trình hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin trong quá trình sinh bệnh. Trên thực tế, C4d, mà không phải yếu tố B thường được tìm thấy trong mẫu mô có bệnh chỉ ra sự liên quan của LEA-2.

Dựa trên vai trò của việc hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào lectin trong NCGN âm tính với ANCA được mô tả trên đây, mong đợi rằng việc ngăn chặn sự hoạt hóa của con đường LEA-2 sẽ có tính hữu ích trong điều trị NCGN âm tính với ANCA.

Dữ liệu được nêu chi tiết trên ở đây xuất rằng LEA-1 và LEA-2 điều tiết sự hoạt hóa bổ thể bệnh lý trong NCGN dương tính với ANCA và âm tính với ANCA, một cách tương ứng. Vì thế, chất phong bế LEA-1 được kết hợp với chất phong bế LEA-2 được mong đợi là có tính hữu ích trong điều trị tất cả các dạng NCGN nghèo miễn dịch, bất kể căn bệnh cơ bản. Vì thế, chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2 có thể có tác dụng bổ sung, cộng hợp hoặc hiệp đồng trong ngăn ngừa, điều trị hoặc đẩy lùi rối loạn chức năng thận liên quan đến NCGN.

Chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng hơn của các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng cần điều trị.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết

hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và/hoặc chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa MASP-2 và/hoặc chất ức chế MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch (NCGN).

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch (NCGN) bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch (NCGN), như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của

nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

J. Vai trò của MASP-3 trong chấn thương sọ não, và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Chấn thương sọ não (TBI) là vấn đề sức khỏe chính trên toàn cầu dẫn đến ít nhất 10 triệu ca tử vong hoặc nhập viện mỗi năm (Langlois, J.A. et al., *J. Head Trauma Rehabil.* 21:375-378, 2006). Vào năm 2003, ước tính ở Hoa Kỳ có 1,6 triệu TBI, bao gồm 1,2 triệu ca phải vào phòng cấp cứu, 290000 ca nhập viện, và 51000 ca tử vong (Rutland-Brown, W. et al., *J. Head Trauma Rehabil.* 21:544-548, 2006). Phần lớn TBI ở Hoa Kỳ là do ngã và di chuyển bằng phương tiện mô tô gây ra. TBI có thể dẫn đến hậu quả lâu dài hoặc cả đời về mặt thể chất, nhận thức, hành vi và cảm xúc. Trên 5 triệu người Mỹ sống với hậu quả tàn tật lâu dài hoặc suốt đời liên quan đến TBI (Langlois et al., 2006, nêu trên).

TBI có thể bao gồm sự xâm nhập của chất não (tổn thương "xâm nhập") hoặc tổn thương không xâm nhập vào não (tổn thương "kín"). Profin tổn thương và di chứng hành vi thần kinh có liên quan có thể khá khác nhau giữa TBI xâm nhập và kín. Mặc dù mỗi tổn thương đều là duy nhất, một số vùng não nhất định đặc biệt dễ bị tấn công bởi sự phá hủy do chấn thương, bao gồm thùy trán và chất trắng dưới thùy trán, hạch nền và não trung gian, thân não mỏm, và thùy thái dương bao gồm hồi hải mã (McAllister, T.W. *Dialogues Clin. Neurosci.* 13:287-300, 2011). TBI có thể dẫn đến các thay đổi ở một vài hệ chất dẫn truyền thần kinh, bao gồm sự giải phóng glutamat và các axit amin kích thích khác trong pha cấp tính và các thay đổi mạn tính trong hệ catecholamin và cholin, có thể liên quan đến tàn tật hành vi thần kinh (McAllister, 2011, nêu trên). Người còn sống sau TBI lớn thường mắc các thiếu hụt nhận thức, thay đổi nhân cách, và gia tăng rối loạn tâm thần, đặc biệt là trầm cảm, lo âu, và rối loạn căng thẳng sau chấn thương. Mặc dù đã nghiên cứu chuyên sâu,

không có phương pháp điều trị có hiệu quả lâm sàng nào cho TBI mà có thể làm giảm tỷ lệ tử vong và trạng thái bệnh và cải thiện kết quả chức năng vẫn chưa được tìm ra.

Yếu tố bổ thể và TBI

Nhiều nghiên cứu đã nhận biết được mối liên hệ giữa protein bổ thể và rối loạn thần kinh, bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh đa xơ cứng, bệnh nhược cơ, hội chứng Guillain-Barré, bệnh luput não, và đột quỵ (xem trong tài liệu Wagner, E., et al., *Nature Rev Drug Disc*. 9: 43-56, 2010). Gần đây, vai trò đối với C1q và C3 trong loại bỏ xi náp đã được chứng minh, vì thế các yếu tố bổ thể có thể liên quan đến cả chức năng CNS bình thường và bệnh thoái hóa thần kinh (Stevens, B. et al., *Cell* 131: 1164–1178, 2007). Gen cho MASP-1 và MASP-3 được biểu hiện rộng trong não và trong cả dòng tế bào u thần kinh đệm, T98G (Kuraya, M. et al., *Int Immunol*., 15:109-17, 2003), nhất quán với vai trò của con đường lectin trong CNS.

MASP-1 và MASP-3 là chìa khóa để ngay lập tức tạo hàng rào chống lại các mầm bệnh và các tự tế bào đã thay đổi, nhưng con đường lectin cũng chịu trách nhiệm về sự phá hủy mô nghiêm trọng sau đột quỵ, đau tim, và các tổn thương do tái tưới máu thiếu máu cục bộ khác. Tương tự, MASP-1 và MASP-3 có thể là chất điều tiết trong quá trình phá hủy mô do TBI gây ra. Việc ức chế yếu tố B trong con đường nhánh đã cho thấy là làm thuyên giảm TBI ở hai mô hình chuột nhắt. Chuột nhắt bất hoạt yếu tố B được bảo vệ để không bị chứng viêm thần kinh qua trung gian bổ thể và bệnh lý thần kinh sau TBI (Leinhase I, et al., *BMC Neurosci*. 7:55, 2006). Ngoài ra, kháng thể kháng yếu tố B làm giảm tình trạng phá hủy mô não và chết tế bào thần kinh ở chuột nhắt được cảm ứng TBI (Leinhase I, et al., *J Neuroinflammation* 4:13, 2007). MASP-3 hoạt hóa trực tiếp yếu tố B (Iwaki, D. et al., *J Immunol.* 187:3751-8, 2011) và do đó cũng có thể là chất điều tiết trong TBI. Tương tự với sự ức chế của yếu tố B, chất ức chế LEA-1, như kháng thể kháng MASP-3 được mong đợi là mang lại chiến lược hứa hẹn để điều trị tình trạng phá hủy mô và di chứng sau đó trong TBI.

Vì thế, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 có thể có lợi ích trị liệu độc lập trong TBI. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng hơn của các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết có thể liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của chấn thương sọ não, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc chấn thương sọ não. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, trong sọ, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của chấn thương sọ não, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 cho đối tượng mắc chấn thương sọ não. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và LEA-2 để điều trị, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của chấn thương sọ não, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2

và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc chấn thương sọ não.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của chấn thương sọ não khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Đối tượng này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da, trong sọ, hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và/hoặc chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và/hoặc MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của chấn thương sọ não. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như chấn thương sọ não.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển chấn thương sọ não bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển chấn thương sọ não, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

K. Vai trò của MASP-3 trong bệnh viêm phổi sặc, và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Hiện tượng sặc được xác định là sự hít các thành phần trong miệng-hầu hoặc dạ dày vào đường thở dưới. Hiện tượng sặc này có thể dẫn đến các biến chứng của bệnh viêm thành phế nang sặc (hóa học), bệnh viêm phổi sặc nguyên phát do vi khuẩn, hoặc bệnh nhiễm vi khuẩn thứ phát của viêm thành phế nang hóa học. Các

yếu tố nguy cơ của hiện tượng sặc bao gồm giảm độ ý thức (ví dụ, chấn thương đầu, các thay đổi do rượu hoặc thuốc trong chất xám vỏ não, đột quỵ), các bất thường khác nhau ở dạ dày-ruột và thực quản, và bệnh thần kinh cơ. Ước tính được rằng 5-15% trong số 4,5 triệu ca mắc bệnh viêm phổi mắc phải trong cộng đồng là do viêm phổi sặc (Marik, P.E. *New Engl. J. Med.* 344:665-671, 2001). Việc điều trị bệnh viêm thành phế nang hóa học chủ yếu là hỗ trợ và việc sử dụng các kháng sinh thực nghiệm vẫn đang gây tranh cãi. Việc điều trị bệnh viêm phổi sặc do vi khuẩn là bằng các kháng sinh thích hợp, mà dựa trên việc liệu rằng hiện tượng sặc diễn ra trong cộng đồng hay ở bệnh viện do các sinh vật nguyên nhân có thể khác nhau giữa các thiết lập. Các phương pháp nên được thực hiện để ngăn chặn hiện tượng sặc ở các bệnh nhân có nguy cơ cao, ví dụ, các bệnh nhân lớn tuổi trong viện dưỡng lão có các phản xạ họng suy yếu. Các phương pháp mà đã cho thấy là phòng ngừa hữu hiệu bao gồm nâng đầu giường trong khi ăn, phòng ngừa bệnh nha khoa, và vệ sinh miệng tốt. Các kháng sinh phòng ngừa bệnh chưa cho thấy là có hiệu quả và bị ngăn cản do chúng có thể dẫn đến sự xuất hiện các sinh vật có tính kháng.

Việc điều biến các thành phần bổ thể đã được đề xuất cho nhiều chỉ định lâm sàng, bao gồm bệnh lây nhiễm---nhiễm trùng huyết, nhiễm virut, nhiễm vi khuẩn, và nhiễm nấm---và tình trạng bệnh lý trong phổi---hội chứng suy giảm hô hấp, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, và bệnh xơ nang (xem trong tài liệu Wagner, E., et al., *Nature Rev Drug Disc.* 9: 43-56, 2010). Nhiều nghiên cứu lâm sàng và di truyền đem lại sự củng cố cho đề xuất này. Ví dụ, các bệnh nhân có mức độ MBL thấp có tần suất mắc bệnh lao lâm sàng giảm đáng kể (Soborg et al., *Journal of Infectious Diseases* 188:777–82, 2003), đề xuất rằng mức độ MBL thấp liên quan đến sự bảo vệ khỏi bệnh.

Trong mô hình chuột có tổn thương sặc axit, Weiser MR et al., *J. Appl. Physiol.* 83(4): 1090–1095, 1997, cho thấy rằng chuột nhắt bất hoạt C3 được bảo vệ khỏi tổn thương nghiêm trọng; trong khi đó chuột nhắt bất hoạt C4 không được bảo vệ, chỉ ra rằng sự hoạt hóa bổ thể được điều tiết bởi con đường nhánh. Do đó, việc

phong bế con đường nhánh bằng chất ức chế LEA-1 được mong đợi là mang lại lợi ích trị liệu cho bệnh viêm phổi sặc.

Vì thế, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 có thể có lợi ích trị liệu độc lập trong bệnh viêm phổi sặc. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị bệnh viêm phổi sặc bằng cách sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc tình trạng bệnh lý như vậy hoặc bệnh viêm phổi qua trung gian bổ thể khác. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng khu trú vào phổi, như bằng dụng cụ xông hít. Theo một cách khác, chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm phổi sặc, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối

tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm phổi sặc. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm phổi sặc, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm phổi sặc. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và LEA-2 để điều trị, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm phổi sặc, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc viêm phổi sặc. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2, được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm phổi sặc khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng

nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da, hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và/hoặc chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và/hoặc MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm phổi sặc ở đối tượng cần điều trị. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong Ví dụ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như viêm phổi sặc.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh viêm phổi sặc bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự

hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh viêm phổi sặc, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

L. Vai trò của MASP-3 trong bệnh viêm nội nhãn, và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Viêm nội nhãn là tình trạng viêm của các hốc trong mắt và thường do lây nhiễm gây ra. Viêm nội nhãn có thể là nội sinh, bắt nguồn từ sự lan truyền theo đường máu của các sinh vật từ nguồn lây nhiễm ở xa (ví dụ, viêm màng trong tim), hoặc ngoại sinh, từ việc tiêm nhiễm trực tiếp sinh vật từ bên ngoài dưới dạng biến chứng của phẫu thuật mắt, các thể ngoại lai, và/hoặc chấn thương mắt trực tiếp hoặc xâm nhập. Viêm nội nhãn ngoại sinh phổ biến hơn nhiều so với viêm nội nhãn nội sinh và hầu hết các trường hợp viêm nội nhãn ngoại sinh xảy ra sau phẫu thuật mắt. Ở Hoa Kỳ, phẫu thuật đục thủy tinh thể là nguyên nhân hàng đầu của bệnh viêm nội nhãn và xảy ra với 0,1-0,3% của quy trình này, có sự gia tăng rõ rệt ở tỷ lệ mắc trong thập kỷ vừa qua (Taban, M. et al., *Arch. Ophthalmol.* 123:613-620, 2005). Bệnh viêm nội nhãn sau phẫu thuật có thể xuất hiện theo kiểu cấp tính, trong vòng 2 tuần phẫu thuật, hoặc theo kiểu trì hoãn, hằng tháng sau phẫu thuật. Bệnh viêm nội nhãn cấp thường xuất hiện với cơn đau, mắt đỏ, sưng tấy mi mắt, và giảm độ tinh của mắt. Viêm nội nhãn chậm khởi phát ít phổ biến hơn so với dạng cấp tính và các bệnh nhân có thể chỉ báo cáo cơn đau và độ nhạy quang nhẹ. Việc điều trị bệnh viêm nội nhãn phụ thuộc vào nguyên nhân cơ bản và có thể bao gồm các kháng sinh dùng toàn thân và/hoặc trong thủy tinh thể. Viêm nội nhãn có thể dẫn đến tình trạng giảm hoặc mất thị lực.

Như được mô tả ở trước đối với AMD, nhiều gen của con đường bổ thể có liên quan đến các rối loạn nhãn khoa, và các gen này cụ thể bao gồm các gen của con

đường lectin. Ví dụ, MBL2 đã được nhận biết với các kiểu phụ AMD (Dinu V, et al., *Genet Epidemiol* 31: 224–37, 2007). Con đường LEA-1 và con đường LEA-2 có thể có liên quan đến tình trạng viêm mắt như viêm nội nhãn (Chow SP et al., *Clin Experiment Ophthalmol.* 39:871-7, 2011). Chow et al. kiểm tra mức độ MBL ở các bệnh nhân có bệnh viêm nội nhãn và cho thấy rằng cả mức độ MBL và hoạt tính chức năng của con đường lectin đều gia tăng một cách đáng kể trong mắt người bị viêm nhưng gần như không phát hiện được trong mắt đối chứng không bị viêm. Điều này gợi ý vai trò đối với MBL và con đường lectin trong tình trạng viêm mắt đe dọa thị lực, đặc biệt là bệnh viêm nội nhãn. Ngoài ra, trong mô hình chuột viêm giác mạc do nấm loạn thị giác, gen MBL-A là một trong năm gen của con đường viêm được điều hòa tăng (Wang Y., et al., *Mol Vis* 13: 1226–33, 2007).

Vì thế, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có lợi ích trị liệu độc lập trong điều trị bệnh viêm nội nhãn. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng hơn của các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm nội nhãn, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm nội nhãn. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng khu trú cho mắt, như bằng cách rửa hoặc sử dụng chế phẩm dưới dạng gel dùng cục bộ, thuốc mỡ hoặc thuốc

nhỏ, hoặc bằng cách dùng trong thủy tinh thể. Theo một cách khác, chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm nội nhãn, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển viêm nội nhãn. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và LEA-2 để điều trị, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm nội nhãn, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc viêm nội nhãn.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm nội nhãn, khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể

này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng khu trú cho mắt, như bằng cách rửa hoặc sử dụng chế phẩm dưới dạng gel dùng cục bộ, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ, hoặc bằng cách tiêm trong thủy tinh thể. Theo một cách khác, chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và/hoặc chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và/hoặc MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của viêm nội nhãn ở đối tượng cần điều trị. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như viêm nội nhãn.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh viêm nội nhãn bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh viêm nội nhãn, như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

M. Vai trò của MASP-3 trong bệnh viêm tủy-thị thần kinh, và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Viêm tủy-thị thần kinh (NMO) là bệnh tự miễn hướng đích các dây thần kinh thị giác và tủy sống. Điều này dẫn đến chứng viêm dây thần kinh thị giác, được biết đến là viêm thần kinh thị giác, và tủy sống, được biết đến là viêm tủy sống. Tổn thương tủy sống trong NMO có thể dẫn đến hiện tượng yếu hoặc liệt chân hoặc tay, mù, rối loạn chức năng bàng quang và ruột, và loạn chức năng giác quan.

NMO có chung một vài đặc điểm tương tự với bệnh đa xơ cứng (MS), do cả hai bệnh đều do sự tấn công miễn dịch của đích CNS và cả hai bệnh đều dẫn đến hiện tượng mất myelin (Papadopoulos and Verkman, *Lancet Neurol.*, 11(6):535-44, 2013). Tuy nhiên, các đích phân tử, việc điều trị, và tổn thương đối với NMO là khác biệt so với các đích phân tử, việc điều trị và tổn thương của MS. Trong khi MS được điều tiết ở mức độ lớn bởi tế bào T, các bệnh nhân NMO thường có các kháng thể hướng đích protein kênh nước aquaporin 4 (AQP4), protein này được tìm thấy trong các tế bào hình sao bao quanh hàng rào máu não. Interferon beta là liệu pháp phổ biến nhất được sử dụng đối với MS, nhưng thường được thừa nhận là có hại trong NMO. Các tổn thương viêm của NMO được tìm thấy trong tủy sống và dây thần kinh thị giác và có thể tiến vào não, bao gồm chất trắng và chất xám. Hiện tượng mất

myelin xuất hiện trong tổn thương NMO được điều tiết bởi bổ thể (Papadopoulos and Verkman, *Lancet Neurol.*, 11(6):535-44, 2013).

Tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể có vẻ là cơ chế chính gây ra sự phát triển NMO. Trên 90% số bệnh nhân NMO có kháng thể IgG kháng AQP4 (Jarius and Wildemann, Jarius S, Wildemann B., *Nat Rev Neurol.* 2010 Jul;6(7):383-92). Các kháng thể này khởi phát sự hình thành tổn thương tại hàng rào máu não. Phức hợp kháng nguyên-kháng thể ban đầu---AQP4/AQP4-IgG---trên bề mặt của các tế bào hình sao hoạt hóa con đường cổ điển của bổ thể. Điều này dẫn đến sự hình thành của phức hợp tấn công màng trên bề mặt tế bào hình sao, dẫn đến hiện tượng thẩm thấu bạch cầu hạt, hiện tượng mất myelin, và cuối cùng là hiện tượng hoại tử các tế bào hình sao, tế bào thần kinh đệm ít gai và tế bào thần kinh (Misu et al., *Acta Neuropathol* 125(6):815-27, 2013). Các sự kiện tế bào này được phản ánh trong quá trình phá hủy mô và hình thành của các tổn thương nang, hoại tử.

Con đường cổ điển của bổ thể rõ ràng là quan trọng đối với quá trình sinh bệnh NMO. Tổn thương NMO biểu hiện sự kết lắng trong mạch trung tâm của globulin miễn dịch và các thành phần bổ thể đã hoạt hóa (Jarius et al., *Nat Clin Pract Neurol.* 4(4):202-14, 2008). Ngoài ra, protein bổ thể như C5a được phân lập khỏi dịch não tủy của các bệnh nhân NMO (Kuroda et al., *J Neuroimmunol.*,254(1-2):178-82, 2013). Ngoài ra, IgG huyết thanh thu được từ các bệnh nhân NMO có thể gây tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể ở mô hình chuột nhắt NMO (Saadoun et al., *Brain*, 133(Pt 2):349-61, 2010). Kháng thể đơn dòng kháng C1q ngăn chặn sự phá hủy các tế bào hình sao qua trung gian bổ thể và các tổn thương trong mô hình chuột nhắt NMO (Phuan et al., *Acta Neuropathol*, 125(6):829-40, 2013).

Con đường nhánh của bổ thể nhằm khuếch đại hoạt tính bổ thể tổng thể. Harboe và các đồng nghiệp (2004) chỉ ra rằng sự phong bế có chọn lọc con đường nhánh làm ức chế hơn 80% sự hình thành phức hợp tấn công màng được cảm ứng bởi con đường cổ điển (Harboe et al., *Clin Exp Immunol* 138(3):439-46, 2004). Tüzün và các đồng nghiệp (2013) kiểm tra cả sản phẩm của con đường cổ điển và con đường nhánh ở các bệnh nhân NMO (Tüzün E, et al., *J Neuroimmunol.* 233(1-

2): 211-5, 2011). C4d, sản phẩm bị phá hủy của C4, được đo để đánh giá hoạt tính con đường cổ điển và được làm tăng trong huyết thanh bệnh nhân NMO so với đối chứng (tăng 2,14 lần). Ngoài ra, sự gia tăng của yếu tố Bb, sản phẩm bị phá hủy của yếu tố B con đường nhánh, được quan sát thấy ở các bệnh nhân NMO so với các bệnh nhân MS hoặc các cá thể đối chứng bình thường (tăng 1,33 lần). Điều này đề xuất rằng chức năng con đường nhánh cũng được tăng lên ở NMO. Sự hoạt hóa này được mong đợi là làm tăng sự hoạt hóa bổ thể tổng thể, và trên thực tế thì sC5b-9, sản phẩm cuối cùng của đợt bổ thể, được làm tăng đáng kể (tăng 4,14 lần).

Các chất ức chế đặc hiệu của MASP-3 được mong đợi là mang lại lợi ích trong điều trị cho các bệnh nhân mắc NMO. Như được thể hiện ở đây, huyết thanh thiếu MASP-3 không thể hoạt hóa yếu tố B, một thành phần thiết yếu của C5 convertaza, hoặc yếu tố D, chất hoạt hóa chính của con đường nhánh. Do đó, sự phong bế hoạt tính MASP-3 bằng chất ức chế như kháng thể hoặc phân tử nhỏ cũng được mong đợi là ức chế sự hoạt hóa của yếu tố B và yếu tố D. Việc ức chế hai yếu tố này sẽ làm ngừng sự khuếch đại con đường nhánh, dẫn đến việc làm giảm hoạt tính bổ thể tổng thể. Vì thế, việc ức chế MASP-3 nên cải thiện một cách đáng kể các kết quả trị liệu trong NMO.

Vì thế, chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có lợi ích trị liệu độc lập trong điều trị NMO. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng hơn các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm

giảm độ nghiêm trọng của NMO, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển NMO. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng khu trú cho mắt, như bằng cách rửa hoặc sử dụng chế phẩm dưới dạng gel dùng cục bộ, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ, hoặc bằng cách dùng trong thủy tinh thể. Theo một cách khác, chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của NMO, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh NMO. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và LEA-2 để điều trị, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của NMO, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc NMO.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của NMO, khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong

bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng khu trú cho mắt, như bằng cách rửa hoặc sử dụng chế phẩm dưới dạng gel dùng cục bộ, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ, hoặc bằng cách tiêm trong thủy tinh thể. Theo một cách khác, chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và/hoặc chế phẩm ức chế MASP 2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và/hoặc MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của NMO ở đối tượng cần điều trị. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như viêm tủy-thị thần kinh (NMO).

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh viêm tủy-thị thần kinh (NMO) bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh viêm tủy-thị thần kinh (NMO), như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

N. Vai trò của MASP-3 trong bệnh behcet, và phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2

Bệnh Behçet, hoặc hội chứng Behçet, là bệnh viêm mạch toàn thân mạch nhỏ qua trung gian miễn dịch dạng hiếm thường xuất hiện kèm chứng loét màng niêm mạc và các vấn đề về mắt. Bệnh Behçet (BD) được đặt tên vào năm 1937 sau khi bác sĩ chuyên khoa da liễu người Thổ Nhĩ Kỳ Hulusi Behçet là người đầu tiên mô tả phức hợp ba triệu chứng của chứng loét miệng tái phát, loét vùng sinh dục, và viêm màng bồ đào. BD là rối loạn viêm toàn thân và tái phát chưa biết nguyên nhân. Chứng viêm quanh mạch của BD có thể liên quan đến dải dạ dày-ruột, phổi, cơ xương, tim mạch, và hệ thần kinh. BD có thể gây tử vong do phình động mạch đứt gãy hoặc các biến chứng thần kinh nghiêm trọng. Bệnh lý thần kinh mắt và bệnh teo mắt có thể là do viêm mạch và tắc các mạch cung cấp dây thần kinh thị giác. Xem tài liệu Al-Araji A, et al., *Lancet Neurol.*, 8(2):192-204, 2009.

Tỷ lệ mắc BD cao nhất là ở vùng Trung Đông và Viễn Đông, nhưng lại hiếm gặp ở Châu Âu và Bắc Mỹ. BD thường được kiểm soát ngay từ đầu bằng corticosteroit và chất ức chế miễn dịch, nhưng có nhiều trường hợp khó chữa với tỷ lệ mắc và tỷ lệ chết nghiêm trọng. Sinh chất, bao gồm interferon-alpha, IVIG, kháng TNF, kháng IL-6, và kháng CD20, đã cho thấy lợi ích trong một số trường hợp, nhưng không có sự thống nhất về phương pháp tốt nhất.

Dù BD rõ ràng là một rối loạn viêm, nhưng bệnh lý học của nó vẫn không rõ ràng. Có sự kết hợp di truyền với kháng nguyên HLA, và các nghiên cứu liên quan ở mức độ rộng với bộ gen đã chỉ ra nhiều gen xytokin (Kirino et al., *Nat Genet*, 45(2):202-7, 2013). Siêu hoạt tính của hệ miễn dịch có vẻ là được điều tiết bởi hệ thống bổ thể. Nồng độ C3 gia tăng đã được quan sát thấy trong huyết thanh bệnh nhân BD (Bardak and Aridoğan, *Ocul Immunol Inflamm* 12(1):53-8, 2004), và C3 và C4 gia tăng trong dịch não tủy tương quan với bệnh (Jongen et al., *Arch Neurol*, 49(10):1075-8, 1992).

Tüzün và các đồng nghiệp (2013) kiểm tra cả sản phẩm của con đường cổ điển và con đường nhánh trong huyết thanh của các bệnh nhân BD (Tüzün E, et al., *J Neuroimmunol*, 233(1-2):211-5, 2011). 4d, sản phẩm bị phá hủy của C4, được tạo ra ngược dòng với con đường nhánh và được đo để đánh giá hoạt tính con đường cổ điển ban đầu. C4d được làm tăng trong huyết thanh bệnh nhân BD so với đối chứng (tăng 2,18 lần). Yếu tố Bb là sản phẩm bị phá hủy của yếu tố B, và được đo để xác định hoạt tính của con đường nhánh. Các bệnh nhân BD có sự gia tăng yếu tố Bb so với các cá thể đối chứng bình thường (tăng 2,19 lần) nhất quán với sự gia tăng chức năng con đường nhánh BD. Do con đường nhánh của bổ thể nhằm khuếch đại hoạt tính bổ thể tổng thể, sự hoạt hóa này được mong đợi là làm tăng sự hoạt hóa bổ thể tổng thể. Harboe và các đồng nghiệp (2004) chỉ ra rằng sự phong bế có chọn lọc của con đường nhánh làm ức chế hơn 80% sự hình thành phức hợp tấn công màng được cảm ứng bởi con đường cổ điển (Harboe M, et al., *Clin Exp Immunol*, 138(3):439-46, 2004). Trên thực tế, sC5b-9, sản phẩm cuối cùng của đợt bổ thể, được làm tăng đáng kể ở các bệnh nhân BD (tăng 5,46 lần). Các chất ức chế đặc hiệu của MASP-3

nên mang lại lợi ích đối với BD. Sự phong bế MASP-3 nên ức chế sự hoạt hóa của yếu tố B và yếu tố D. Điều này sẽ làm ngừng sự khuếch đại con đường nhánh, dẫn đến việc làm giảm đáp ứng của hoạt tính bổ thể tổng thể. Vì thế, sự ức chế MASP-3 nên cải thiện một cách đáng kể các kết quả trị liệu trong BD. Vì thế, chất ức chế LEA-1 và/hoặc chất ức chế LEA-2 được mong đợi là có lợi ích trị liệu độc lập trong điều trị BD. Ngoài ra, chất ức chế LEA-1 và chất ức chế LEA-2 được sử dụng cùng nhau có thể đạt được lợi ích điều trị cộng hợp so với một mình một trong hai chất này, hoặc có thể mang lại sự điều trị hiệu quả cho một phổ rộng hơn các nhóm con bệnh nhân. Việc ức chế LEA-1 và LEA-2 kết hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng đồng thời chất phong bế LEA-1 và chất phong bế LEA-2. Tốt nhất là, chức năng ức chế LEA-1 và LEA-2 có thể được bao gồm trong một thực thể phân tử duy nhất, như kháng thể hai đặc hiệu gồm có điểm liên kết đặc hiệu MASP-1/3 và MASP-2, hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà mỗi điểm liên kết liên kết với và phong bế MASP-1/3 hoặc MASP-2.

Vì thế, theo như trên đây, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của BD, bao gồm bước sử dụng chế phẩm chứa lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế LEA-1 bao gồm chất ức chế MASP-1, chất ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của chất ức chế MASP-1/3, trong chất mang dược cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển BD. Chế phẩm ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng khu trú cho mắt, như bằng cách rửa hoặc sử dụng chế phẩm dưới dạng gel dùng cục bộ, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ, hoặc bằng cách dùng trong thủy tinh thể. Theo một cách khác, chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2 để điều trị, ngăn ngừa, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của BD, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển BD. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và LEA-2 để điều trị, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của BD, bao gồm bước sử dụng lượng có tác dụng trị liệu của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-1, MASP-3, hoặc MASP-1/3 cho đối tượng mắc BD.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc ức chế cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-1 và sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào LEA-2. Như được nêu chi tiết ở trên, việc sử dụng hỗn hợp của các dược chất mà phong bế một cách riêng rẽ LEA-1 và LEA-2 được mong đợi là mang lại kết quả trị liệu cải thiện trong điều trị hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của BD, khi so với việc ức chế của một mình LEA-1. Kết quả này có thể đạt được bằng cách, ví dụ, sử dụng đồng thời kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-1 cùng với kháng thể có hoạt tính phong bế LEA-2. Theo một số phương án, hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 được kết hợp thành một thực thể phân tử duy nhất, và thực thể này có hoạt tính phong bế LEA-1 và LEA-2 kết hợp. Thực thể này có thể chứa hoặc gồm có kháng thể hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-1 và phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Theo một cách khác, thực thể này có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 và điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2. Thực thể này tốt nhất là có thể gồm có kháng thể đơn dòng hai đặc hiệu trong đó một điểm kết hợp kháng nguyên nhận diện một cách đặc hiệu cả MASP-1 và MASP-3 và vì thế phong bế LEA-1 trong khi điểm kết hợp kháng nguyên thứ hai nhận diện một cách đặc hiệu MASP-2 và phong bế LEA-2.

Chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng khu trú cho mắt, như bằng cách rửa hoặc sử dụng chế phẩm dưới dạng gel dùng cục bộ, thuốc mỡ hoặc thuốc nhỏ, hoặc bằng cách tiêm trong thủy tinh thể. Theo một cách khác, chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng ở phạm vi toàn thân, như bằng cách dùng trong động mạch, trong tĩnh mạch, trong cơ, xông hít, mũi, dưới da hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa khác, hoặc có thể là bằng cách dùng qua đường miệng đối với các chất không tiết hormon peptit. Việc sử dụng có thể được lặp lại như được xác định bởi bác sĩ cho đến khi tình trạng bệnh lý được giải quyết hoặc được kiểm soát.

Việc sử dụng chế phẩm ức chế MASP-3 và/hoặc chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-2 và/hoặc MASP-3, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của BD ở đối tượng cần điều trị. Theo một cách khác, chế phẩm có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài để điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao đã được tạo ra mà có tính hữu ích trị liệu để ức chế con đường nhánh ở bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến AP, như Bệnh Behçet (BD).

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển Bệnh Behçet (BD) bao gồm lượng có tác dụng của kháng thể đơn dòng có ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ trong bản mô tả này là liên kết với MASP-3 của người và ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh để điều trị hoặc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh Behçet (BD), như, ví dụ, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 hoặc SEQ ID NO:275 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID

NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259 (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

Chất ức chế MASP-3

Dựa vào việc biết rằng con đường lectin của bổ thể gồm có hai nhánh hoạt hóa bổ thể chính, LEA-1 và LEA-2, và rằng cũng có cả nhánh hoạt hóa bổ thể không phụ thuộc vào lectin, từ đó nhận ra rằng rất mong đợi việc ức chế một cách đặc hiệu một hoặc nhiều nhánh trong số các nhánh tác động này mà gây ra bệnh lý liên quan đến sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh, như ít nhất một bệnh trong số bệnh hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD, bao gồm AMD ướt và khô), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, bệnh viêm khớp, bệnh đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS), ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) hoặc TMA liên quan đến cấy ghép), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng (MS), hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ, mà không dừng hoàn toàn khả năng bảo vệ miễn dịch của bổ thể (tức là, để con đường cổ điển nguyên vẹn). Việc này giữ cho hệ hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào C1q nguyên vẹn để điều khiển việc xử lý phức hợp miễn dịch và hỗ trợ hàng rào của vật chủ chống lại lây nhiễm.

Chế phẩm dùng để ức chế sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian LEA-1

Như được mô tả trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã phát hiện một cách ngoài mong đợi rằng sự hoạt hóa của LEA-1, dẫn đến hiện tượng phân hủy, là phụ thuộc vào MASP-3. Như cũng được mô tả trong bản mô tả này, trong các điều kiện sinh lý, sự hoạt hóa LEA-1 phụ thuộc vào MASP-3 cũng góp phần vào quá trình opsonin hóa, từ đó mang lại tác dụng cộng hợp với sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian LEA-2. Như được thể hiện trong bản mô tả này, khi có mặt Ca^{++}, thì yếu tố D không cần phải có, do MASP-3 có thể điều khiển sự hoạt hóa của LEA-1 trong huyết thanh yếu tố $D^{-/-}$. MASP-3, MASP-1, và HTRA-1 có thể chuyển hóa tiền yếu tố D thành yếu tố D có hoạt tính. Tương tự, sự hoạt hóa MASP-3, trong nhiều trường hợp, có vẻ là phụ thuộc vào MASP-1, do MASP-3 (trái ngược với MASP-1 và MASP-2) không phải là enzym tự hoạt hóa và không có khả năng chuyển hóa thành dạng có hoạt tính của nó khi không có sự trợ giúp của MASP-1 (Zundel, S. et al., *J.Immunol.* 172: 4342-4350 (2004); Megyeri et al., *J. Biol. Chem.* 288:8922–8934 (2013). Do MASP-3 không tự hoạt hóa và, trong nhiều trường hợp, hoạt tính của MASP-1 cần phải được chuyển hóa thành dạng có hoạt tính enzym của nó, nên sự hoạt hóa qua trung gian MASP-3 của C3 convertaza của con đường nhánh C3Bb có thể được ức chế bằng cách hướng đích MASP-3 zymogen hoặc MASP-3 đã được hoạt hóa, hoặc bằng cách hướng đích sự hoạt hóa qua trung gian MASP-1 của MASP-3, hoặc cả hai, do, trong nhiều trường hợp, khi không có hoạt tính chức năng MASP-1, thì MASP-3 vẫn ở dạng zymogen của nó và không có khả năng điều khiển LEA-1 thông qua sự hình thành trực tiếp C3 convertaza của con đường nhánh (C3bBb).

Do đó, theo một khía cạnh của sáng chế, thành phần protein được ưu tiên hướng đích trong quá trình nghiên cứu phát triển chất trị liệu để ức chế một cách đặc hiệu LEA-1 là chất ức chế của MASP-3 (bao gồm chất ức chế sự hoạt hóa MASP-3 qua trung gian MASP-1 (ví dụ, chất ức chế MASP-1 mà ức chế sự hoạt hóa MASP-3)).

Theo như trên đây, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế các tác động bất lợi của LEA-1 (tức là, sự tan máu và sự opsonin hóa) bằng cách sử dụng chất ức chế MASP-3, như kháng thể ức chế MASP-3 ở đối tượng mắc, hoặc

có nguy cơ phát triển, bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, bệnh viêm khớp, bệnh đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) và ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ, bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm chứa chất ức chế MASP-3 với lượng có tác dụng để ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 và chất mang dược dụng.

Chất ức chế MASP-3 được sử dụng ở lượng có tác dụng để ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-3 ở đối tượng sống mắc, hoặc có nguy cơ phát triển, hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép,

bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ. Trong thực tiễn theo khía cạnh này của sáng chế, chất ức chế MASP-3 tiêu biểu bao gồm: các phân tử ức chế hoạt tính sinh học của MASP-3, bao gồm các phân tử ức chế ít nhất một hoặc nhiều tình trạng sau: sự hoạt hóa MASP-3 phụ thuộc vào lectin của yếu tố B, sự hoạt hóa MASP-3 phụ thuộc vào lectin của tiền yếu tố D, sự hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-3, không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B, và sự hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-3, không phụ thuộc vào lectin của tiền yếu tố D (như chất ức chế phân tử nhỏ, kháng thể MASP-3 và các mảnh của nó, hoặc peptit phong bế tương tác với MASP-3 hoặc can thiệp vào tương tác protein-protein), và các phân tử làm giảm sự biểu hiện của MASP-3 (như phân tử axit nucleic đối nghĩa MASP-3, phân tử RNAi đặc hiệu MASP-3 và MASP-3 ribozym). Chất ức chế MASP-3 có thể phong bế một cách có hiệu quả tương tác protein với protein của MASP-3, can thiệp vào quá trình dime hóa hoặc tổ hợp của MASP-3, ngăn chặn sự liên kết Ca^{++}, can thiệp vào điểm hoạt hóa serin proteaza của MASP-3, hoặc làm giảm sự biểu hiện protein MASP-3, từ đó ngăn chặn MASP-3 để không kích hoạt sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian LEA-1, hoặc sự hoạt hóa bổ thể không phụ thuộc vào lectin. Chất ức chế MASP-3 có thể được sử dụng một mình dưới dạng liệu pháp cơ bản hoặc kết hợp với các chất trị liệu khác dưới dạng liệu pháp hỗ trợ để tăng cường lợi ích trị liệu của các phương pháp điều trị bằng thuốc khác, như cũng được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể đơn dòng ái lực cao ức chế MASP-3

Như được mô tả trong các ví dụ từ 11 đến 21 ở đây, và được tóm tắt trong Bảng 2A, Bảng 2B và Bảng 3 dưới đây, các tác giả sáng chế đã tạo ra một cách đáng ngạc nhiên kháng thể ức chế MASP-3 ái lực cao (tức là ≤500 pM) mà liên kết với epitop trong miền serin proteaza của MASP-3 của người. Như được mô tả trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng các kháng thể MASP-3 có ái lực cao này có khả năng ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh trong huyết thanh của người, loài gặm nhấm và động vật linh trưởng không phải người. Vùng chuỗi

nhẹ và chuỗi nặng biến đổi của các kháng thể này đã được giải trình tự, phân lập và phân tích trong cả mô hình Fab và trong mô hình IgG chiều dài đầy đủ. Như được mô tả trong Ví dụ 15 và được thể hiện trong các thụ đồ được thể hiện trên Fig.50A và Fig.50B, các kháng thể có thể được nhóm theo tính tương đồng trình tự. Tóm tắt về vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể này được thể hiện trên Fig.49A và Fig.49B và được nêu trong Bảng 2A và Bảng 2B dưới đây. Các phiên bản được làm giống như của người của kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 19 và được tóm tắt trong Bảng 3.

Bảng 2A: trình tự kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao:chuột nhắt bố mẹ

Kháng thể MASP-3 số đối chiếu	Nhóm	Vùng biến đổi chuỗi nặng (axit amin)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (axit amin)	Vùng biến đổi chuỗi nặng (ADN)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (ADN)
4D5	IA	SIN:24	SIN:40	SIN:217	SIN:233
1F3	IA	SIN:25	SIN:41	SIN:218	SIN:234
4B6	IA	SIN:26	SIN:42	SIN:219	SIN:235
1A10	IA	SIN:27	SIN:42	SIN:220	SIN:235
10D12	IB	SIN:28	SIN:43	SIN:221	SIN:236
35C1	IB	SIN:29	SIN:44	SIN:222	SIN:237
13B1	IC	SIN:30	SIN:45	SIN:223	SIN:238
1G4	II	SIN:31	SIN:46	SIN:224	SIN:239
1E7	IIIA	SIN:32	SIN:47	SIN:225	SIN:240
2D7	IIIA	SIN:33	SIN:48	SIN:226	SIN:241
49C11	IIIA	SIN:34	SIN:49	SIN:227	SIN:242
15D9	IIIB	SIN:35	SIN:50	SIN:228	SIN:243
2F5	IIIB	SIN:36	SIN:51	SIN:229	SIN:244
1B11	IIIC	SIN:37	SIN:52	SIN:230	SIN:245
2F2	IIID	SIN:38	SIN:53	SIN:231	SIN:246
11B6	IIID	SIN:39	SIN:54	SIN:232	SIN:247

Lưu ý: "SIN" dùng để chỉ "SEQ ID NO:"

Bảng 2B: kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao:CDR

Kháng thể MASP-3 số đối chiếu.	Vùng biến đổi chuỗi nặng (axit amin)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (axit amin)	Chuỗi nặng: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Chuỗi nhẹ: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)
4D5	SIN:24	SIN:40	56;58;60	142;144;146
1F3	SIN:25	SIN:41	62;63;65	149;144;146
4B6	SIN:26	SIN:42	62;67;65	149;144;146
1A10	SIN:27	SIN:42	62;69;65	149;144;146
10D12	SIN:28	SIN:43	72;74;76	153;155;157
35C1	SIN:29	SIN:44	79;74;82	159;155;160
13B1	SIN:30	SIN:45	84;86;88	142;144;161
1G4	SIN:31	SIN:46	91;93;95	163;165;167
1E7	SIN:32	SIN:47	109;110;112	182;184;186
2D7	SIN:33	SIN:48	125;127;129	196;198;200
49C11	SIN:34	SIN:49	132;133;135	203;165;204
15D9	SIN:35	SIN:50	137;138;140	206;207;208
2F5	SIN:36	SIN:51	98;99;101	169;171;173
1B11	SIN:37	SIN:52	103;105;107	176;178;180
2F2	SIN:38	SIN:53	114;116;118	188;178;190
11B6	SIN:39	SIN:54	114;121;123	191;178;193

Bảng 3: kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu: được làm giống như của người và được cải biến để loại bỏ điểm cải biến sau dịch mã

Kháng thể MASP-3 số đối chiếu.	Vùng biến đổi chuỗi nặng aa (SEQ ID NO)	Vùng biến đổi chuỗi nhẹ aa (SEQ ID NO)	Chuỗi nặng: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)	Chuỗi nhẹ: CDR1; CDR2; CDR3 (SEQ ID NO)
4D5 bố mẹ	24	40	56;58;60	142;144;146
h4D5-14-1	248	250	56;58;60	142;144;146
h4D5-19-1	249	250	56;58;60	142;144;146
h4D5-14-1-NA	248	278	56;58;60	258;144;146
h4D5-19-1-NA	249	278	56;58;60	258;144;146
10D12 bố mẹ	28	43	72;74;76	153;155;157

h10D12-45-21	251	253	72;74;76	153;155;157
h10D12-49-21	252	253	72;74;76	153;155;157
h10D12-45-21-GA	251	279	72;74;76	263;155;157
h10D12-49-21-GA	252	279	72;74;76	263;155;157
13B1 bố mẹ	30	45	84;86;88	142;144;161
h13B1-9-1	254	256	84;275;88	142;144;161
h13B1-10-1	255	256	84;86;88	142;144;161
h13B1-9-1-NA	254	280	84;275;88	258;144;161
h13B1-10-1-NA	255	280	84;86;88	258;144;161

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với miền serin proteaza của MASP-3 của người (các gốc axit amin từ 450 đến 728 của SEQ ID NO:2) với ái lực cao (có K_D thấp hơn 500 pM), trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh. Theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó ức chế con đường nhánh ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 hướng đích MASP-3 đến mAb ở đối tượng là động vật có vú.

Việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh được đặc trưng bởi ít nhất một hoặc nhiều thay đổi trong số các thay đổi sau trong thành phần của hệ thống bổ thể xuất hiện do sử dụng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao theo các phương án khác nhau của sáng chế: ức chế sự tan máu và/hoặc sự opsonin hóa; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố D, ức chế sự phân cắt đặc hiệu cơ chất MASP-3 serin proteaza; giảm sự tan máu hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b; giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa; giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D; giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng

với bề mặt hoạt hóa; và/hoặc tạo ra mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng.

Ví dụ, như được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao, là các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có khả năng ức chế sự thuần thục yếu tố D (tức là, sự phân cắt của tiền yếu tố D thành yếu tố D) ở đối tượng là động vật có vú. Theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao có khả năng ức chế sự thuần thục yếu tố D trong huyết thanh đầy đủ đến nồng độ thấp hơn 50% so với nồng độ được phát hiện ra trong huyết thanh đối chứng không được điều trị (như thấp hơn 40%, ví dụ thấp hơn 30%, như thấp hơn 25%, ví dụ thấp hơn 20%, như thấp hơn 15%, ví dụ thấp hơn 10%, như thấp hơn 5% huyết thanh đối chứng không được điều trị không tiếp xúc với kháng thể ức chế MASP-3).

Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao ức chế có chọn lọc con đường nhánh, để hệ hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào C1q trơ về mặt chức năng.

Theo một khía cạnh khác, bản mô tả này mô tả phân tử axit nucleic mã hóa một hoặc cả hai polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể ức chế MASP-3 bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này. Cũng được mô tả là vectơ (ví dụ, vectơ tách dòng hoặc vectơ biểu hiện) bao gồm axit nucleic và tế bào (ví dụ, tế bào côn trùng, tế bào vi khuẩn, tế bào nấm, hoặc tế bào động vật có vú) chứa vectơ này. Bản mô tả cũng đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể ức chế MASP-3 bất kỳ hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này. Phương pháp này bao gồm bước tạo ra tế bào chứa vectơ biểu hiện chứa axit nucleic mã hóa một hoặc cả hai polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này. Tế bào hoặc giống cấy tế bào được nuôi cấy trong các điều kiện và trong thời gian đủ để cho phép tế bào (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào) biểu hiện kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mã hóa bởi axit nucleic. Phương pháp này cũng có thể bao gồm bước phân lập kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó khỏi

tế bào (hoặc giống cấy tế bào) hoặc khỏi môi trường trong đó tế bào hoặc các tế bào được nuôi cấy.

Epitop và peptit của MASP-3

Như được mô tả trong Ví dụ 18, được minh họa trên Fig.62 và được tóm tắt trong bảng 4 dưới đây, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được phát hiện ra là nhận diện một cách đặc hiệu một hoặc nhiều epitop trong miền serin proteaza của MASP-3 của người (các gốc axit amin từ 450 đến 728 có SEQ ID NO:2). "Nhận diện một cách đặc hiệu" có nghĩa là kháng thể liên kết với epitop này với ái lực cao hơn đáng kể so với ái lực đối với phân tử khác bất kỳ hoặc một phần của nó.

Bảng 4: Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu: vùng liên kết epitop của MASP-3 (cũng xem trên Fig.62)

Mảnh liên kết peptit (Epitop) tham chiếu đến MASP-3 của người (có/gen dẫn hướng)	MASP-3 mAb số tham chiếu
$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10, 10D12,
$_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:10)	13B1
$_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
$_{626}$PHAECKTSYESRS$_{638}$ (SIN:12)	13B1
$_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
$_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 4B6, 4D5, 1A10
$_{498}$VLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:15) Trình tự lõi của nhóm I	1F3, 4B6, 4D5, 1A10, 10D12, 13B1
$_{435}$ECGQPSRSLPSLV$_{447}$ (SIN:16)	1B11
$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) Trình tự lõi của nhóm II và III	1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5, 1B11
$_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$ (SIN 18)	15D9, 2F5
$_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19)	1E7, 2D7, 1G4
$_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SIN:20)	15D9, 2F5
$_{583}$APHMLGL$_{589}$ (SIN:21)	1B11
$_{614}$SDVLQYVKLP$_{623}$ (SIN:22)	1B11
$_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)	1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5

Do đó, theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-3 với ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong miền serin proteaza của MASP-3 của người, trong đó epitop này nằm trong ít nhất một hoặc nhiều trong số: VLRSQRRDTTVI (SEQ ID NO:9), TAAHVLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO:11), PHAECKTSYESRS (SEQ ID NO:12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO:13), VSNYVDWVWE (SEQ ID NO:14) và/hoặc VLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:15). Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop trong SEQ ID NO:15. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop trong SEQ ID NO:9. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop trong SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop trong SEQ ID NO:12. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop trong SEQ ID NO:10 và SEQ ID NO:12. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop trong ít nhất một trong số SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13 và/hoặc SEQ ID NO:14.

Theo các phương án khác, kháng thể ức chế MASP-3 với ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với epitop nêu trong miền serin proteaza của MASP-3 của người, trong đó epitop này nằm trong ít nhất một hoặc nhiều trong số: ECGQPSRSLPSLV (SEQ ID NO:16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO:17); KWFGSGALLSASWIL(SEQ ID NO:18); EHVTVYLGLH (SEQ ID NO:19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO:20); APHMLGL (SEQ ID NO:21); SDVLQYVKLP (SEQ ID NO:22); và/hoặc AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO:23). Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop nêu trong SEQ ID NO:17. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop nêu trong EHVTVYLGLH (SEQ ID NO:19) và/hoặc AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO:23). Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop nêu trong SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 và/hoặc SEQ ID NO:23. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng

nguyên liên kết với epitop nêu trong ít nhất một trong số SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 21 và/hoặc SEQ ID NO:22.

Vùng CDR

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể hoặc dạng tương đương về mặt chức năng của nó bao gồm các vùng siêu biến cụ thể, được ký hiệu là CDR. Tốt hơn là, các CDR này là CDR theo định nghĩa CDR của Kabat. CDR hoặc vùng siêu biến có thể, được nhận biết bằng kỹ thuật, ví dụ, sắp xếp thẳng hàng trình tự với các kháng thể khác. Vùng CDR của kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được thể hiện trong các bảng từ 18 đến 23.

MAb nhóm IA

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:209 (XXDIN, trong đó X ở vị trí 1 là S hoặc T và trong đó X ở vị trí 2 là N hoặc D); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, trong đó X ở vị trí 7 là G hoặc D; X ở vị trí 8 là S, T hoặc R; X ở vị trí 9 là I hoặc T; X ở vị trí 13 là E hoặc D; X ở vị trí 14 là K hoặc E; và X ở vị trí 16 là T hoặc K); và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:211 (XEDXY, trong đó X ở vị trí 1 là L hoặc V, và trong đó X ở vị trí 4 là T hoặc S); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, trong đó X ở vị trí 8 là N, I, Q hoặc A; trong đó X ở vị trí 9 là S hoặc T; và trong đó X ở vị trí 17 là A hoặc S); LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:144 (WASTRES) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:146 (KQSYNLYT). Theo một phương án, HC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:56 (TDDIN). Theo một phương án, HC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:62 (SNDIN). Theo một phương án, HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:58 (WIYPRDDRTKYNDKFKD). Theo một phương án, HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:63 (WIYPRDGSIKYNEKFTD). Theo một

phương án, HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:67 (WIYPRDGTTKYNEEFTD). Theo một phương án, HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:69 (WIYPRDGTTKYNEKFTD). Theo một phương án, HC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:60 (LEDTY). Theo một phương án, HC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:65 (VEDSY). Theo một phương án, LC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA); SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA), SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); hoặc SEQ ID NO:259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA). Theo một phương án, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA). Theo một phương án, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:149 (KSSQSLLISRTRKNYLS).

Theo một phương án, HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:56, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:58, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:60 và LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259; LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:144 và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:146.

Theo một phương án, HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:62, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:67 hoặc SEQ ID NO:69, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:65 và LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:149, LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:144 và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:146.

mAb nhóm IB

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:213 (SYGXX, trong đó X ở vị trí 4 là M hoặc I và trong đó X ở vị trí 5 là S hoặc T); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:74; và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:214 (GGXAXDY, trong đó X ở vị trí 3 là E hoặc D và trong đó X ở vị trí 5 là M hoặc L); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:215 (KSSQSLLDSXXKTYLX, trong đó X ở vị trí 10 là D, E hoặc A; trong đó X ở vị trí

11 là G hoặc A; và trong đó X ở vị trí 16 là N hoặc S); LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:155; và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:216 (WQGTHFPXT, trong đó X ở vị trí 8 là W hoặc Y).

Theo một phương án, HC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:72 (SYGMS). Theo một phương án, HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:79 (SYGIT). Theo một phương án, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:76 (GGEAMDY). Theo một phương án, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:82 (GGDALDY). Theo một phương án, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:153 (KSSQSLLDSDGKTYLN); SEQ ID NO:261 (KSSQSLLDSEGKTYLN), SEQ ID NO:262 (KSSQSLLDSAGKTYLN) hoặc SEQ ID NO:263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). Theo một phương án, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). Theo một phương án, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:152. Theo một phương án, LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:159 (KSSQSLLDSDGKTYLS).

Theo một phương án, LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:160 (WQGTHFPYT). Theo một phương án, HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:72, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:74, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:76, và LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262 hoặc SEQ ID NO:263; LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:155 và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:157.

Theo một phương án, HC-CDR chứa SEQ ID NO:72, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:74, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:76, và LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:153 hoặc SEQ ID NO:263, LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:155, và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:157.

Theo một phương án, HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:79, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:74, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:82, và LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:159, LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:155 và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:160.

mAb nhóm IC

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi

nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:84 (GKWIE); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) hoặc SEQ ID NO:275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:88 (SEDV); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); hoặc SEQ ID NO:259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:144 (WASTRES); và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:161 (KQSYNIPT). Theo một phương án, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:258.

mAb nhóm II

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:91 (GYWIE); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG), và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:95 (SIDY); và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:165 (KVSNRFS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:167 (SQSTHVPPT).

mAb nhóm III

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:109 (RVHFAIRDTNYWMQ), HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:110 (AIYPGNGDTSYNQKFKG), HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:112 (GSHYFDY); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:182 (RASQSIGTSIH), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:184 (YASESIS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:186 (QQSNSWPYT); hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:125 (DYYMN), HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:127 (DVNPNNDGTTYNQKFKG), HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:129 (CPFYYLGKGTHFDY); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:196 (RASQDISNFLN), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:198 (YTSRLHS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:200 (QQGFTLPWT); hoặc

(c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:137, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:138, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:140; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:206, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:207 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:208; hoặc

(d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:98, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:99, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:101; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:169, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:171 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:173; hoặc

(e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:103, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:105, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:107; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:176, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:193; hoặc

(f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:114, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:116, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:118; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:188, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:190; hoặc

(g) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:114, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:121, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:123; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:191, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:193; hoặc

(h) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:132, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:133, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:135; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:203, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:165 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:204.

Vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa hoặc bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 24-39, 248-249, 251-252, 254-255 hoặc trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:254 hoặc SEQ ID NO:255.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa hoặc bao gồm trình tự mà đồng nhất ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 40-54, 250, 253, 256, 278, 279, hoặc 280 hoặc trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID

NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:278, SEQ ID NO:279 hoặc SEQ ID NO:280.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:248 hoặc SEQ ID NO:249 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:250 hoặc SEQ ID NO:278.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:25 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:41.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:26 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:42.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:27 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:42.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:251 hoặc SEQ ID NO:252 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:253 hoặc SEQ ID NO:279.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:29 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:44.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:254 hoặc SEQ ID NO:255 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:256 hoặc SEQ ID NO:280.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:31 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:46.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:32 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:47.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:33 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:48.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:34 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:49.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:35 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:50.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:36

và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:51.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:37 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:52.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:38 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:53.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng MASP-3 bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:39 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:54.

Sự cạnh tranh chéo của kháng thể MASP-3 có ái lực cao

Như được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được bộc lộ trong bản mô tả này nhận diện các epitop chồng lặp trong miền serin proteaza của MASP-3. Như được mô tả trong Ví dụ 18, được thể hiện trên Fig.61A-Fig.61E và Fig.62-Fig.67, và được tóm tắt trong Bảng 4 và Bảng 28, phép phân tích cạnh tranh chéo và phân tích liên kết pepscan cho thấy rằng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao cạnh tranh chéo và liên kết với các epitop chung nằm trong miền serin proteaza của MASP-3. Vì thế, theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao mà nhận diện một cách đặc hiệu epitop hoặc một phần của nó trong miền serin proteaza của MASP-3 của người được nhận diện bởi một hoặc nhiều kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm:

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:24 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:40;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:41;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:26 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:42;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:42;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:28 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:43;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:29 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:44;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:30 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:45;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:31 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:46;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:32 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:47;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:33 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:48;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:49;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:50;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:51;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:37 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:52;

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:53; và

kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO:39 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:54.

Theo sáng chế, khi kháng thể đã nêu nhận diện ít nhất một phần của epitop mà đã được nhận diện bởi một kháng thể đã nêu khác, hai kháng thể này được cho là nhận diện cùng một epitop hoặc các epitop chồng lặp.

Các thử nghiệm khác nhau sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể được sử dụng để xác định xem liệu kháng thể (còn được quy định là kháng thể thử nghiệm) nhận diện cùng một epitop hay epitop chồng lặp như kháng thể đơn dòng cụ thể (còn được quy định là kháng thể đối chiếu). Tốt hơn là, thử nghiệm này bao gồm các bước:

- Tạo ra MASP-3 hoặc một mảnh của nó chứa epitop được nhận diện bởi kháng thể đối chiếu
- Bổ sung kháng thể thử nghiệm và kháng thể đối chiếu vào MASP-3 nêu trên, trong đó kháng thể thử nghiệm hoặc kháng thể đối chiếu được đánh dấu bằng chất đánh dấu dễ phát hiện. Theo một cách khác, cả hai kháng thể có thể được đánh dấu bằng các chất đánh dấu dễ phát hiện khác nhau
- Phát hiện ra sự có mặt của chất đánh dấu dễ phát hiện ở MASP-3
- Từ đó phát hiện ra liệu kháng thể thử nghiệm có thể đổi chỗ cho kháng thể đối chiếu hay không

Nếu kháng thể đối chiếu được đổi chỗ, thì kháng thể thử nghiệm nhận diện cùng một epitop hoặc epitop chồng lặp như kháng thể đối chiếu. Vì thế, nếu kháng thể đối chiếu được đánh dấu bằng chất đánh dấu dễ phát hiện, thì tín hiệu dễ phát hiện ở mức thấp ở MASP-3 là chỉ báo cho việc đổi chỗ của kháng thể đối chiếu. Nếu kháng thể thử nghiệm được đánh dấu bằng chất đánh dấu dễ phát hiện, thì tín hiệu dễ phát hiện ở mức cao ở MASP-3 là chỉ báo cho việc đổi chỗ của kháng thể đối

chiếu. Mảnh MASP-3 tốt hơn là có thể được cố định trên giá đỡ rắn thúc đẩy việc xử lý dễ dàng. Chất đánh dấu dễ phát hiện này có thể là chất đánh dấu dễ phát hiện trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ, như enzym, chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ, kim loại nặng, hợp chất có màu hoặc hợp chất huỳnh quang. Trong Ví dụ 18 trong phần "Phân tích liên kết cạnh tranh" dưới đây mô tả phương pháp lấy làm ví dụ để xác định xem liệu kháng thể thử nghiệm nhận diện cùng một epitop hay epitop chồng lặp như kháng thể đối chiếu được mô tả. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dễ dàng biến đổi thích hợp phương pháp này theo các kháng thể cụ thể đang quan tâm.

Kháng thể MASP-3 hữu ích theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc tái tổ hợp thu được từ động vật có vú sản sinh kháng thể bất kỳ và có thể là kháng thể nhiều đặc hiệu (tức là, hai đặc hiệu hoặc ba đặc hiệu), khảm, được làm giống như của người, của người đầy đủ, kháng idiotyp, và các mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể bao gồm mảnh Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, Fv, mảnh scFv và các kháng thể chuỗi đơn như cũng được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể MASP-3 có thể được sàng lọc về khả năng ức chế hệ hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh bằng cách sử dụng các thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này. Việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh được đặc trưng bởi ít nhất một hoặc nhiều thay đổi trong số các thay đổi ở thành phần của hệ thống bổ thể sau đây mà xuất hiện do sử dụng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao theo các phương án khác nhau theo sáng chế: ức chế sự tan máu và/hoặc sự opsonin hóa; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố D, ức chế sự phân cắt đặc hiệu cơ chất MASP-3 serin proteaza; giảm sự tan máu hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b; giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa; giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D; giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa; và/hoặc tạo ra mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng.

Kháng thể MASP-3 có chức năng tác động giảm

Theo một số phương án theo khía cạnh này của sáng chế, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được mô tả trong bản mô tả này có chức năng tác động giảm để làm giảm chứng viêm có thể bắt nguồn từ sự hoạt hóa của con đường bổ thể cổ điển. Khả năng của phân tử IgG trong việc khởi phát con đường bổ thể cổ điển đã cho thấy là nằm trong phần Fc của phân tử này (Duncan, A.R., et al., *Nature 332*:738-740 (1988)). Phân tử IgG trong đó phần Fc của phân tử đã được loại bỏ bằng cách phân cắt enzym không có chức năng tác động này (xem tài liệu Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Do đó, các kháng thể có chức năng tác động giảm có thể được tạo ra như là kết quả của việc thiếu phần Fc của phân tử nhờ có trình tự Fc đã được xử lý di truyền làm tối thiểu hóa chức năng tác động, hoặc là isotyp IgG_2 hoặc IgG_4 của người.

Các kháng thể có chức năng tác động giảm có thể được sản xuất ra bằng thao tác sinh phân tử tiêu chuẩn của phần Fc của chuỗi nặng IgG như được mô tả trong tài liệu Jolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol. 10*:241-250, (1993), và Rodrigues et al., *J. Immunol. 151*:6954-6961, (1998). Các kháng thể có chức năng tác động giảm còn bao gồm isotyp IgG2 và IgG4 của người mà có khả năng hoạt hóa bổ thể và/hoặc tương tác với thụ thể Fc giảm (Ravetch, J.V., et al., *Annu. Rev. Immunol. 9*:457-492, (1991); Isaacs, J.D., et al., *J. Immunol. 148*:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., *Immunol. Today 14*:215-221, (1993)). Kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể người đầy đủ đặc hiệu đối với MASP-1, MASP-2 hoặc MASP-3 của người (bao gồm kháng thể đặc hiệu kép, đặc hiệu với pan, hai đặc hiệu hoặc ba đặc hiệu) gồm có isotyp IgG2 hoặc IgG4 có thể được sản xuất ra bằng một trong các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, như được mô tả trong tài liệu Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical 16*:535-539, (1998).

Tạo ra kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao

Kháng thể MASP-3 có thể được sản xuất ra bằng cách sử dụng MASP-3 polypeptit (ví dụ, MASP-3 chiều dài đầy đủ) hoặc sử dụng peptit mang epitop MASP-3 kháng nguyên (ví dụ, một phần của MASP-3 polypeptit), ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 14 dưới đây. Peptit sinh miễn dịch có thể nhỏ bằng năm gốc axit amin. MASP-3 peptit và polypeptit dùng để tạo ra kháng thể có thể được phân lập dưới dạng polypeptit tự nhiên, hoặc peptit tái tổ hợp hoặc tổng hợp và polypeptit tái tổ hợp bất hoạt về mặt xúc tác. Các kháng nguyên hữu ích để sản xuất ra kháng thể MASP-3 còn bao gồm polypeptit dung hợp, như dạng dung hợp của MASP-3 polypeptit hoặc một phần của nó với polypeptit của globulin miễn dịch hoặc với protein liên kết maltoza. Chất sinh miễn dịch polypeptit có thể là phân tử chiều dài đầy đủ hoặc một phần của nó. Nếu phần polypeptit này giống hapten, thì phần này có thể được nối hoặc liên kết một cách thuận lợi với chất mang đại phân tử (như keyhole limpet hemoxyanin (KLH), albumin huyết thanh bò (BSA) hoặc giải độc tố uốn ván) để miễn dịch hóa.

Kháng thể đơn dòng

Như được sử dụng trong bản mô tả này, dạng biến đổi "đơn dòng" chỉ đặc tính của kháng thể là thu được từ quần thể các kháng thể gần như đồng nhất, và không được hiểu là bắt buộc tạo ra kháng thể này bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Các kháng thể đơn dòng có thể thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ hỗ trợ việc sản xuất các phân tử kháng thể bằng các dòng tế bào liền kề trong môi trường nuôi cấy, như phương pháp lai được mô tả trong tài liệu Kohler, G., et al., *Nature 256*:495, (1975), hoặc chúng có thể được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp ADN (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4816567 của Cabilly). Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân lập từ thư viện kháng thực khuẩn thể bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu Clackson, T., et al., *Nature 352*:624-628, (1991), và Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol. 222*:581-597, (1991). Các kháng thể này có thể là nhóm globulin miễn dịch bất kỳ bao gồm IgG, IgM, IgE, IgA, IgD và lớp con bất kỳ của chúng.

Ví dụ, các kháng thể đơn dòng có thể thu được bằng cách cho động vật có vú thích hợp (ví dụ, chuột nhắt BALB/c) tiêm chế phẩm chứa MASP-3 polypeptit, hoặc

một phần của nó. Sau một khoảng thời gian được xác định trước, các tế bào lách được loại bỏ khỏi con chuột nhắt này và được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy tế bào. Các tế bào lách sau đó được dung hợp với dòng tế bào bất tử để tạo ra tế bào lai. Các tế bào lai đã tạo ra được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy tế bào và được sàng lọc về khả năng sản xuất ra kháng thể đơn dòng kháng MASP-3 của chúng. (Cũng xem trong tài liệu *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, trang 2.5.1-2.6.7, 1991.)

Các kháng thể đơn dòng của người có thể thu được bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen đã được xử lý kỹ thuật để sản xuất ra các kháng thể người đặc hiệu đáp ứng với thách thức kháng nguyên. Trong kỹ thuật này, các thành phần của locus chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch của người được đưa vào các chủng chuột nhắt thu được từ dòng tế bào gốc bào thai chứa các phá vỡ được hướng đích của locus chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch nội sinh. Chuột nhắt chuyển gen có thể tổng hợp các kháng thể người đặc hiệu đối với kháng nguyên người, như kháng nguyên MASP-2 được mô tả trong bản mô tả này, và chuột nhắt có thể được sử dụng để sản sinh ra tế bào lai tiết kháng thể MASP-2 của người bằng cách dung hợp các tế bào B từ các động vật này với dòng tế bào u tủy thích hợp bằng cách sử dụng công nghệ Kohler-Milstein thông thường. Các phương pháp để thu được kháng thể người từ chuột nhắt chuyển gen được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Green, L.L., et al., *Nature Genet. 7*:13, 1994; Lonberg, N., et al., *Nature 368*:856, 1994; và Taylor, L.D., et al., *Int. Immun. 6*:579, 1994.

Các kháng thể đơn dòng có thể được phân lập và tinh chế từ môi trường nuôi cấy tế bào lai bằng các kỹ thuật được thiết lập tốt khác nhau. Các kỹ thuật phân lập như vậy bao gồm sắc ký ái lực với Protein-A Sepharoza, sắc ký loại trừ theo kích cỡ, và sắc ký trao đổi ion (xem, ví dụ, Coligan ở trang 2.7.1-2.7.12 và trang 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", trong *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, trang 79-104, 1992).

Khi được sản xuất ra, trước tiên các kháng thể đơn dòng được thử nghiệm về khả năng liên kết MASP-3 đặc hiệu hoặc, nếu muốn, khả năng liên kết MASP-1/3,

MASP-2/3 hoặc MASP-1/2 kép. Phương pháp để xác định xem liệu kháng thể liên kết với kháng nguyên protein và/hoặc ái lực cho kháng thể với kháng nguyên protein là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, sự liên kết của kháng thể với kháng nguyên protein có thể được phát hiện ra và/hoặc được định lượng bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau như, nhưng không giới hạn ở, phương pháp thẩm tách Tây, thẩm tách điểm, cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, hệ thống BIAcore; Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ), hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA). Xem tài liệu, ví dụ, Harlow and Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; Benny K. C. Lo (2004) "Antibody Engineering: Methods and Protocols", Humana Press (ISBN: 1588290921); Borrebaek (1992) "Antibody Engineering, A Practical Guide", W.H. Freeman and Co., NY; Borrebaek (1995) "Antibody Engineering", 2nd Edition, Oxford University Press, NY, Oxford; Johne et al. (1993), *Immunol. Meth.* 160:191-198; Jonsson et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; và Jonsson et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627. Cũng xem trong patent Mỹ số 6355245.

Ái lực của các kháng thể đơn dòng MASP-3 có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (xem tài liệu, ví dụ, Scatchard, A., *NY Acad. Sci. 51*:660-672, 1949). Theo một phương án, các kháng thể đơn dòng MASP-3 hữu ích cho phương pháp theo sáng chế liên kết với MASP-3 với ái lực liên kết <100 nM, tốt hơn là <10 nM, tốt hơn là <2 nM, và tốt nhất là với ái lực cao <500 pM.

Mỗi khi kháng thể được nhận biết là liên kết đặc hiệu với MASP-3, kháng thể MASP-3 này được thử nghiệm về khả năng có chức năng như chất ức chế con đường nhánh trong một trong các thử nghiệm chức năng, như, ví dụ, ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh được đặc trưng bởi ít nhất một hoặc nhiều thay đổi trong các thay đổi ở thành phần của hệ thống bổ thể sau đây mà xuất hiện do sử dụng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao theo các phương án khác nhau theo sáng chế: ức chế sự tan máu và/hoặc sự opsonin hóa; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào

lectin của yếu tố B; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố D, ức chế sự phân cắt đặc hiệu cơ chất MASP-3 serin proteaza; giảm sự tan máu hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b; giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa; giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D; giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa; giảm sự tạo ra mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng; và/hoặc giảm sự kết lắng của yếu tố P.

Kháng thể khảm/được làm giống như của người

Các kháng thể đơn dòng hữu ích trong phương pháp theo sáng chế bao gồm kháng thể khảm trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ giống hệt hoặc đồng nhất với các trình tự tương ứng trong kháng thể thu được từ loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc lớp con kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi đó giống hệt hoặc đồng nhất với các trình tự tương ứng trong kháng thể thu được từ một loài khác hoặc thuộc lớp hoặc lớp con kháng thể khác, cũng như các mảnh của kháng thể này (Patent Mỹ số 4816567, của Cabilly; và Morrison, S.L., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81*:6851-6855, (1984)).

Một dạng kháng thể khảm hữu ích theo sáng chế là kháng thể đơn dòng MASP-3 được làm giống như của người. Dạng được làm giống như của người của kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) là kháng thể khảm, chứa trình tự nhỏ nhất thu được từ globulin miễn dịch không phải của người. Các kháng thể đơn dòng được làm giống như của người được sản xuất ra bằng cách truyền vùng quyết định tính bổ sung (CDR) không phải của người (ví dụ, chuột nhắt), từ chuỗi biến đổi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch chuột nhắt vào miền biến đổi của người. Thông thường thì sau đó các gốc kháng thể người được thay thế trong vùng khung của dạng đối chiếu không phải của người. Ngoài ra, kháng thể được làm giống như của người có thể bao gồm các gốc không được tìm thấy trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Các cải biến này được thực hiện để cải tiến hơn nữa đặc tính của kháng thể. Nhìn chung, kháng thể được làm giống như của người sẽ bao gồm gần như toàn bộ

ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vòng siêu biến tương ứng với các vòng siêu biến của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc gần như tất cả các vùng khung Fv là các vùng khung Fv của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm giống như của người tùy ý còn bao gồm ít nhất một phần vùng hằng định globulin miễn dịch (Fc), thường là của globulin miễn dịch của người. Để có thêm thông tin chi tiết, xem tài liệu Jones, P.T., et al., *Nature 321*:522-525, (1986); Reichmann, L., et al., *Nature 332*:323-329, (1988); và Presta, *Curr. Op. Struct. Biol. 2*:593-596, (1992).

Kháng thể được làm giống như của người hữu ích theo sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng của người bao gồm ít nhất một vùng CDR3 liên kết MASP-3. Ngoài ra, phần Fc có thể được thay thế để sản sinh ra IgA hoặc IgM cũng như kháng thể IgG của người. Kháng thể được làm giống như của người này sẽ có tính hữu dụng lâm sàng đặc biệt do chúng nhận diện một cách đặc hiệu MASP-3 của người nhưng không gây ra đáp ứng miễn dịch ở người kháng bản thân kháng thể. Do đó, tốt hơn là chúng được biến đổi thích hợp để sử dụng *in vivo* ở người, đặc biệt là khi cần phải sử dụng lặp lại hoặc lâu dài.

Các kỹ thuật để tạo ra kháng thể đơn dòng được làm giống như của người cũng được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Jones, P.T., et al., *Nature 321*:522, (1986); Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89*:4285, (1992); Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech. 12*:437, (1992); Singer, I.I., et al., *J. Immun. 150*:2844, (1993); Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols,* Humana Press, Inc., (1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", trong *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., trang 399-434, (1996); và trong patent Mỹ số 5693762, của Queen, 1997. Ngoài ra, có các dụng cụ bán trên thị trường mà tổng hợp kháng thể được làm giống như của người từ các vùng kháng thể chuột cụ thể, như Protein Design Lab (Mountain View, CA).

Kháng thể tái tổ hợp

Kháng thể MASP-3 cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp. Ví dụ, kháng thể người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng thư viện biểu hiện globulin miễn dịch của người (có sẵn từ, ví dụ, Stratagene, Corp., La Jolla, CA) để sản xuất ra các mảnh kháng thể người (V_H, V_L, Fv, Yếu tố D, Fab hoặc $F(ab')_2$). Sau đó các mảnh này được sử dụng để xây dựng cấu trúc kháng thể người toàn vẹn bằng cách sử dụng các kỹ thuật tương tự với các kỹ thuật để tạo ra kháng thể khảm.

Mảnh globulin miễn dịch

Chất ức chế MASP-3 hữu ích trong phương pháp theo sáng chế không chỉ bao gồm phân tử globulin miễn dịch nguyên vẹn mà còn bao gồm cả các mảnh đã biết rõ bao gồm mảnh Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ và Fv, mảnh scFv, kháng thể thể đôi, kháng thể mạch thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn và kháng thể nhiều đặc hiệu (ví dụ, hai đặc hiệu và ba đặc hiệu) được tạo ra từ mảnh kháng thể.

Cũng biết rõ trong lĩnh vực rằng chỉ một phần nhỏ của phân tử kháng thể, paratop, là có liên quan đến sự liên kết của kháng thể với epitop của nó (xem tài liệu, ví dụ, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Vùng pFc' và vùng Fc của kháng thể này là các tác nhân tác động của con đường bổ thể cổ điển nhưng không liên quan đến sự liên kết kháng nguyên. Kháng thể mà vùng pFc' đã được phân cắt enzym hóa từ đó, hoặc đã được sản xuất ra từ đó mà không có vùng pFc', được ký hiệu là mảnh $F(ab')_2$ và giữ được cả hai điểm liên kết kháng nguyên của kháng thể nguyên vẹn. Mảnh $F(ab')_2$ được phân lập được đề cập đến là mảnh đơn dòng hóa trị hai do hai điểm liên kết kháng nguyên của nó. Tương tự, kháng thể mà vùng Fc đã được phân cắt enzym hóa từ đó, hoặc đã được sản xuất ra từ đó mà không có vùng Fc, được ký hiệu là mảnh Fab, và giữ được một trong hai điểm liên kết kháng nguyên của phân tử kháng thể nguyên vẹn.

Mảnh kháng thể có thể thu được bằng cách thủy phân phân hủy protein, như bằng cách phân hủy pepsin hoặc papain của kháng thể toàn vẹn bằng các phương pháp thông thường. Ví dụ, mảnh kháng thể có thể được sản xuất ra bằng cách phân

cắt enzym hóa các kháng thể bằng pepsin để tạo ra mảnh 5S ký hiệu là $F(ab')_2$. Mảnh này có thể được phân cắt thêm bằng cách sử dụng chất khử thiol để tạo ra mảnh hóa trị một 3.5S Fab'. Tùy ý, phản ứng phân cắt này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhóm phong bế cho nhóm sulfhydryl mà thu được từ quá trình phân cắt các liên kết disulfua. Theo cách khác, việc phân cắt enzym hóa sử dụng pepsin tạo ra hai mảnh Fab hóa trị một và một mảnh Fc một cách trực tiếp. Các phương pháp này được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 4331647 của Goldenberg; Nisonoff, A., et al., *Arch. Biochem. Biophys. 89*:230, (1960); Porter, R.R., *Biochem. J. 73*:119, (1959); Edelman, et al., trong *Methods in Enzymology 1*:422, Academic Press, (1967); và của Coligan ở trang 2.8.1-2.8.10 và 2.10-2.10.4.

Theo một số phương án, việc sử dụng mảnh kháng thể thiếu vùng Fc được ưu tiên để tránh sự hoạt hóa của con đường bổ thể cổ điển được khởi phát khi Fc liên kết với thụ thể Fcγ. Có một vài phương pháp nhờ đó người có hiểu biết trung bình có thể sản xuất ra kháng thể đơn dòng mà tránh được sự tương tác thụ thể Fcγ. Ví dụ, vùng Fc của kháng thể đơn dòng có thể được loại bỏ theo phương pháp hóa học bằng cách sử dụng kỹ thuật phân hủy một phần bằng enzym phân hủy protein (như phân hủy ficin), từ đó tạo ra, ví dụ, mảnh kháng thể liên kết kháng nguyên như mảnh Fab hoặc $F(ab)_2$ (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol. 28*:69-71, (1991)). Theo một cách khác, isotyp γ4 IgG của người, không liên kết thụ thể Fcγ, có thể được sử dụng trong khi xây dựng cấu trúc kháng thể được làm giống như của người như được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể, kháng thể chuỗi đơn và miền liên kết kháng nguyên thiếu miền Fc cũng có thể được xử lý kỹ thuật bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp được mô tả trong bản mô tả này.

Mảnh kháng thể chuỗi đơn

Theo một cách khác, người có hiểu biết trung bình có thể tạo ra phân tử liên kết chuỗi peptit đơn đặc hiệu đối với MASP-3 trong đó vùng Fv của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối. Các mảnh Fv có thể được nối bằng tác nhân liên kết peptit để tạo ra protein liên kết kháng nguyên chuỗi đơn (scFv). Các protein liên kết kháng

nguyên chuỗi đơn này được tạo ra bằng cách xây dựng cấu trúc cho gen cấu trúc chứa trình tự ADN mã hóa miền V_H và V_L mà được nối bằng oligonucleotit. Gen cấu trúc này được xen vào vectơ biểu hiện, tiếp đó được đưa vào tế bào chủ, như *E. coli*. Tế bào chủ tái tổ hợp này tổng hợp chuỗi polypeptit đơn bằng tác nhân liên kết peptit cầu nối hai miền V. Phương pháp sản xuất scFv được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" *2*:97, (1991); Bird, et al., *Science 242*:423, (1988); patent Mỹ số 4946778, của Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology 11*:1271, (1993).

Là một ví dụ minh họa, scFv đặc hiệu MASP-3 có thể thu được bằng cách cho các lympho bào tiếp xúc với MASP-3 polypeptit *in vitro* và chọn lọc thư viện biểu hiện kháng thể trong thực khuẩn thể hoặc các vectơ tương tự (ví dụ, bằng cách sử dụng protein MASP-3 hoặc peptit đã được cố định hoặc đánh dấu). Các gen mã hóa polypeptit có miền liên kết polypeptit MASP-3 tiềm năng có thể thu được bằng cách sàng lọc các thư viện peptit ngẫu nhiên được biểu hiện trên thực khuẩn thể hoặc trên vi khuẩn như *E. coli*. Các thư viện biểu hiện peptit ngẫu nhiên có thể được sử dụng để sàng lọc peptit tương tác với MASP-3. Các kỹ thuật để tạo ra và sàng lọc thư viện biểu hiện peptit ngẫu nhiên như vậy là đã biết rõ trong lĩnh vực (Patent Mỹ số 5223409, của Lardner; patent Mỹ số 4946778, của Ladner; patent Mỹ số 5403484, của Lardner; patent Mỹ số 5571698, của Lardner; và Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996) và các thư viện biểu hiện peptit ngẫu nhiên và bộ kit để sàng lọc các thư viện này có thể mua được trên thị trường, ví dụ từ CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.), và Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Một dạng khác của mảnh kháng thể MASP-3 hữu ích theo khía cạnh này của sáng chế là peptit mã hóa vùng quyết định tính bổ sung (CDR) đơn lẻ mà liên kết với epitop trên kháng nguyên MASP-3 và ức chế sự hoạt hóa con đường bổ thể nhánh.

CDR peptit ("đơn vị nhận diện nhỏ nhất") có thể thu được bằng cách xây dựng cấu trúc cho các gen mã hóa CDR của kháng thể đang quan tâm. Các gen này được tạo ra, ví dụ, bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeaza để tổng hợp vùng biến đổi từ ARN của các tế bào sản sinh ra kháng thể (xem tài liệu, ví dụ, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods* in *Enzymology 2*:106, (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", trong *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), trang 166, Cambridge University Press, (1995); và Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", trong *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), trang 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng cho đối tượng cần điều trị để ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh. Theo một số phương án, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao là kháng thể đơn dòng MASP-3 được làm giống như của người tùy ý có chức năng tác động giảm.

Kháng thể hai đặc hiệu

Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao hữu ích trong phương pháp theo sáng chế bao gồm kháng thể nhiều đặc hiệu (tức là, hai đặc hiệu và ba đặc hiệu). Kháng thể hai đặc hiệu là kháng thể đơn dòng, tốt hơn là kháng thể người hoặc được làm giống như của người mà có tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất hai kháng nguyên khác nhau. Theo một phương án, chế phẩm và phương pháp này bao gồm bước sử dụng kháng thể hai đặc hiệu chứa tính đặc hiệu liên kết đối với miền serin proteaza của MASP-3 và tính đặc hiệu liên kết đối với MASP-2 (ví dụ, liên kết với ít nhất một trong số CCP1-CCP2 hoặc miền serin proteaza của MASP-2). Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước sử dụng kháng thể hai đặc hiệu chứa tính đặc hiệu liên kết đối với miền serin proteaza của MASP-3 và tính đặc hiệu liên kết đối với MASP-1 (ví dụ, liên kết với miền serin proteaza của MASP-1). Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước sử dụng kháng thể ba đặc hiệu chứa tính đặc hiệu liên kết đối với MASP-3 (ví dụ, liên kết với miền serin proteaza của MASP-3), tính đặc hiệu liên kết đối với MASP-2 (ví dụ, liên kết với ít nhất một trong số

CCP1-CCP2 hoặc miền serin proteaza của MASP-2) và tính đặc hiệu liên kết đối với MASP-1 (ví dụ, liên kết với miền serin proteaza của MASP-1).

Phương pháp tạo ra kháng thể hai đặc hiệu nằm trong tầm hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Thông thường, việc sản xuất tái tổ hợp kháng thể hai đặc hiệu là dựa trên sự biểu hiện đồng thời của hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi nặng có tính đặc hiệu khác nhau (Milstein and Cuello, *Nature* 305:537-539 (1983)). Miền biến đổi của kháng thể có tính đặc hiệu liên kết được mong muốn (điểm kết hợp kháng thể-kháng nguyên) có thể được dung hợp với các trình tự miền hằng định của globulin miễn dịch. Việc dung hợp tốt hơn là với miền hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch, bao gồm ít nhất một phần của vùng bản lề, C_H2, và C_H3. ADN mã hóa các thể dung hợp chuỗi nặng của globulin miễn dịch và, nếu muốn, chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch, được xen vào các vectơ biểu hiện riêng rẽ, và được đồng chuyển nhiễm vào sinh vật chủ thích hợp. Để có thêm thông tin chi tiết về phương pháp minh họa hiện có đã biết để tạo ra kháng thể hai đặc hiệu, xem tài liệu, ví dụ, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986); WO96/27011; Brennan et al., *Science* 229:81 (1985); Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci* USA 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994); và Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991). Kháng thể hai đặc hiệu còn bao gồm kháng thể liên kết chéo hoặc kháng thể tiếp hợp khác loại. Kháng thể tiếp hợp khác loại có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp liên kết chéo thuận tiện bất kỳ. Các chất liên kết chéo thích hợp là đã biết trong lĩnh vực, và được bộc lộ trong Patent Mỹ số 4676980, cùng với một số kỹ thuật liên kết chéo.

Các kỹ thuật khác nhau để tạo ra và phân lập mảnh kháng thể hai đặc hiệu trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp cũng đã được mô tả. Ví dụ, kháng thể hai đặc hiệu đã được sản xuất ra bằng cách sử dụng tác nhân khóa leuxin. (Xem tài liệu, ví dụ, Kostelny et al. *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)). Công nghệ "kháng thể thể đôi" được mô tả trong tài liệu Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci*

USA 90:6444-6448 (1993), đề xuất cơ chế thay thế để tạo ra mảnh kháng thể hai đặc hiệu. Các mảnh này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bằng tác nhân liên kết mà quá ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai miền này trên cùng một chuỗi. Do đó, miền VH và miền VL của một mảnh bắt buộc phải ghép cặp với các miền VL và VH có tính bổ sung của một mảnh khác, từ đó tạo ra hai điểm liên kết kháng nguyên. Kháng thể thể đôi hai đặc hiệu, đối lập với kháng thể toàn vẹn hai đặc hiệu, cũng có thể đặc biệt hữu ích do chúng có thể dễ dàng được xây dựng cấu trúc và được biểu hiện trong E. coli. Kháng thể thể đôi (và nhiều polypeptit khác như mảnh kháng thể) có tính đặc hiệu liên kết thích hợp có thể dễ dàng được chọn lọc bằng cách sử dụng kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể (WO94/13804) từ các thư viện. Nếu một nhánh của kháng thể thể đôi cần được giữ cố định, ví dụ, có tính đặc hiệu được định hướng kháng kháng nguyên X, thì thư viện có thể được tạo ra trong đó nhánh còn lại thay đổi và kháng thể có tính đặc hiệu thích hợp được chọn lọc.

Một chiến lược khác để tạo ra mảnh kháng thể hai đặc hiệu bằng cách sử dụng các dime Fv chuỗi đơn (scFv) cũng được báo cáo. (Xem tài liệu, ví dụ, Gruber et al. *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)). Theo một cách khác, kháng thể này có thể là "kháng thể mạch thẳng" như được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). Mô tả một cách ngắn gọn, các kháng thể này chứa cặp phần yếu tố D tiếp đôi (V_H-C_HI-V_H-C_HI) mà tạo ra cặp vùng liên kết kháng nguyên. Kháng thể mạch thẳng có thể là hai đặc hiệu hoặc một đặc hiệu. Phương pháp theo sáng chế cũng bao gồm bước sử dụng các dạng biến thể của kháng thể hai đặc hiệu như phân tử globulin miễn dịch của miền biến đổi kép (DVD-Ig) hóa trị bốn được mô tả trong tài liệu Wu et al., *Nat Biotechnol* 25:1290-1297 (2007). Phân tử DVD-Ig được thiết kế sao cho hai miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) khác nhau từ hai kháng thể bố mẹ khác nhau được liên kết trong thể tiếp đôi một cách trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết ngắn bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, sau đó đến miền hằng định chuỗi nhẹ. Phương pháp tạo ra phân tử DVD-Ig từ hai kháng thể bố mẹ được mô tả chi tiết hơn trong tài

liệu, ví dụ, WO08/024188 và WO07/024715, mỗi bản mô tả của chúng được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

XVIII. Dược phẩm và phương pháp phân phối

Định liều

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao để ức chế các tác động bất lợi của quá trình hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh ở đối tượng cần điều trị, như, ví dụ, đối tượng mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến con đường nhánh, như, ví dụ, bệnh tan máu, như PNH, hoặc bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng (MS), hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ.

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao với lượng có tác dụng để ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước sử dụng dược phẩm chứa chất ức chế MASP-2. Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng cần điều trị, ở liều có tác dụng trị liệu

để điều trị hoặc cải thiện các tình trạng bệnh lý liên quan đến sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh, và tùy ý cả sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-2. Liều có tác dụng trị liệu dùng để chỉ lượng kháng thể ức chế MASP-3, hoặc hỗn hợp của kháng thể ức chế MASP-3 và chất ức chế MASP-2 đủ để có được sự cải thiện các triệu chứng của tình trạng bệnh lý này. Việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh được đặc trưng bởi ít nhất một hoặc nhiều thay đổi trong số các thay đổi ở thành phần của hệ thống bổ thể sau đây mà xuất hiện do sử dụng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao theo các phương án khác nhau theo sáng chế: ức chế sự tan máu và/hoặc sự opsonin hóa; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố B; ức chế sự chuyển hóa không phụ thuộc vào lectin của yếu tố D, ức chế sự phân cắt đặc hiệu cơ chất MASP-3 serin proteaza; giảm sự tan máu hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b; giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa; giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D; giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa; và/hoặc giảm sự tạo ra mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng.

Độ độc và hiệu quả trị liệu của chất ức chế MASP-3 và MASP-2 có thể được xác định bằng các quy trình dược lý tiêu chuẩn sử dụng các mô hình động vật thử nghiệm. Bằng cách sử dụng các mô hình động vật như vậy, NOAEL (không quan sát được mức độ tác động bất lợi) và MED (liều có tác dụng tối thiểu) có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Tỷ lệ liều giữa tác động NOAEL và MED là tỷ lệ trị liệu, được biểu hiện dưới dạng tỷ lệ NOAEL/MED. Chất ức chế MASP-3 và chất ức chế MASP-2 có tỷ lệ hoặc chỉ số trị liệu lớn được ưu tiên nhất. Dữ liệu thu được từ thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng trong phối trộn khoảng liều lượng để sử dụng ở người. Liều lượng chất ức chế MASP-3 và chất ức chế MASP-2 tốt hơn là nằm trong khoảng các nồng độ tuần hoàn bao gồm MED với độ độc nhỏ hoặc không có độ độc. Liều lượng này có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liều lượng được sử dụng và đường dùng được sử dụng.

Đối với dạng phối trộn hợp chất bất kỳ, liều có tác dụng trị liệu có thể được ước tính bằng cách sử dụng các mô hình động vật. Ví dụ, một liều có thể được phối trộn trong mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ tuần hoàn trong huyết tương mà bao gồm MED. Các nồng độ định lượng được của chất ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 trong huyết tương cũng có thể được đo, ví dụ, bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Ngoài các nghiên cứu về độ độc, liều lượng có tác dụng cũng có thể được ước tính dựa trên lượng MASP protein đích có mặt trong đối tượng sống và ái lực liên kết của chất ức chế MASP-3 hoặc MASP-2.

Đã được báo cáo rằng, nồng độ MASP-1 ở đối tượng người bình thường có mặt trong huyết thanh ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1,48 đến 12,83 µg/mL (Terai I. et al, *Clin Exp Immunol* 110:317-323 (1997); Theil et al., *Clin. Exp. Immunol.* 169:38 (2012)). Nồng độ MASP-3 trung bình trong huyết thanh ở đối tượng người bình thường đã được báo cáo là nằm trong khoảng từ khoảng 2,0 đến 12,9 µg/mL (Skjoedt M et al., *Immunobiology* 215(11):921-31 (2010); Degn et al., *J. Immunol Methods*, 361-37 (2010); Csuka et al., *Mol. Immunol.* 54:271 (2013). Đã cho thấy rằng ở đối tượng người bình thường, nồng độ MASP-2 có mặt trong huyết thanh ở nồng độ thấp nằm trong khoảng từ 500 ng/mL, và nồng độ MASP-2 ở đối tượng cụ thể có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm định lượng cho MASP-2 được mô tả trong tài liệu Moller-Kristensen M., et al., *J. Immunol. Methods 282*:159-167 (2003) và Csuka et al., *Mol. Immunol.* 54:271 (2013).

Nhìn chung, liều lượng của dược phẩm được sử dụng chứa chất ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố như độ tuổi của đối tượng, cân nặng, chiều cao, giới tính, tình trạng sức khỏe tổng quát, và tiền sử bệnh trước đó. Nhằm minh họa, chất ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 (như kháng thể MASP-3, kháng thể MASP-1 hoặc kháng thể MASP-2), có thể được sử dụng trong khoảng liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,010 đến 100,0 mg/kg, tốt hơn là từ 0,010 đến 10 mg/kg, tốt hơn là từ 0,010 đến 1,0 mg/kg, tốt hơn nữa là từ 0,010 đến 0,1 mg/kg trọng lượng cơ thể của đối tượng. Theo một số phương án, chất

ức chế MASP-2 (như kháng thể MASP-2) được sử dụng trong các khoảng liều lượng tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 0,010 đến 10 mg/kg, tốt hơn là từ 0,010 đến 1,0 mg/kg, tốt hơn nữa là từ 0,010 đến 0,1 mg/kg trọng lượng cơ thể của đối tượng. Theo một số phương án, chất ức chế MASP-1 (như kháng thể MASP-1) hoặc chất ức chế MASP-3 (như kháng thể MASP-3) được sử dụng trong khoảng liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,010 đến 100,0 mg/kg, tốt hơn là từ 0,010 đến 10 mg/kg, như từ khoảng 1 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg, tốt hơn là từ 0,010 đến 1,0 mg/kg, tốt hơn nữa là từ 0,010 đến 0,1 mg/kg trọng lượng cơ thể của đối tượng.

Hiệu quả trị liệu của chế phẩm ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chế phẩm ức chế MASP-2, hoặc chế phẩm ức chế MASP-1, tùy ý kết hợp với chế phẩm ức chế MASP-2, và các phương pháp theo sáng chế ở đối tượng đã nêu, và các liều lượng thích hợp, có thể được xác định theo các thử nghiệm ở bổ thể đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Bổ thể tạo ra nhiều sản phẩm đặc hiệu. Trong thập kỷ vừa qua, thử nghiệm về tính nhạy và tính đặc hiệu đã được nghiên cứu phát triển và có thể mua được trên thị trường đối với hầu hết các sản phẩm hoạt hóa này, bao gồm mảnh hoạt hóa nhỏ C3a, C4a, và C5a và mảnh hoạt hóa lớn iC3b, C4d, Bb, và sC5b-9. Hầu hết các thử nghiệm này sử dụng các kháng thể đơn dòng phản ứng với kháng nguyên mới (kháng nguyên tân tạo) được lộ ra trên mảnh này, nhưng không lộ ra trên các protein tự nhiên mà chúng được tạo ra từ đó, khiến cho các thử nghiệm này rất đơn giản và đặc hiệu. Hầu hết thử nghiệm là dựa trên công nghệ ELISA, mặc dù thử nghiệm miễn dịch phóng xạ thỉnh thoảng cũng vẫn được sử dụng cho C3a và C5a. Thử nghiệm miễn dịch phóng xạ xác định cả các mảnh chưa được xử lý và các mảnh 'desArg' của chúng, là các dạng chính được tìm thấy trong hệ tuần hoàn. Mảnh chưa được xử lý và $C5a_{desArg}$ được thanh thải nhanh bằng cách liên kết với thụ thể bề mặt tế bào và do đó có mặt ở các nồng độ rất thấp, trong khi đó $C3a_{desArg}$ không liên kết với các tế bào và tích tụ trong huyết tương. Việc xác định C3a mang lại chỉ báo hoạt hóa bổ thể nhạy cảm, không phụ thuộc vào con đường. Sự hoạt hóa con đường nhánh có thể được đánh giá bằng cách xác định mảnh Bb và/hoặc xác

định sự hoạt hóa của yếu tố D. Việc phát hiện ra sản phẩm pha lỏng của quá trình hoạt hóa con đường tấn công màng, sC5b-9, cung cấp bằng chứng rằng bổ thể được hoạt hóa hoàn toàn. Do cả con đường lectin và con đường cổ điển đều tạo ra các sản phẩm hoạt hóa giống nhau, C4a và C4d, nên việc xác định hai mảnh này không cung cấp thông tin bất kỳ về việc con đường nào trong số hai con đường này đã tạo ra sản phẩm hoạt hóa.

Việc ức chế của con đường nhánh ở đối tượng là động vật có vú được đặc trưng bởi ít nhất một hoặc nhiều điều sau ở đối tượng là động vật có vú sau khi điều trị bằng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được bộc lộ trong bản mô tả này: ức chế sự thuần thục của yếu tố D; ức chế con đường nhánh khi được sử dụng cho đối tượng ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb); con đường cổ điển không được ức chế; ức chế sự tan máu và/hoặc sự opsonin hóa; giảm sự tan máu hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b; giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa; giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D; giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa; và/hoặc giảm sự phát sinh mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng.

Việc ức chế sự hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-2 được đặc trưng bởi ít nhất một trong các thay đổi ở thành phần của hệ thống bổ thể sau đây mà xuất hiện do sử dụng chất ức chế MASP-2 theo phương pháp theo sáng chế: ức chế sự tạo ra hoặc sản sinh ra sản phẩm của hệ hoạt hóa bổ thể phụ thuộc vào MASP-2 C4b, C3a, C5a và/hoặc C5b-9 (MAC) (được đo, ví dụ, như được mô tả trong Ví dụ 2 của Patent Mỹ số 7919094), giảm sự phân cắt C4 và sự kết lắng C4b hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng C3b.

Chất mang dược và chất dẫn phân phối

Nhìn chung, chế phẩm kháng thể ức chế MASP-3, hoặc các chế phẩm chứa hỗn hợp của chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-3, có thể được kết hợp với

chất trị liệu được chọn bất kỳ khác, được chứa một cách thích hợp trong chất mang dược dụng. Chất mang này không độc, tương thích sinh học và được chọn lọc để không ảnh hưởng bất lợi đến hoạt tính sinh học của kháng thể ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 (và chất trị liệu bất kỳ khác được kết hợp với nó). Các ví dụ về chất mang dược dụng đối với peptit được mô tả trong patent Mỹ số 5211657 của Yamada. Kháng thể MASP-3 hữu ích theo sáng chế, như được mô tả trong bản mô tả này, có thể được phối trộn thành các chế phẩm ở dạng rắn, bán rắn, gel, lỏng hoặc khí như viên nén, viên nang, bột, hạt, thuốc mỡ, dung dịch, thuốc tạo túi dự trữ, thuốc xông hít và thuốc tiêm cho phép dùng qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa hoặc phẫu thuật. Sáng chế còn bao gồm việc dùng khu trú chế phẩm bằng thiết bị bao y tế và thiết bị tương tự.

Các chất mang thích hợp để phân phối ngoài đường tiêu hóa thông qua việc phân phối qua tiêm, truyền hoặc rửa và cục bộ bao gồm nước cất, nước muối sinh lý được đệm phosphat, dung dịch Ringer thông thường hoặc được lactat hóa, dung dịch dextroza, dung dịch Hank, hoặc propandiol. Ngoài ra, dầu không bay hơi vô trùng có thể được sử dụng dưới dạng dung môi hoặc môi trường tạo hỗn dịch. Đối với mục đích này, dầu tương thích sinh học bất kỳ có thể được sử dụng bao gồm mono- hoặc diglyxerit tổng hợp. Ngoài ra, các axit béo như axit oleic hữu ích trong bào chế các thuốc tiêm. Chất mang và chất có thể được kết hợp ở dạng lỏng, hỗn dịch, gel polyme hóa hoặc không polyme hóa, hồ nhão hoặc thuốc mỡ.

Chất mang cũng có thể bao gồm chất dẫn phân phối để duy trì (tức là, kéo dài, trì hoãn hoặc điều hòa) sự phân phối của (các) chất hoặc tăng cường sự phân phối, hấp thụ, ổn định hoặc dược động học của (các) chất trị liệu. Chất dẫn phân phối như vậy có thể bao gồm, là ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế, vi hạt, vi cầu, cầu nano hoặc hạt nano gồm có protein, liposom, hydrat cacbon, hợp chất hữu cơ tổng hợp, hợp chất vô cơ, hydrogel dạng polyme hoặc copolyme và mixen dạng polyme. Hệ phân phối hydrogel và mixen thích hợp bao gồm PEO:PHB:PEO copolyme và phức hợp copolyme/xyclodextrin được bộc lộ trong WO 2004/009664 A2 và PEO và phức hợp PEO/xyclodextrin được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent

Mỹ số 2002/0019369 A1. Các hydrogel này có thể được tiêm khu trú ở điểm tác động được dự định, hoặc dưới da hoặc trong cơ để tạo ra thuốc giải phóng duy trì tạo túi dự trữ.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phối trộn để phân phối dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch hoặc dưới dạng chất xông hít.

Để phân phối trong khớp, kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2 có thể được mang trong chất mang dạng lỏng hoặc dạng gel tiêm được được mô tả trên đây, chất dẫn phân phối giải phóng duy trì tiêm được được mô tả trên đây, hoặc axit hyaluronic hoặc dẫn xuất của axit hyaluronic.

Để dùng qua đường miệng chất không tiết hormon peptit, kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2 có thể được mang trong chất độn trơ hoặc chất pha loãng như sucroza, tinh bột ngô, hoặc xenluloza.

Để dùng cục bộ, kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2 có thể được mang trong thuốc mỡ, thuốc bôi ngoài da, kem, gel, thuốc nhỏ, thuốc đạn, thuốc xịt, thuốc nước hoặc bột, hoặc trong hệ phân phối gel hoặc vi nang thông qua cao dán ngoài da.

Các hệ phân phối qua mũi và phổi khác nhau, bao gồm khí dung, thuốc xông hít có định liều, thuốc xông hít dạng bột khô, và thuốc phun dùng ống, được nghiên cứu phát triển và có thể đươc biến đổi một cách thích hợp để phân phối theo sáng chế trong khí dung, thuốc xông hít, hoặc chất dẫn phân phối qua ống phun, một cách tương ứng.

Để phân phối trong tủy mạc (IT) hoặc trong não thất (ICV), hệ phân phối vô trùng thích hợp (ví dụ, chất lỏng; gel, hỗn dịch, v.v.) có thể được dùng để sử dụng theo sáng chế.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm tá dược tương thích sinh học, như chất phân tán hoặc thấm ướt, chất tạo hỗn dịch, chất pha loãng, chất đệm, chất

tăng cường thẩm thấu, chất nhũ hóa, chất liên kết, chất làm đặc, chất tạo hương vị (để dùng qua đường miệng).

Chất mang dược dùng cho kháng thể và peptit

Đặc biệt hơn đối với kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao, như được mô tả trong bản mô tả này, các dạng phối trộn lấy làm ví dụ có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa dưới dạng liều lượng tiêm được của dung dịch hoặc hỗn dịch của hợp chất trong chất pha loãng sinh lý dụng với chất mang dược mà có thể là chất lỏng vô trùng như nước, dầu, nước muối, glyxerol hoặc etanol. Ngoài ra, các chất bổ trợ như chất thấm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất hoạt động bề mặt, chất đệm pH và chất tương tự có thể có mặt trong dược phẩm chứa kháng thể MASP-3. Các thành phần bổ sung của dược phẩm bao gồm dầu mỏ (như có nguồn gốc từ động vật, thực vật hoặc tổng hợp), ví dụ, dầu đậu nành và dầu khoáng. Nhìn chung, glycol như propylen glycol hoặc polyetylen glycol là các chất mang lỏng được ưu tiên cho dung dịch tiêm.

Kháng thể MASP-3 cũng có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm tiêm tạo túi dự trữ hoặc chế phẩm cấy ghép mà có thể được phối trộn theo cách như vậy để cho phép các hoạt chất giải phóng duy trì hoặc giải phóng theo đợt.

XVIX. Chế độ dùng

Dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3, tùy ý kết hợp với chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng theo một số cách tùy thuộc vào việc liệu chế độ dùng khu trú hay toàn thân là thích hợp nhất cho tình trạng bệnh lý đang được điều trị. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối bằng cách phủ hoặc kết hợp dược phẩm trên hoặc vào thiết bị y tế cấy ghép được.

Phân phối toàn thân

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phân phối toàn thân" và "việc sử dụng toàn thân" được dự định là bao gồm nhưng không bị giới hạn ở đường miệng và đường ngoài đường tiêu hóa bao gồm trong cơ (IM), dưới da, trong tĩnh mạch (IV), trong động mạch, xông hít, dưới lưỡi, má, cục bộ, áp da, mũi, trực tràng,

âm đạo và các đường dùng khác dẫn đến sự phân tán hiệu quả chất được phân phối vào một hoặc nhiều điểm có tác động trị liệu được dự định. Các đường phân phối toàn thân được ưu tiên đối với dược phẩm theo sáng chế bao gồm trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trong động mạch và xông hít. Sẽ hiểu được rằng đường dùng toàn thân chính xác cho các chất đã chọn lọc được sử dụng trong dược phẩm cụ thể theo sáng chế sẽ được xác định một phần để giải thích cho tính mẫn cảm của chất này với con đường biến nạp chuyển hóa liên quan đến đường dùng đã cho. Ví dụ, chất tiết hormon peptit có thể được sử dụng thích hợp nhất là bằng các đường khác với qua đường miệng.

Kháng thể ức chế MASP-3, như được mô tả trong bản mô tả này, có thể được phân phối vào đối tượng cần điều trị bằng phương tiện thích hợp bất kỳ. Phương pháp phân phối kháng thể MASP-3 và polypeptit bao gồm đường dùng qua đường miệng, phổi, ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, tiêm trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch (IV) hoặc dưới da), xông hít (như thông qua chế phẩm bột mịn), áp da, mũi, âm đạo, trực tràng, hoặc dưới lưỡi, và có thể được phối trộn ở dạng liều lượng thích hợp cho từng đường dùng.

Là ví dụ tiêu biểu, kháng thể ức chế MASP-3 và peptit có thể được đưa vào cơ thể sống bằng cách đưa vào màng cơ thể có khả năng hấp thụ polypeptit, ví dụ, màng mũi, dạ dày-ruột và trực tràng. Các polypeptit thường được đưa vào màng hấp thụ tiếp hợp với chất tăng cường thẩm thấu. (Xem tài liệu, ví dụ, Lee, V.H.L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 5:69, (1988); Lee, V.H.L., *J. Controlled Release 13*:213, (1990); Lee, V.H.L., Ed., *Peptide and Protein Drug Delivery,* Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., *J. Controlled Release 13*:241, (1990). Ví dụ, STDHF là dẫn xuất tổng hợp của axit fusidic, chất hoạt động bề mặt dạng keo tương tự về mặt cấu trúc với muối mật, và được sử dụng làm chất tăng cường thẩm thấu để phân phối qua mũi. (Lee, W.A., *Biopharm. 22*, Nov./Dec. 1990.)

Kháng thể ức chế MASP-3 như được mô tả trong bản mô tả này có thể được đưa vào cùng với một phân tử khác, như lipit, để bảo vệ polypeptit tránh thoái biến enzym. Ví dụ, phương pháp gắn đồng hóa trị các polyme, đặc biệt là polyetylen

glycol (PEG), đã được sử dụng để bảo vệ một số protein khỏi sự thủy phân enzym hóa trong cơ thể và vì thế kéo dài thời gian bán rã (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release 11*:139, (1990)). Nhiều hệ polyme đã được báo cáo để phân phối protein (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release 9*:271, (1989); Hori, R., et al., *Pharm. Res. 6*:813, (1989); Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci. 79*:505, (1990); Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release 10*:195, (1989); Asano, M., et al., *J. Controlled Release 9*:111, (1989); Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release 9*:195, (1989); Makino, K., *J. Controlled Release 12*:235, (1990); Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci. 78*:117, (1989); Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci. 78*:219, (1989)).

Gần đây, liposom đã được nghiên cứu phát triển với độ ổn định trong huyết thanh và thời gian bán rã tuần hoàn cải thiện (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5741516, của Webb). Ngoài ra, các phương pháp khác nhau để điều chế liposom và chế phẩm giống liposom dưới dạng chất mang thuốc tiềm năng đã được nhận xét (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5567434, của Szoka; patent Mỹ số 5552157, của Yagi; patent Mỹ số 5565213, của Nakamori; patent Mỹ số 5738868, của Shinkarenko; và patent Mỹ số 5795587, của Gao).

Để sử dụng áp da, kháng thể ức chế MASP-3, như được mô tả trong bản mô tả này, có thể được kết hợp với các thành phần thích hợp khác, như chất mang và/hoặc chất bổ trợ. Không có giới hạn về bản chất của các thành phần khác như vậy, ngoại trừ việc chúng phải dược dụng đối với việc sử dụng đã dự định của chúng, và không thể làm thoái biến hoạt tính của các thành phần hoạt tính của dược phẩm. Các ví dụ về chất dẫn thuốc thích hợp bao gồm thuốc mỡ, kem, gel, hoặc hỗn dịch, có hoặc không có colagen đã tinh chế. Kháng thể ức chế MASP-3 cũng có thể được thấm đầy vào cao dán áp da, thuốc đắp, và băng vết thương, tốt hơn là ở dạng lỏng hoặc bán lỏng.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng toàn thân trên cơ sở định kỳ ở các khoảng cách thời gian được xác định để duy trì tác dụng trị liệu ở mức độ mong muốn. Ví dụ, dược phẩm có thể được sử dụng, như bằng cách tiêm dưới da, mọi hai đến bốn tuần hoặc ở các khoảng cách thời gian ít thường xuyên hơn. Chế độ liều

lượng được xác định bởi bác sĩ có cân nhắc các yếu tố khác nhau mà có thể ảnh hưởng đến tác động của tổ hợp các chất. Các yếu tố này bao gồm mức độ tiến triển của tình trạng bệnh lý đang được điều trị, độ tuổi của bệnh nhân, giới tính và cân nặng, và các yếu tố lâm sàng khác. Liều lượng cho từng chất riêng lẻ sẽ thay đổi theo chức năng của kháng thể ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 được chứa trong dược phẩm, cũng như sự có mặt và bản chất của chất dẫn phân phối thuốc bất kỳ (ví dụ, chất dẫn phân phối giải phóng duy trì). Ngoài ra, lượng liều lượng có thể được điều chỉnh để đáp ứng sự thay đổi tần suất dùng và tính chất dược động học của (các) chất được phân phối.

Phân phối khu trú

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khu trú" bao gồm việc đưa thuốc vào trong hoặc quanh điểm tác động được định vị theo dự định, và có thể bao gồm ví dụ, phân phối cục bộ vào da hoặc các mô bị ảnh hưởng khác, phân phối trong mắt, sử dụng, đặt hoặc rửa trong tủy mạc (IT), trong não thất (ICV), trong khớp, trong khoang miệng, dùng trong sọ hoặc trong nang. Việc dùng khu trú có thể được ưu tiên là có thể dùng liều thấp hơn, để tránh các tác dụng phụ toàn thân, và để kiểm soát chính xác hơn thời điểm phân phối và nồng độ của hoạt chất ở vị trí phân phối khu trú. Việc dùng khu trú cung cấp nồng độ đã biết ở vị trí đích, bất kể tính thay đổi giữa các bệnh nhân về sự chuyển hóa, dòng máu, v.v.. Việc kiểm soát liều lượng cải thiện cũng đạt được bằng cách phân phối trực tiếp.

Có thể thực hiện được việc phân phối khu trú kháng thể ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 trong ngữ cảnh phương pháp phẫu thuật để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, như ví dụ trong các quy trình như phẫu thuật bắc cầu động mạch, khoan mảng xơ vữa, quy trình laze, quy trình siêu âm, phẫu thuật tạo hình mạch dạng bong bóng và đặt sten. Ví dụ, kháng thể ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho đối tượng kết hợp với quy trình phẫu thuật tạo hình mạch dạng bong bóng. Quy trình phẫu thuật tạo hình mạch dạng bong bóng bao gồm việc gài ống thông có dạng bong bóng đã tháo hơi vào động mạch. Bong bóng đã tháo hơi được định vị gần với mảng xơ vữa động mạch và được tháo hơi sao cho mảng này

được nén dựa vào thành mạch. Do đó, bề mặt bong bóng tiếp xúc với lớp tế bào nội mô mạch trên bề mặt của mạch máu. Kháng thể ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 có thể được gắn vào ống thông để phẫu thuật tạo hình mạch dạng bong bóng theo cách cho phép giải phóng chất này ở vị trí của mảng xơ vữa động mạch. Chất này có thể được gắn vào ống thông bong bóng theo quy trình tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, chất này có thể được giữ trong ngăn ống thông bong bóng cho đến khi bong bóng này được tháo hơi, tại thời điểm đó nó được giải phóng vào môi trường khu trú. Theo một cách khác, chất này có thể được thấm đầy trên bề mặt bong bóng, sao cho nó tiếp xúc với các tế bào của thành động mạch khi bong bóng được tháo hơi. Chất này cũng có thể được phân phối trong ống thông bong bóng đã đục lỗ như ống thông được bộc lộ trong tài liệu Flugelman, M.Y., et al., *Circulation 85*:1110-1117, (1992). Cũng xem trong công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 95/23161 về quy trình gắn protein trị liệu vào ống thông phẫu thuật tạo hình mạch dạng bong bóng lấy làm ví dụ. Tương tự, chất ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 có thể được chứa trong gel hoặc lớp phủ polyme được đưa vào stent, hoặc có thể được kết hợp vào vật liệu của sten, sao cho stent này rửa giải chất ức chế MASP-3 hoặc chất ức chế MASP-2 sau khi đặt mạch.

Kháng thể ức chế MASP-3 được sử dụng trong điều trị bệnh khớp và các rối loạn xương khớp khác có thể được phân phối khu trú bằng cách tiêm trong khớp. Dược phẩm này có thể bao gồm một cách thích hợp chất dẫn phân phối giải phóng duy trì. Một ví dụ khác cho trường hợp trong đó việc phân phối khu trú có thể được mong đợi là, chế phẩm ức chế MASP-3 được sử dụng trong điều trị tình trạng bệnh lý niệu sinh dục có thể được nhỏ một cách thích hợp trong bàng quang hoặc trong cấu trúc niệu sinh dục khác.

XX. Chế độ điều trị

Trong các ứng dụng phòng ngừa, dược phẩm được sử dụng cho đối tượng mẫn cảm, hoặc nếu không thì có nguy cơ có, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến con đường nhánh, ví dụ, bệnh hoặc rối loạn con đường nhánh được chọn từ nhóm bao gồm hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già

(AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) và ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ, với lượng đủ để loại bỏ hoặc làm giảm nguy cơ phát triển các triệu chứng của tình trạng bệnh lý này. Trong các ứng dụng trị liệu, dược phẩm được sử dụng cho đối tượng nghi ngờ mắc, hoặc đã mắc, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến con đường nhánh, như bệnh hoặc rối loạn con đường nhánh được chọn từ nhóm bao gồm hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh

nhược cơ, với lượng có tác dụng trị liệu đủ để làm dịu, hoặc ít nhất là làm giảm một phần, các triệu chứng của tình trạng bệnh lý này.

Theo một phương án, dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được sử dụng cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển PNH. Theo phương án này, tế bào hồng cầu của đối tượng được opsonin hóa bằng các mảnh của C3 khi không có dược phẩm, và việc sử dụng dược phẩm cho đối tượng làm tăng khả năng sống sót của tế bào hồng cầu ở đối tượng này. Theo một phương án, đối tượng này có một hoặc nhiều triệu chứng khi không có dược phẩm được chọn từ nhóm bao gồm (i) dưới nồng độ hemoglobin bình thường, (ii) dưới nồng độ tiểu cầu bình thường; (iii) trên nồng độ hồng cầu lưới bình thường, và (iv) trên nồng độ bilirubin bình thường, và việc sử dụng dược phẩm cho đối tượng này làm cải thiện ít nhất một hoặc nhiều triệu chứng, dẫn đến (i) nồng độ hemoglobin tăng, bình thường, hoặc gần như bình thường (ii) nồng độ tiểu cầu tăng, bình thường hoặc gần như bình thường, (iii) nồng độ hồng cầu lưới giảm, bình thường hoặc gần như bình thường, và/hoặc (iv) nồng độ bilirubin giảm, bình thường hoặc gần như bình thường.

Trong cả chế độ phòng ngừa và trị liệu để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được chọn từ nhóm bao gồm hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh và bệnh Behcet, dược phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và tùy ý chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng với một vài liều cho đến khi đạt kết quả trị liệu thích đáng ở đối tượng. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và/hoặc chất ức chế MASP-2 có thể được sử dụng cho bệnh nhân trưởng thành (ví dụ, trọng lượng trung bình của người trưởng thành là 70 kg) ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1

mg đến 10000 mg, thích hợp hơn là từ 1,0 mg đến 5000 mg, thích hợp hơn là từ 10,0 mg đến 2000 mg, thích hợp hơn là từ 10,0 mg đến 1000 mg và thích hợp hơn nữa là từ 50,0 mg đến 500 mg, hoặc từ 10 đến 200 mg. Đối với các bệnh nhân là trẻ em, liều lượng này có thể được điều chỉnh theo tỷ lệ với trọng lượng của bệnh nhân.

Việc sử dụng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và tùy ý chế phẩm ức chế MASP-2 theo sáng chế có thể được tiến hành bằng một lần dùng chế phẩm này (ví dụ, một chế phẩm duy nhất chứa chất ức chế MASP-3 và tùy ý chất ức chế MASP-2, hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, hoặc sử dụng đồng thời các chế phẩm riêng rẽ), hoặc dùng có giới hạn số lần, để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến con đường nhánh, như bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ.

Theo một cách khác, dược phẩm này có thể được sử dụng ở các khoảng cách thời gian như hằng ngày, hai lần một tuần, hằng tuần, cách tuần, hằng tháng hoặc hai lần một tháng trong khoảng thời gian kéo dài như được xác định bởi bác sĩ để có tác dụng trị liệu tối ưu.

Theo một số phương án, dược phẩm thứ nhất chứa ít nhất một kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và dược phẩm thứ hai chứa ít nhất một chất ức chế MASP-2 được sử dụng cho đối tượng mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh lý được chọn từ nhóm bao gồm hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ.

Theo một phương án, dược phẩm thứ nhất chứa ít nhất một kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và dược phẩm thứ hai chứa ít nhất một chất ức chế MASP-2 được sử dụng đồng thời (tức là, trong khoảng cách thời gian không lớn hơn khoảng 15 phút hoặc ít hơn, như không lớn hơn bất kỳ trong số 10, 5 hoặc 1 phút). Theo một phương án, dược phẩm thứ nhất chứa ít nhất một kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và dược phẩm thứ hai chứa ít nhất một chất ức chế MASP-2 được sử dụng tuần tự (tức là, dược phẩm thứ nhất được sử dụng trước hoặc sau khi sử dụng dược phẩm thứ hai, trong đó khoảng cách thời gian sử dụng là hơn 15 phút). Theo một số phương án, dược phẩm thứ nhất chứa ít nhất một kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và dược phẩm thứ hai chứa ít nhất một chất ức chế MASP-2 được sử dụng đồng thời (tức là, giai đoạn dùng dược phẩm thứ nhất trùng với việc dùng dược phẩm thứ hai). Ví dụ, theo một số phương án, dược phẩm thứ nhất và/hoặc dược phẩm thứ hai được

sử dụng trong giai đoạn ít nhất là một, hai, ba hoặc bốn tuần hoặc lâu hơn. Theo một phương án, ít nhất một kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và ít nhất một chất ức chế MASP-2 được kết hợp ở dạng đơn vị liều lượng. Theo một phương án, dược phẩm thứ nhất chứa ít nhất một kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và dược phẩm thứ hai chứa ít nhất một chất ức chế MASP-2 được đóng gói cùng nhau trong kit để sử dụng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến con đường nhánh, như hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA hoặc bệnh nhược cơ.

Theo một số phương án, đối tượng mắc PNH, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS) hoặc ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP)), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường,

viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép chống lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ đã trải qua từ trước, hoặc hiện đang trải qua liệu pháp điều trị bằng chất ức chế bổ thể tận cùng ức chế sự phân cắt của protein bổ thể C5. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng này dùng dược phẩm theo sáng chế chứa kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao và tùy ý chất ức chế MASP-2 và còn bao gồm bước cho đối tượng này dùng chất ức chế bổ thể tận cùng ức chế sự phân cắt của protein bổ thể C5. Theo một số phương án, chất ức chế bổ thể tận cùng là kháng thể kháng C5 được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một số phương án, chất ức chế bổ thể tận cùng là eculizumab.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây chỉ minh họa cách thức tốt nhất được dự định để thực hiện sáng chế, nhưng không được hiểu là để giới hạn sáng chế. Tất cả các tài liệu trích dẫn ở đây được đưa vào bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 1

Ví dụ này cho thấy rằng chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 được bảo vệ để không bị chết do *Neisseria meningitidis* gây ra sau khi lây nhiễm *N. meningitidis* nhóm huyết thanh A hoặc *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B.

Các phương pháp

Chuột nhắt bất hoạt MASP-2 (Chuột nhắt MASP-2 KO) được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 1 của patent Mỹ số US 7919094, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Chuột nhắt MASP-2 KO 10 tuần tuổi (n=10) và chuột nhắt C57/BL6 loại dại (WT) (n=10) được chủng ngừa với liều lượng bằng 2,6 x 10^7 CFU của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh A Z2491 với thể tích bằng 100 µl bằng cách tiêm trong màng bụng (i.p.). Liều lây nhiễm được sử dụng cho chuột nhắt kết hợp với

dextran sắt ở nồng độ cuối cùng bằng 400 mg/kg. Sự sống sót của chuột nhắt sau khi lây nhiễm được theo dõi trong khoảng thời gian 72 giờ.

Trong một thử nghiệm khác, chuột nhắt MASP-2 KO 10 tuần tuổi (n=10) và chuột nhắt C57/BL6 WT (n=10) được chủng ngừa với liều lượng bằng 6 x 106 CFU của N. meningitidis nhóm huyết thanh B chủng MC58 với thể tích bằng 100 µL bằng các tiêm i.p.. Liều lây nhiễm được sử dụng cho chuột nhắt kết hợp với dextran sắt ở liều cuối cùng bằng 400 mg/kg. Sự sống sót của chuột nhắt sau khi lây nhiễm được theo dõi trong khoảng thời gian 72 giờ. Điểm ốm yếu cũng được xác định đối với chuột nhắt WT và MASP-2 KO trong khoảng thời gian 72 giờ sau khi lây nhiễm, dựa trên các thông số cho điểm ốm yếu được mô tả dưới đây trong bảng 5, dựa trên sơ đồ của Fransen et al. (2010) với các thay đổi nhỏ.

Bảng 5: Cho điểm ốm yếu liên quan đến các dấu hiệu lâm sàng ở chuột nhắt bị lây nhiễm

Các dấu hiệu	Điểm
Bình thường	0
Hơi xù lông	1
Lông xù, chậm và dính mắt	2
Lông xù, lờ đờ và nhắm mắt	3
Rất ốm và không có chuyển động sau khi kích thích	4
Chết	5

Các mẫu máu được lấy từ chuột nhắt vào mỗi giờ sau khi lây nhiễm và được phân tích để xác định mức huyết thanh (log cfu/mL) của *N. meningitidis* để xác minh sự lây nhiễm và xác định tốc độ thanh thải của vi khuẩn ra khỏi huyết thanh.

Kết quả

Fig.6 là biểu đồ Kaplan-Meyer minh họa bằng đồ thị tỷ lệ sống sót tính theo phần trăm của chuột nhắt MASP-2 KO và WT sau khi dùng liều lây nhiễm bằng 2,6 x 10^7 cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh A Z2491. Như được thể hiện trên Fig.6, 100% chuột nhắt MASP-2 KO sống sót trong suốt khoảng thời gian 72 giờ sau khi lây nhiễm. Ngược lại, chỉ 80% chuột nhắt WT (p=0,012) vẫn còn sống 24 giờ

sau khi lây nhiễm, và chỉ 50% chuột nhắt WT vẫn còn sống ở 72 giờ sau khi lây nhiễm. Các kết quả này cho thấy rằng chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 được bảo vệ để không bị chết do *N. meningitidis* nhóm huyết thanh A Z2491 gây ra.

Fig.7 là biểu đồ Kaplan-Meyer minh họa bằng đồ thị tỷ lệ sống sót tính theo phần trăm của chuột nhắt MASP-2 KO và WT sau khi dùng liều lây nhiễm bằng 6 x 10^6 cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58. Như được thể hiện trên Fig.7, 90% chuột nhắt MASP-2 KO sống sót trong suốt khoảng thời gian 72 giờ sau khi lây nhiễm. Ngược lại, chỉ 20% chuột nhắt WT (p=0,0022) vẫn còn sống 24 giờ sau khi lây nhiễm. Các kết quả này cho thấy rằng chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 được bảo vệ để không bị chết do *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58 gây ra.

Fig.8 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58 đã được thu hồi ở các thời điểm khác nhau trong các mẫu máu được lấy từ chuột nhắt MASP-2 KO và WT sau khi lây nhiễm i.p. bằng 6x10^6 cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58 (n=3 ở các thời điểm khác nhau đối với cả hai nhóm chuột nhắt). Các kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình±SEM. Như được thể hiện trên Fig.8, ở chuột nhắt WT, mức *N. meningitidis* trong máu đạt cực đại bằng khoảng 6,0 log cfu/mL ở 24 giờ sau khi lây nhiễm và giảm xuống đến khoảng 4,0 log cfu/mL khoảng 36 giờ sau khi lây nhiễm. Ngược lại, ở chuột nhắt MASP-2 KO, mức *N. meningitidis* đạt cực đại bằng khoảng 4,0 log cfu/mL ở 12 giờ sau khi lây nhiễm và giảm xuống đến khoảng 1,0 log cfu/mL khoảng 36 giờ sau khi lây nhiễm (ký hiệu "*" dùng để chỉ $p<0,05$; ký hiệu "**" dùng để chỉ p=0,0043). Các kết quả này cho thấy rằng mặc dù chuột nhắt MASP-2 KO được lây nhiễm bằng liều của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58 giống với chuột nhắt WT, chuột nhắt MASP-2 KO có sự thanh thải bệnh nhiễm khuẩn huyết tăng cao so với WT.

Fig.9 minh họa bằng đồ thị điểm ốm yếu trung bình của chuột nhắt MASP-2 KO và WT ở 3, 6, 12 và 24 giờ sau khi lây nhiễm với 6x10^6 cfu của *N. meningitidis*

nhóm huyết thanh B chủng MC58. Như được thể hiện trên Fig.9, chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 có sức đề kháng cao đối với bệnh lây nhiễm, với điểm ốm yếu thấp hơn nhiều ở 6 giờ (ký hiệu "*" dùng để chỉ p=0,0411), 12 giờ (ký hiệu "**" dùng để chỉ p=0,0049) và 24 giờ (ký hiệu "***" dùng để chỉ p=0,0049) sau khi lây nhiễm, so với chuột nhắt WT. Các kết quả trên Fig.9 được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình±SEM.

Tóm lại, các kết quả trong ví dụ này cho thấy rằng chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 được bảo vệ để không bị chết do *N. meningitides* gây ra sau khi lây nhiễm với *N. meningitidis* nhóm huyết thanh A hoặc *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B.

Ví dụ 2

Ví dụ này cho thấy rằng việc sử dụng kháng thể MASP-2 sau khi lây nhiễm với *N. meningitidis* làm tăng tỷ lệ sống sót của chuột nhắt bị lây nhiễm bởi *N. meningitidis*.

Bối cảnh/cơ sở lý luận

Như được mô tả trong Ví dụ 24 của patent Mỹ số 7919094, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, protein của chuột cống MASP-2 được sử dụng để tạo một thư viện biểu hiện thực khuẩn thể Fab, từ đó Fab2 #11 được nhận biết dưới dạng kháng thể có hoạt hóa chức năng. Các kháng thể có chiều dài đầy đủ của isotyp IgG2c của chuột cống và IgG2a của chuột nhắt được tạo ra từ Fab2 #11. Kháng thể MASP-2 có chiều dài đầy đủ của isotyp IgG2a của chuột nhắt được đặc trưng về các thông số dược lực học (như được mô tả trong Ví dụ 38 của patent Mỹ số 7919094).

Trong ví dụ này, kháng thể có chiều dài đầy đủ của chuột nhắt MASP-2 thu được từ Fab2 #11 được phân tích trong mô hình chuột nhắt bị lây nhiễm *N. meningitidis*.

Phương pháp

Isotyp IgG2a của kháng thể MASP-2 có chiều dài đầy đủ của chuột nhắt thu được từ Fab2 #11, được tạo ra như được mô tả trên đây, được thử nghiệm trong mô hình chuột nhắt bị lây nhiễm *N. meningitidis* như sau.

1. Sử dụng các kháng thể đơn dòng (MoAb) của chuột nhắt-MASP-2 sau khi lây nhiễm

Chuột nhắt C57/BL6 Charles River 9 tuần tuổi được điều trị bằng kháng thể MASP-2 ức chế của chuột nhắt (1,0 mg/kg) (n=12) hoặc kháng thể isotyp đối chứng (n=10) ở 3 giờ sau khi tiêm i.p. với liều cao ($4x10^6$ cfu) của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58.

Kết quả

Fig.10 là biểu đồ Kaplan-Meyer minh họa bằng đồ thị tỷ lệ sống sót tính theo phần trăm của chuột nhắt sau khi dùng liều lây nhiễm bằng $4x10^6$ cfu của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B chủng MC58, sau đó sử dụng kháng thể ức chế MASP-2 (1,0 mg/kg) hoặc kháng thể isotyp đối chứng 3 giờ sau lây nhiễm. Như được thể hiện trên Fig.10, 90% chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể MASP-2 sống sót trong suốt khoảng thời gian 72 giờ sau khi lây nhiễm. Ngược lại, chỉ 50% chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp sống sót trong suốt khoảng thời gian 72 giờ sau khi lây nhiễm. Ký hiệu "*" dùng để chỉ p=0,0301, như được xác định bằng cách so sánh hai đường cong sống sót.

Các kết quả này cho thấy rằng việc sử dụng kháng thể MASP-2 hữu hiệu để điều trị và cải thiện sự sống sót ở các đối tượng bị lây nhiễm bởi *N. meningitidis.*

Như được thể hiện ở đây, việc sử dụng kháng thể MASP-2 trong điều trị cho đối tượng bị lây nhiễm bởi *N. meningitidis* là hữu hiệu khi sử dụng trong vòng 3 giờ sau lây nhiễm, và được mong đợi là hữu hiệu trong vòng từ 24 giờ đến 48 giờ sau khi lây nhiễm. Bệnh não mô cầu (bệnh màng não cầu huyết hoặc bệnh viêm màng não) là một bệnh cấp trong y tế, và liệu pháp điều trị thường sẽ được khởi động ngay

nếu nghi ngờ bệnh não mô cầu (tức là, trước khi *N. meningitidis* được nhận biết là dương tính dưới dạng tác nhân gây bệnh).

Dựa theo các kết quả ở chuột nhắt MASP-2 KO được thể hiện trong ví dụ 1, cho rằng việc sử dụng kháng thể MASP-2 trước khi lây nhiễm với *N. meningitidis* sẽ là hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc cải thiện mức độ nghiêm trọng của bệnh lây nhiễm.

Ví dụ 3

Ví dụ này thể hiện sự tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *N. meningitidis* trong huyết thanh của người là phụ thuộc vào MASP-3.

Cơ sở lý luận

Các bệnh nhân có mức biểu hiện MBL chức năng trong huyết thanh giảm làm tăng tính mẫn cảm với sự tái phát bệnh lây nhiễm do vi khuẩn và nấm (Kilpatrick et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:401-413 (2002)). Đã biết rằng *N. meningitidis* được nhận diện bởi MBL, và đã cho thấy rằng huyết thanh thiếu hụt MBL không phân hủy *N. meningitidis*.

Dựa theo các kết quả được mô tả trong các ví dụ 1 và 2, một loạt các thử nghiệm được tiến hành để xác định hiệu quả của việc sử dụng kháng thể MASP-2 để điều trị lây nhiễm *N. meningitidis* trong huyết thanh thiếu hụt bổ thể và huyết thanh đối chứng của người. Các thử nghiệm được tiến hành ở nồng độ cao của huyết thanh (20%) để bảo toàn con đường bổ thể.

Phương pháp

1. Hoạt tính diệt khuẩn trong huyết thanh trong các loại huyết thanh thiếu hụt bổ thể khác nhau của người và trong huyết thanh của người được điều trị bằng kháng thể MASP-2 của người

Huyết thanh thiếu hụt bổ thể của người sau đây và huyết thanh đối chứng của người được sử dụng trong thử nghiệm này:

Bảng 6: Mẫu huyết thanh của người được thử nghiệm (như được thể hiện trên Fig.11)

Mẫu	Typ huyết thanh
A	Huyết thanh bình thường của người (NHS) + MASP-2 của người Ab
B	Ab đối chứng NHS + isotyp
C	Huyết thanh MBL -/- của người
D	NHS
E	(HI) NHS được bất hoạt bằng nhiệt

Kháng thể tái tổ hợp kháng lại MASP-2 của người được phân lập từ thư viện kháng thể tổ hợp (Knappik, A., et al., *J. Mol. Biol. 296*:57-86 (2000)), sử dụng kháng thể MASP-2A tái tổ hợp của người làm kháng nguyên (Chen, C.B. and Wallis, *J. Biol. Chem. 276*:25894-25902 (2001)). Mảnh kháng thể kháng scFv của người ức chế hiệu quả sự hoạt hóa qua trung gian con đường lectin của C4 và C3 trong huyết tương người (IC_{50}~20 nM) được nhận biết và biến đổi thành kháng thể IgG4 của người có chiều dài đầy đủ.

N. meningitidis nhóm huyết thanh B-MC58 được ủ với các huyết thanh khác nhau thể hiện trong bảng 6, mỗi nhóm ở nồng độ trong huyết thanh bằng 20%, có bổ sung hoặc không bổ sung kháng thể MASP-2 ức chế của người (3 µg trên tổng thể tích 100 µl) ở nhiệt độ 37°C bằng cách lắc. Các mẫu được lấy ở các thời điểm sau đây: các khoảng thời gian 0, 30, 60 và 90 phút, được dàn đều ra và sau đó số lượng cá thể sống được xác định. Huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt được sử dụng làm đối chứng âm.

Kết quả

Fig.11 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL số lượng cá thể sống của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B-MC58 được thu hồi ở các thời điểm khác nhau trong mẫu huyết thanh của người được thể hiện trong bảng 6. Bảng 7 cung cấp các kết quả của kiểm định Student t đối với Fig.11.

Bảng 7: Các kết quả của kiểm định Student t đối với Fig.11 (thời điểm 60 phút)

	Sai khác trung bình (Log)	Có ý nghĩa? P<0,05?	Tóm tắt giá trị P
A so với B	-0,3678	Có	***(0,0002)
A so với C	-1,1053	Có	***(p<0,0001)
A so với D	-0,2111	Có	**(0,0012)
C so với D	1,9	Có	***(p<0,0001)

Như được thể hiện trên Fig.11 và bảng 7, sự tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *N. meningitidis* trong 20% huyết thanh người tăng lên đáng kể bằng cách bổ sung kháng thể ức chế MASP-2 của người.

2. Hoạt tính diệt khuẩn trong huyết thanh trong các loại huyết thanh thiếu hụt bổ thể của người khác nhau

Huyết thanh thiếu hụt bổ thể của người sau đây và huyết thanh đối chứng của người được sử dụng trong thử nghiệm này:

Bảng 8: Mẫu huyết thanh của người được thử nghiệm (như được thể hiện trên Fig.12)

Mẫu	Typ huyết thanh
A	Huyết thanh bình thường của người (NHS)
B	NHS được bất hoạt bằng nhiệt
C	MBL -/-
D	MASP-3 -/- (MASP-1 +)

Lưu ý: Huyết thanh MASP-3 -/- (MASP-1 +) trong mẫu D được lấy từ đối tượng bị hội chứng 3MC, là một thuật ngữ thống nhất cho sự chồng lặp các hội chứng Carnevale, Mingarelli, Malpuech và Michels. Như được mô tả thêm trong Ví dụ 4, các đột biến trong exon 12 của gen MASP-1/3 biểu hiện miền serin proteaza của MASP-3, nhưng không biểu hiện sự loạn chức năng MASP-1. Như được mô tả trong Ví dụ 10, tiền yếu tố D tốt hơn là có mặt trong huyết thanh 3MC, trong khi đó yếu tố D đã được hoạt hóa tốt hơn là có trong huyết thanh bình thường của người.

N. meningitidis nhóm huyết thanh B-MC58 được ủ với các huyết thanh thiếu hụt bổ thể khác nhau của người, mỗi nhóm ở nồng độ huyết thanh bằng 20%, ở nhiệt độ 37°C bằng cách lắc. Các mẫu được lấy ở các thời điểm sau đây: khoảng thời gian

0, 15, 30, 45, 60, 90 và 120 phút, được dàn đều ra và sau đó số lượng cá thể sống được xác định. Huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt được sử dụng làm đối chứng âm.

Kết quả

Fig.12 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL số lượng cá thể sống của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B-MC58 đã được thu hồi ở các thời điểm khác nhau trong mẫu huyết thanh của người được thể hiện trong bảng 8. Như được thể hiện trên Fig.12, huyết thanh WT (NHS) có mức hoạt tính diệt khuẩn cao nhất đối với *N. meningitidis*. Ngược lại, huyết thanh MBL -/- và MASP-3 -/- (đủ MASP-1) của người không có bất kỳ hoạt tính diệt khuẩn nào. Các kết quả này chỉ ra rằng sự tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *N. meningitidis* trong huyết thanh người 20% (thể tích/thể tích) là phụ thuộc vào MASP-3 và MBL. Bảng 9 cung cấp các kết quả của kiểm định Student t đối với Fig.12.

Bảng 9: Các kết quả của kiểm định Student t đối với Fig.12

So sánh	Thời điểm (phút)	Sai khác trung bình (Log)	Có ý nghĩa? P<0,05?	Tóm tắt giá trị P
A so với B	60	-0,8325	Có	***(p<0,0001)
A so với B	90	-1,600	Có	***(p<0,0001)
A so với C	60	-1,1489	Có	***(p<0,0001)
A so với C	90	-1,822	Có	***(p<0,0001)
A so với D	60	-1,323	Có	***(0,0005)
A so với D	90	-2,185	Có	***(p<0,0001)

Tóm lại, các kết quả được thể hiện trên Fig.12 và bảng 9 cho thấy rằng sự tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *N. meningitidis* trong huyết thanh người 20% là phụ thuộc vào MASP-3 và MBL.

3. Sự tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *N. meningitidis* trong huyết thanh chuột nhắt 20% (thể tích/thể tích) thiếu hụt MASP-2, MASP-1/3 hoặc MBL A/C.

Huyết thanh thiếu hụt bổ thể sau đây chuột nhắt và huyết thanh đối chứng chuột nhắt được sử dụng trong thử nghiệm này:

Bảng 10: Các mẫu huyết thanh chuột nhắt được thử nghiệm (như được thể hiện trên Fig.13)

Mẫu	Typ huyết thanh
A	WT
B	MASP-2 -/-
C	MASP-1/3 -/-
D	MBL A/C -/-
E	WT được bất hoạt bằng nhiệt (HIS)

N. meningitidis nhóm huyết thanh B-MC58 được ủ với các huyết thanh của chuột nhắt thiếu hụt bổ thể khác nhau, mỗi nhóm có nồng độ trong huyết thanh bằng 20%, ở nhiệt độ 37°C bằng cách lắc. Các mẫu được lấy ở các thời điểm sau đây: khoảng thời gian 0, 15, 30, 60, 90 và 120 phút, được dàn đều ra và sau đó số lượng cá thể sống được xác định. Huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt được sử dụng làm đối chứng âm.

Kết quả

Fig.13 minh họa bằng đồ thị log cfu/mL của số lượng cá thể sống của *N. meningitidis* nhóm huyết thanh B-MC58 đã được thu hồi ở các thời điểm khác nhau trong các mẫu huyết thanh của chuột nhắt được thể hiện trong bảng 10. Như được thể hiện trên Fig.13, huyết thanh của chuột nhắt MASP-2 -/- có mức hoạt tính diệt khuẩn cao hơn đối với *N. meningitidis* so với huyết thanh WT của chuột nhắt. Ngược lại, huyết thanh MASP-1/3 -/- của chuột nhắt không có bất kỳ hoạt tính diệt khuẩn nào. Ký hiệu "**" dùng để chỉ p=0,0058, ký hiệu "***" dùng để chỉ p=0,001. Bảng 11 cung cấp các kết quả của kiểm định Student t đối với Fig.13.

Bảng 11: Các kết quả của kiểm định Student t đối với Fig.13

So sánh	Thời điểm	Sai khác trung bình (LOG)	Có ý nghĩa? (p<0,05)?	Tóm tắt giá trị P
A so với B	60 phút	0,39	có	** (0,0058)
A so với B	90 phút	0,6741	có	*** (0,001)

Tóm lại, các kết quả trong ví dụ này cho thấy rằng huyết thanh MASP-2 -/- có mức hoạt tính diệt khuẩn cao hơn đối với *N. meningitidis* so với huyết thanh WT và sự tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *N. meningitidis* trong huyết thanh 20% là phụ thuộc vào MASP-3 và MBL.

Ví dụ 4

Ví dụ này mô tả một loạt các thử nghiệm được tiến hành để xác định cơ chế chống lại sự lây nhiễm *N. meningitidis* phụ thuộc vào MASP-3 được quan sát thấy ở chuột nhắt MASP-2 KO, như được mô tả trong các ví dụ từ 1 đến 3.

Cơ sở lý luận

Để xác định cơ chế chống lại sự lây nhiễm *N. meningitidis* phụ thuộc vào MASP-3 được quan sát thấy trong chuột nhắt MASP-2 KO (được mô tả trong các ví dụ từ 1 đến 3 ở trên), một loạt các thử nghiệm được tiến hành như sau.

1. Chuột nhắt thiếu hụt MASP-1/3 không thiếu hoạt tính chức năng của con đường lectin (còn được đề cập đến là "LEA-2")

Phương pháp

Để xác định xem liệu chuột nhắt thiếu hụt MASP-1/3 có thiếu hụt hoạt tính chức năng của con đường lectin (còn được đề cập đến là LEA-2) hay không, một thử nghiệm được tiến hành để đo động học của hoạt tính C3 convertaza trong huyết tương từ các chủng chuột nhắt thiếu hụt bổ thể khác nhau được thử nghiệm trong các điều kiện thử nghiệm riêng của con đường hoạt hóa lectin (huyết tương 1%), như được mô tả trong tài liệu Schwaeble W. et al., *PNAS* vol 108(18):7523-7528 (2011), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Huyết tương được thử nghiệm từ chuột nhắt WT, C4-/-, MASP-1/3-/-; yếu tố B-/-, và MASP-2-/- như sau.

Để đánh giá sự hoạt hóa của C3, các đĩa vi chuẩn độ được phủ bằng manan (1 µg/lỗ), zymosan (1 µg/lỗ) trong dung dịch đệm phủ (15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$), hoặc các phức hợp miễn dịch, được tạo ra *in situ* bằng cách phủ với

albumin huyết thanh của người (HSA) 1% trong dung dịch đệm phủ sau đó bổ sung huyết thanh kháng HAS của cừu (2 µg/mL) trong TBS (10mM Tris, 140 mM NaCl, độ pH=7,4) với Tween 20 0,05% và 5 mM Ca^{++}. Các đĩa được phong bế bằng 0,1% HSA trong TBS và được rửa ba lần bằng TBS/Tween20/Ca^{++}. Các mẫu huyết tương được pha loãng trong 4 mM barbital, 145 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, độ pH=7,4, được bổ sung vào các đĩa và được ủ trong thời gian 1,5 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi rửa, C3b đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể từ thỏ kháng C3c của người (Dako), sau đó đến kháng thể từ dê kháng IgG của thỏ được liên hợp phosphataza kiềm và p-nitrophenyl phosphat. Kết quả:

Động học của sự hoạt hóa C3 (như được đo bằng sự kết lắng C3b trên các đĩa được phủ manan với huyết thanh 1%) trong điều kiện đặc hiệu con đường lectin được thể hiện trên Fig.14. Không có sự thanh thải C3 được quan sát trong huyết tương MASP-2-/-. C3 được phân cắt trong huyết tương yếu tố B-/- (yếu tố B -/-) bằng một nửa tốc độ phân cắt của huyết tương WT, có thể là do sự mất vòng lặp khuếch đại. Sự trì hoãn đáng kể việc chuyển hóa phụ thuộc vào con đường lectin từ C3 thành C3b được quan sát trong C4-/- ($T_{1/2}$=33 phút) cũng như trong huyết tương thiếu hụt MASP-1/3-/- ($T_{1/2}$=49 phút). Việc trì hoãn sự hoạt hóa C3 này trong huyết tương MASP-1/3-/- đã cho thấy là phụ thuộc vào MASP-1 nhiều hơn so với phụ thuộc vào MASP-3. (Xem tài liệu Takahashi M. et al., *J Immunol* 180:6132-6138 (2008)). Các kết quả này cho thấy rằng chuột nhắt thiếu hụt MASP-1/3 không thiếu hụt hoạt tính chức năng của con đường lectin (còn được đề cập đến là "LEA-2").

2. Tác động của sự thiếu hụt MASP-3 di truyền đối với sự hoạt hóa con đường nhánh

Cơ sở lý luận

Tác động của sự thiếu hụt MASP-3 di truyền đối với sự hoạt hóa con đường nhánh được xác định bằng huyết thanh thử nghiệm của bệnh nhân thiếu hụt MASP-3 bị hội chứng 3MC gây ra bởi đột biến chuyển dịch khung trong exon mã hóa serin proteaza của MASP-3. Hội chứng 3MC là thuật ngữ thống nhất cho sự chồng lặp các hội chứng Carneavale, Mingarelli, Malpuech và Michels. Các rối loạn liệt gen thể

nhiễm sắc định hình hiếm này thể hiện phổ các dấu hiệu tiến triển, bao gồm dị dạng khuôn mặt, khe hở hàm ếch và/hoặc hàm ếch, dính liền sớm khớp sọ, thiểu năng trí tuệ và các dị tật ở bộ phận sinh dục, chân tay và bàng quang-thận. Rooryck et al., *Nature Genetics* 43:197-203 (2011) đã nghiên cứu 11 gia đình bị hội chứng 3MC và đã nhận biết hai gen bị đột biến, COLEC11 và MASP-1. Các đột biến trong gen MASP-1 biểu hiện exon mã hóa miền serin proteaza của MASP-3, nhưng không biểu hiện exon mã hóa serin proteaza của MASP-1, loạn chức năng. Do đó, các bệnh nhân 3MC có các đột biến trong exon mã hóa serin proteaza của MASP-3 này thiếu hụt MASP-3 nhưng đủ trong MASP-1.

Phương pháp

Huyết thanh thiếu hụt MASP-3 thu được từ bệnh nhân 3MC, mẹ và bố của bệnh nhân 3MC (cả hai đều dị hợp tử về alen mang đột biến biểu hiện exon mã hóa miền serin proteaza MASP-3 loạn chức năng), cũng như từ bệnh nhân thiếu hụt C4 (thiếu hụt trong cả hai gen C4 ở người) và đối tượng thiếu hụt MBL. Thử nghiệm con đường nhánh được tiến hành trong các điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (BBS/ Mg^{++}/EGTA, không có Ca^{++}, trong đó BBS = dung dịch nước muối đệm barbital chứa sucroza), như được mô tả trong tài liệu Bitter-Suermann et al., *Eur. J. Immunol* 11:291-295 (1981)), trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan ở nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0,5 đến 25% và sự kết lắng C3b được đo theo thời gian.

Kết quả

Fig.15 minh họa bằng đồ thị mức kết lắng C3b được điều khiển bởi con đường nhánh trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan dưới dạng hàm của nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ các đối tượng thiếu hụt MASP-3, thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL. Như được thể hiện trên Fig.15, huyết thanh của bệnh nhân thiếu hụt MASP-3 có hoạt tính của con đường nhánh (AP) dư ở các nồng độ trong huyết thanh cao (nồng độ trong huyết thanh 25%, 12,5%, 6,25%), nhưng AP_{50} cao hơn đáng kể (tức là, cần 9,8% huyết thanh để đạt được 50% sự kết lắng C3 tối đa).

Fig.16 minh họa bằng đồ thị mức kết lắng C3b được điều khiển bởi con đường nhánh trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan trong các điều kiện đặc hiệu con đường nhánh (đặc hiệu AP) "truyền thống" (tức là, BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) dưới dạng hàm theo thời gian trong mẫu huyết thanh của người 10% thu được từ các đối tượng người thiếu hụt MASP-3, thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL.

Bảng 12 dưới đây tóm tắt các kết quả AP_{50} được thể hiện trên Fig.15 và nửa thời gian để kết lắng C3b được thể hiện trên Fig.16.

Bảng 12: Tóm tắt các kết quả được thể hiện trên các hình vẽ Fig.15 và Fig.16

Typ huyết thanh	AP_{50} (%)	$T_{1/2}$ (phút)
Thiếu hụt MASP-3 (bệnh nhân 3MC)	9,8	37,4
Mẹ của bệnh nhân 3MC (dị hợp tử)	4,3	17,2
Bố của bệnh nhân 3MC (dị hợp tử)	4,3	20,9
Thiếu hụt C4	4,0	11,6
Thiếu hụt MBL	4,8	11,0

Lưu ý: Trong dung dịch đệm BBS/ Mg^{++}/EGTA, tác dụng qua trung gian con đường lectin là thiếu hụt do sự không có mặt của Ca^{++} trong dung dịch đệm này.

Tóm lại, trong các điều kiện của các thử nghiệm này, con đường nhánh được ức chế đáng kể ở bệnh nhân 3MC.

3. Đo sự kết lắng C3b trên manan, zymosan và *S. pneumoniae* D39 trong huyết thanh của chuột nhắt thiếu hụt MASP-2 hoặc MASP-1/3.

Phương pháp

Sự kết lắng C3b được đo trên đĩa vi chuẩn độ được phủ D39 manan, zymosan và *S. pneumoniae* bằng cách sử dụng các nồng độ trong huyết thanh chuột nhắt nằm trong khoảng từ 0% đến 20% thu được từ chuột nhắt MASP-2-/-, MASP-1/3-/- và WT. Thử nghiệm kết lắng C3b được tiến hành trong các điều kiện đặc hiệu con đường nhánh "truyền thống" (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}), hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (tức là, BBS/Mg^{++}/Ca^{++}).

Kết quả

Fig.17A minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b trên đĩa vi chuẩn độ được phủ manan dưới dạng hàm của nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ chuột nhắt WT, thiếu hụt MASP-2, và thiếu hụt MASP-1/3 trong các điều kiện đặc hiệu con đường nhánh truyền thống (tức là, BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}), hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}). Fig.17B minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan dưới dạng hàm của nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh từ chuột nhắt WT, thiếu hụt MASP-2, và thiếu hụt MASP-1/3 trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là, BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}), hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}). Fig.17C minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng của C3b trên đĩa vi chuẩn độ được phủ *S. pneumoniae* D39 dưới dạng hàm của nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh từ chuột nhắt WT, thiếu hụt MASP-2, và thiếu hụt MASP-1/3 trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là, BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}), hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}).

Fig.18A minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm kết lắng C3b trong huyết thanh được pha loãng ở mức cao được tiến hành trên đĩa vi chuẩn độ được phủ manan trong các điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), sử dụng các nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0% lên đến 1,25%. Fig.18B minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm kết lắng C3b được tiến hành trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan trong các điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} mà không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (BBS/EGTA/Mg^{++}/Ca^{++}), sử dụng các nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0% lên đến 1,25%. Fig.18C minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm kết lắng C3b được tiến hành trên đĩa vi chuẩn độ được phủ *S.*

pneumoniae D39 trong các điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} mà không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (BBS/EGTA/Mg^{++}/Ca^{++}), sử dụng nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0% lên đến 1,25%.

Như được thể hiện trong các hình vẽ từ Fig.18A đến Fig.18C, thử nghiệm kết lắng C3b cũng được tiến hành trong các điều kiện đặc hiệu con đường nhánh truyền thống (tức là BBS/EGTA/Mg^{++} mà không có Ca^{++}) hoặc trong các điều kiện sinh lý cho phép hoạt động cả con đường lectin và con đường nhánh (BBS/Mg^{++}/Ca^{++}), sử dụng các phần pha loãng cao hơn nằm trong khoảng từ 0% lên đến 1,25% huyết thanh trên các đĩa được phủ manan (Fig.18A); đĩa được phủ zymosan (Fig.18B) và đĩa được phủ *S. pneumoniae* D39 (Fig.18C). Con đường nhánh giảm đi trong các phần pha loãng huyết thanh cao hơn, vì thế hoạt tính được quan sát thấy trong huyết thanh thiếu hụt MASP-1/3 khi có mặt Ca^{++} là hoạt tính LP qua trung gian MASP-2, và hoạt tính trong huyết thanh thiếu hụt MASP-2 khi có mặt Ca^{++} là sự hoạt hóa dư qua trung gian MASP-1/3 của AP.

Thảo luận

Các kết quả được mô tả trong ví dụ này cho thấy rằng chất ức chế MASP-2 (hoặc MASP-2 KO) tạo ra sự bảo vệ đáng kể khỏi sự lây nhiễm *N. meningitidis* bằng cách thúc đẩy sự hoạt hóa điều khiển bởi con đường nhánh MASP-3. Các kết quả của thử nghiệm vi khuẩn trong huyết thanh của chuột nhắt và thử nghiệm vi khuẩn trong huyết thanh của người còn thể hiện, bằng cách theo dõi hoạt tính diệt khuẩn trong huyết thanh chống lại *N. meningitidis*, rằng hoạt tính diệt khuẩn chống lại *N. meningitidis* không có mặt trong huyết thanh thiếu hụt MBL (huyết thanh thiếu hụt kép MBL A và MBL C của chuột nhắt và huyết thanh thiếu hụt MBL của người).

Fig.1 minh họa cách hiểu mới về con đường lectin và con đường nhánh dựa trên các kết quả được đề cập trong bản mô tả này. Fig.1 phác họa vai trò của LEA-2 trong cả sự opsonin hóa và sự phân hủy. Trong khi MASP-2 là tác nhân khởi phát sự kết lắng C3b "xuôi chiều" (và sự opsonin hóa tổng hợp) trong các thiết lập phụ thuộc

vào lectin về mặt sinh lý (Fig.18A, Fig.18B, Fig.18C), nó cũng có vai trò trong việc phân hủy vi khuẩn nhạy huyết thanh. Như được minh họa trên Fig.1, cơ chế phân tử được đề xuất chịu trách nhiệm về hoạt tính diệt khuẩn gia tăng của huyết thanh/huyết tương thiếu hụt MASP-2 hoặc đã cạn MASP-2 đối với các mầm bệnh nhạy huyết thanh như *N. meningitidis* ở chỗ, đối với sự phân hủy của vi khuẩn, phức hợp nhận diện con đường lectin liên quan đến MASP-1 và MASP-3 phải liên kết tiếp xúc gần với nhau trên bề mặt vi khuẩn, từ đó cho phép MASP-1 thanh thải MASP-3. Trái ngược với MASP-1 và MASP-2, MASP-3 không phải là enzym tự hoạt hóa, mà, trong nhiều trường hợp, cần đến sự hoạt hóa/phân cắt bằng MASP-1 để được biến đổi thành dạng có hoạt tính enzym của nó.

Như cũng được thể hiện trên Fig.1, MASP-3 đã được hoạt hóa sau đó có thể phân cắt yếu tố B liên kết C3b trên bề mặt mầm bệnh để khởi phát đợt hoạt hóa con đường nhánh bằng cách tạo ra con đường nhánh có hoạt tính enzym C3 và C5 convertaza C3bBb và C3bBb(C3b)n, một cách tương ứng. Phức hợp hoạt hóa con đường lectin mang MASP-2 không có vai trò gì trong việc hoạt hóa của MASP-3 và, khi không có mặt hoặc sau khi cạn kiệt MASP-2, thì tất cả các phức hợp hoạt hóa con đường lectin sẽ được tải bằng MASP-1 hoặc MASP-3. Do đó, khi không có MASP-2, gia tăng đáng kể khả năng rằng trên bề mặt vi trùng, phức hợp hoạt hóa con đường lectin mang MASP-1 và MASP-3 sẽ bắt đầu tiếp xúc gần với nhau, dẫn đến việc nhiều MASP-3 được hoạt hóa hơn và từ đó dẫn đến tốc độ phân cắt qua trung gian MASP-3 của yếu tố B liên kết C3b cao hơn để tạo ra C3 và C5 convertaza của con đường nhánh C3bBb và C3bBb(C3b)n trên bề mặt vi trùng. Điều này dẫn đến sự hoạt hóa của đợt hoạt hóa cuối cùng C5b-C9 mà tạo ra phức hợp tấn công màng, gồm có C5b liên kết bề mặt kết hợp với C6, C5bC6 kết hợp với C7, C5bC6C7 kết hợp với C8, và C5bC6C7C8, dẫn đến polyme hóa C9 mà xen vào cấu trúc bề mặt của vi khuẩn và tạo ra lỗ trong vách vi khuẩn, sẽ dẫn đến tiêu diệt thẩm thấu vi khuẩn hướng đích bổ thể.

Cốt lõi của khái niệm mới này là ở chỗ dữ liệu được đề xuất trong bản mô tả này cho thấy rõ ràng rằng phức hợp hoạt hóa con đường lectin điều khiển hai con đường hoạt hóa riêng biệt, như được minh họa trên Fig.1.

Ví dụ 5

Ví dụ này thể hiện tác dụng ức chế sự thiếu hụt MASP-2 và/hoặc sự thiếu hụt MASP-3 đối với sự phân hủy của các tế bào hồng cầu từ các mẫu máu thu được từ mô hình hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH) của chuột nhắt.

Bối cảnh/cơ sở lý luận

Hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), còn được đề cập đến là hội chứng Marchiafava-Micheli, là bệnh đe dọa sự sống tiềm ẩn mắc phải của máu, được đặc trưng bởi thiếu máu tan máu nội mạch do bổ thể gây ra. Dấu hiệu đặc trưng của PNH là sự tan máu nội mạch qua trung gian bổ thể mạn tính là hậu quả của sự hoạt hóa đã được điều hòa tăng của con đường nhánh của bổ thể do không có mặt chất điều hòa bổ thể CD55 và CD59 trên các hồng cầu PNH, với hemoglobin niệu và thiếu máu sau đó. Lindorfer, M.A., et al., *Blood 115*(11) (2010), Risitano, A.M, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11:528-535 (2011). Thiếu máu trong PNH là do sự phá hủy của tế bào hồng cầu trong dòng máu cơ thể. Các triệu chứng của PNH bao gồm nước tiểu đỏ, do sự xuất hiện của hemoglobin trong nước tiểu, đau lưng, mệt mỏi, thở ngắn và chứng huyết khối. PNH có thể tự phát triển, được đề cập đến là "PNH nguyên phát" hoặc trong ngữ cảnh các rối loạn tủy xương khác như thiếu máu không tái tạo, được đề cập đến là "PNH thứ phát". Việc điều trị PNH bao gồm truyền máu đối với thiếu máu, chống đông máu đối với chứng huyết khối và sử dụng kháng thể đơn dòng eculizumab (Soliris®), bảo vệ tế bào máu chống lại sự phá hủy miễn dịch bằng cách ức chế hệ thống bổ thể (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med. 350*(6):552-9 (2004)). Eculizumab (Soliris®) là kháng thể đơn dòng được làm giống như của người mà hướng đích thành phần bổ thể C5, phong bế sự thanh thải của nó bằng C5 convertaza, từ đó ngăn chặn sự sản sinh C5a và sự tổ hợp của MAC. Việc điều trị cho các bệnh nhân mắc PNH bằng eculizumab đã làm giảm sự tan máu nội mạch, như được đo

bằng lactat dehydrogenaza (LDH), dẫn đến việc ổn định hemoglobin và không phụ thuộc vào truyền máu ở khoảng một nửa số bệnh nhân (Hillmen P, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol 11(6) (2011)). Trong khi gần như tất cả các bệnh nhân trải qua liệu pháp với eculizumab đạt được các mức LDH bình thường hoặc gần như bình thường (do sự kiểm soát tan máu nội mạch), chỉ khoảng một phần ba số bệnh nhân đạt đến trị số hemoglobin khoảng 11gr/dL, và các bệnh nhân còn lại trên eculizumab tiếp tục biểu hiện sự thiếu máu từ vừa phải đến nghiêm trọng (tức là, phụ thuộc vào việc truyền máu), ở các tỷ lệ gần bằng nhau (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Như được mô tả trong tài liệu Risitano et al., Mini-Reviews in *Medicinal Chemistry* 11:528-535 (2011), đã chứng minh được rằng các bệnh nhân mắc PNH trên eculizumab chứa mảnh C3 liên kết với phần đáng kể của các hồng cầu PNH của chúng (trong khi các bệnh nhân không được điều trị không có), dẫn đến kết luận rằng mảnh C3 liên kết màng làm việc dưới dạng opsonin trên các hồng cầu PNH, dẫn đến sự mắc kẹt của chúng trong các tế bào lưới nội mô thông qua các thụ thể C3 đặc hiệu và sự tan máu ngoại mạch sau đó. Do đó, các chiến lược trị liệu ngoài sử dụng eculizumab là cần thiết cho các bệnh nhân phát triển chứng tan máu ngoại mạch qua trung gian mảnh C3 do họ tiếp tục cần truyền tế bào hồng cầu.

Ví dụ này mô tả phương pháp để đánh giá tác dụng của huyết thanh thiếu hụt MASP-3 và MASP-2 đối với sự phân hủy của tế bào hồng cầu từ các mẫu máu thu được từ mô hình PNH của chuột nhắt và thể hiện hiệu quả của sự ức chế MASP-2 và/hoặc sự ức chế MASP-3 trong việc điều trị cho các đối tượng mắc PNH, và cũng hỗ trợ việc sử dụng các chất ức chế của MASP-2 và/hoặc các chất ức chế của MASP-3 (bao gồm các chất ức chế MASP-2/MASP-3 hai đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép) trong việc cải thiện các tác động của chứng tan máu ngoại mạch qua trung gian mảnh C3 ở các đối tượng PNH trải qua liệu pháp điều trị bằng chất ức chế C5 như eculizumab.

Phương pháp

Mô hình động vật PNH

Các mẫu máu được thu từ chuột nhắt hướng đích gen có các thiếu hụt của chuột nhắt thiếu hụt Crry và C3 (Crry/C3-/-) và chuột nhắt thiếu hụt CD55/CD59. Các con chuột nhắt này thiếu các chất điều hòa bổ thể bề mặt tương ứng trên các hồng cầu của chúng và các hồng cầu này, do đó, mẫn cảm với sự tự phân bổ thể tự phát như là các tế bào máu của người PNH.

Để làm nhạy các hồng cầu này nhiều hơn, các tế bào này được sử dụng có phủ và không phủ bằng manan và sau đó được thử nghiệm đối với sự tan máu trong huyết tương WT C56/BL6, huyết tương không có MBL, huyết tương MASP-2 -/-, huyết tương MASP-1/3 -/-, NHS ở người, huyết tương MBL -/- ở người, và NHS được điều trị bằng kháng thể MASP-2 ở người.

1. Thử nghiệm về sự tan máu của hồng cầu chuột nhắt thiếu hụt kép Crry/C3 và CD55/CD59 trong huyết thanh thiếu hụt/rút cạn MASP-2 và các đối chứng

Ngày 1. Chuẩn bị chuột RBC (± phủ manan)

Vật liệu bao gồm: máu tươi của chuột nhắt, BBS/$Mg^{++/}$ Ca^{++} (axit barbituric 4,4 mM, natri barbiton 1,8 mM, NaCl 145 mM, độ pH=7,4, Mg^{++} 5mM, Ca^{++} 5mM), crom clorua, $CrCl_3 \cdot 6H_20$ (0,5mg/mL trong BBS/Mg^{++}/Ca^{++}) và manan, 100 µg/mL trong BBS/Mg^{++}/Ca^{++}.

Máu toàn phần (2 mL) được quay xuống trong thời gian từ 1 đến 2 phút ở 2000xg trong máy ly tâm lạnh ở nhiệt độ 4˚C. Huyết tương và lớp váng máu ly tâm được hút ra. Sau đó mẫu này được rửa 3 lần bằng cách tạo huyền phù lại viên kết RBC trong 2 mL BBS đá băng/gelatin/Mg^{++}/Ca^{++} và lặp lại bước ly tâm. Sau khi rửa lần ba, viên kết được tạo huyền phù lại trong 4 mL BBS/Mg^{++}/Ca^{++}. Phần phân ước 2mL của RBC được để riêng ra làm mẫu đối chứng không được phủ. Bổ sung 2 mL CrCl3 và 2 mL manan vào 2mL còn lại và mẫu này được ủ bằng cách trộn nhẹ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 7,5 mL BBS/gelatin/Mg^{++}/Ca^{++}. Mẫu này được quay xuống như ở trên, được tạo huyền phù lại trong 2 mL BBS/gelatin/Mg^{++}/Ca^{++} và được rửa thêm hai lần như ở trên, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ 4˚C.

Ngày 2. Thử nghiệm sự tan máu

Vật liệu bao gồm BBS/gelatin/Mg^{++}/Ca^{++} (như trên), huyết thanh thử nghiệm, các đĩa đáy phẳng và đáy tròn 96 lỗ và quang phổ kế mà đọc đĩa 96 lỗ ở bước sóng 410-414 nm.

Nồng độ của RBC được xác định đầu tiên và các tế bào được điều chỉnh đến nồng độ 10^9/mL, và được bảo quản ở nồng độ này. Trước khi sử dụng, các tế bào này được pha loãng trong dung dịch đệm thử nghiệm đến nồng độ 10^8/mL, và sau đó 100 µL mỗi lỗ được sử dụng. Sự tan máu được đo ở bước sóng 410-414 nm (cho phép độ nhạy lớn hơn so với 541nm). Các phần pha loãng huyết thanh thử nghiệm được chuẩn bị trong BBS đá băng/gelatin/Mg^{++}/Ca^{++}. 100µL mỗi phần pha loãng huyết thanh được hút bằng pipet vào đĩa đáy tròn. 100 µL chế phẩm RBC đã được pha loãng thích hợp được bổ sung vào (tức là, 10^8/mL), được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian khoảng 1 giờ, và quan sát sự phân hủy. (Các đĩa có thể được chụp ảnh ở thời điểm này). Đĩa này sau đó được quay xuống ở tốc độ tối đa trong thời gian 5 phút. 100 µL pha lỏng được hút, được chuyển sang đĩa đáy phẳng, và OD được ghi lại ở bước sóng 410-414 nm. Các viên kết RBC được giữ lại (các viên kết này sau đó có thể được phân hủy bằng nước để thu được kết quả đảo ngược).

Thử nghiệm #1

Máu tươi được thu từ chuột nhắt thiếu hụt kép CD55/CD59 và máu của chuột nhắt thiếu hụt kép Crry/C3 và hồng cầu được chuẩn bị như được mô tả chi tiết trong phương pháp chuẩn nêu trên. Các tế bào được tách và một nửa số tế bào này được phủ bằng manan và một nửa còn lại được giữ lại không được xử lý, điều chỉnh nồng độ cuối cùng đến 10^8/mL, trong đó 100 µL được sử dụng trong thử nghiệm sự tan máu, được tiến hành như được mô tả trên đây.

Các kết quả của thử nghiệm #1: Con đường lectin có liên quan đến sự phân hủy của hồng cầu trong mô hình động vật PNH

Trong thử nghiệm đầu tiên, xác định được rằng hồng cầu WT của chuột nhắt không được phủ không được phân hủy trong huyết thanh của chuột nhắt bất kỳ. Cũng

xác định được rằng hồng cầu chuột nhắt Crry-/- được phủ manan được phân hủy chậm (nhiều hơn 3 giờ ở 37 độ) trong huyết thanh của chuột nhắt WT, nhưng chúng không được phân hủy trong huyết thanh không có MBL. (Dữ liệu không được thể hiện).

Xác định được rằng hồng cầu chuột nhắt Crry-/- được phủ manan được phân hủy nhanh trong huyết thanh của người nhưng không được phân hủy trong NHS được bất hoạt bằng nhiệt. Quan trọng là, hồng cầu chuột nhắt Crry-/- được phủ manan được phân hủy trong NHS được pha loãng đến 1/640 (tức là, tất cả các phần pha loãng 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 và 1/640 đều được phân hủy). (Dữ liệu không được thể hiện). Trong phần pha loãng này, con đường nhánh không làm việc (hoạt tính chức năng AP được làm giảm đáng kể dưới 8% nồng độ trong huyết thanh).

Các kết luận từ thử nghiệm #1

Hồng cầu chuột nhắt Crry-/- được phủ manan được phân hủy rất tốt trong huyết thanh của người được pha loãng ở mức độ cao bằng MBL nhưng không cao khi không có MBL. Sự phân hủy hiệu quả ở mọi nồng độ trong huyết thanh được thử nghiệm hàm ý rằng con đường nhánh không liên quan hoặc cần thiết đối với sự phân hủy này. Việc huyết thanh của chuột nhắt và huyết thanh của người thiếu hụt MBL không có khả năng phân hủy hồng cầu chuột nhắt Crry-/- được phủ manan cho thấy rằng con đường cổ điển cũng không có vai trò gì trong việc phân hủy quan sát được. Do phân tử nhận diện con đường lectin được yêu cầu (tức là, MBL), sự phân hủy này được điều tiết bởi con đường lectin.

Thử nghiệm #2

Máu tươi được thu từ chuột nhắt thiếu hụt kép Crry/C3 và CD55/CD59 và hồng cầu chuột nhắt Crry-/- được phủ manan được phân tích trong thử nghiệm tan máu như được mô tả trên đây khi có mặt huyết thanh của người sau đây: MASP-3 -/-; không có MBL; WT; NHS được điều trị trước bằng kháng thể MASP-2 ở người; và NHS được bất hoạt bằng nhiệt làm đối chứng.Các kết quả của thử nghiệm #2: chất ức chế

MASP-2 và sự thiếu hụt MASP-3 ngăn chặn sự phân hủy trong hồng cầu trong mô hình động vật PNH

Với hồng cầu chuột nhắt Crry-/- được phủ manan, NHS được ủ trong các dung dịch pha loãng được pha loãng đến 1/640 (tức là, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 và 1/640), huyết thanh MBL-/- của người, huyết thanh thiếu hụt MASP-3 của người (từ bệnh nhân 3MC), và NHS được điều trị trước bằng MASP-2 mAb, và NHS được bất hoạt bằng nhiệt làm đối chứng.

Đĩa vi chuẩn độ ELISA được quay xuống và hồng cầu không được phân hủy được gom ở đáy của đĩa có lỗ tròn. Phần dịch nổi trên bề mặt của mỗi lỗ được gom và lượng hemoglobin được giải phóng khỏi hồng cầu đã được phân hủy được đo bằng cách đọc OD415 nm trong máy đọc ELISA.

Quan sát được rằng huyết thanh MASP-3-/- hoàn toàn không phân hủy hồng cầu chuột nhắt được phủ bằng manan. Trong NHS được bất hoạt bằng nhiệt đối chứng (đối chứng âm), như mong đợi, không quan sát thấy có sự phân hủy nào. Huyết thanh của người MBL-/- phân hủy hồng cầu chuột nhắt được phủ bằng manan ở các phần pha loãng 1/8 và 1/16. NHS được điều trị từ trước bằng kháng thể MASP-2 phân hủy hồng cầu chuột nhắt được phủ bằng manan ở các phần pha loãng 1/8 và 1/16 còn huyết thanh người WT phân hủy hồng cầu chuột nhắt được phủ bằng manan xuống đến các phần pha loãng bằng 1/32.

Fig.19 minh họa bằng đồ thị sự tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt đã phân hủy (Crry/C3-/-) vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột được phủ manan bởi huyết thanh của người trên một phạm vi các phần pha loãng huyết thanh trong huyết thanh từ MASP-3-/-, (HI) NHS được bất hoạt bằng nhiệt, MBL-/-, NHS được điều trị từ trước bằng kháng thể MASP-2, và đối chứng NHS.

Fig.20 minh họa bằng đồ thị sự tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt đã phân hủy (Crry/C3-/-) vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột được phủ manan bởi huyết

thanh của người trên một phạm vi nồng độ trong huyết thanh ở huyết thanh từ MASP-3-/-, (HI) NHS được bất hoạt bằng nhiệt, MBL-/-, NHS được điều trị từ trước bằng kháng thể MASP-2, và đối chứng NHS.

Từ các kết quả được thể hiện trên Fig.19 và Fig.20, nhận thấy được rằng việc ức chế MASP-3 sẽ ngăn chặn sự phân hủy qua trung gian bổ thể bất kỳ của hồng cầu đã được làm nhạy với sự bảo vệ thiếu hụt khỏi sự hoạt hóa bổ thể tự rụng. Sự ức chế MASP-2 bằng kháng thể MASP-2 làm dịch chuyển đáng kể CH_{50} và bảo vệ đến mức độ nhất định, nhưng sự ức chế MASP-3 có hiệu quả hơn.

Thử nghiệm #3

Hồng cầu chuột nhắt Crry-/- không được phủ thu được từ máu tươi của chuột nhắt thiếu hụt kép Crry/C3 và CD55/CD59 được phân tích trong thử nghiệm tan máu như được mô tả trên đây khi có mặt các huyết thanh sau đây: MASP-3-/-; MBL-/-; WT; NHS được điều trị từ trước bằng kháng thể MASP-2 của người, và NHS được bất hoạt bằng nhiệt làm đối chứng.

Kết quả

Fig.21 minh họa bằng đồ thị sự tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt WT đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột không được phủ trên một phạm vi nồng độ trong huyết thanh ở huyết thanh của người từ bệnh nhân 3MC (MASP-3-/-), (HI) NHS được bất hoạt bằng nhiệt, MBL-/-, NHS được điều trị từ trước bằng kháng thể MASP-2, và đối chứng NHS. Như được thể hiện trên Fig.21 và được tóm tắt trong bảng 13, nhận thấy được rằng việc ức chế MASP-3 làm ức chế sự phân hủy qua trung gian bổ thể của hồng cầu chuột nhắt WT không được làm nhạy.

Fig.22 minh họa bằng đồ thị sự tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu chuột nhắt đã phân hủy (CD55/59 -/-) vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu chuột không được phủ bằng huyết thanh của người trên một phạm vi nồng độ trong huyết thanh ở huyết thanh của người từ NHS, MBL-/-, NHS được bất hoạt bằng nhiệt (HI) được điều trị từ trước

bằng kháng thể MASP-2, và đối chứng NHS. Như được thể hiện trên Fig.22 và được tóm tắt trong bảng 13, nhận thấy được rằng việc ức chế MASP-2 có sự bảo vệ đến mức độ giới hạn.

Bảng 13: Các giá trị CH_{50} được biểu hiện dưới dạng nồng độ trong huyết thanh

Huyết thanh	WT	CD55/59 -/-
Bệnh nhân 3MC	Không phân hủy	Không phân hủy
NHS được bất hoạt bằng nhiệt	Không phân hủy	Không phân hủy
Chất cho MBL AO/XX (thiếu hụt MBL)	7,2%	2,1%
NHS + kháng thể MASP-2	5,4%	1,5%
NHS	3,1%	0,73%

Lưu ý: "CH_{50}" là thời điểm tại đó sự tan máu qua trung gian bổ thể đạt đến 50%. Tóm lại, các kết quả trong ví dụ này cho thấy rằng việc ức chế MASP-3 ngăn chặn sự phân hủy của bổ thể bất kỳ các hồng cầu được làm nhạy và không được làm nhạy với sự bảo vệ thiếu hụt khỏi tự rụng sự hoạt hóa bổ thể. Sự ức chế MASP-2 cũng có sự bảo vệ đến một mức độ nhất định. Do đó, chất ức chế MASP-2 và chất ức chế MASP-3 một mình hoặc kết hợp (tức là, được sử dụng đồng thời, được sử dụng tuần tự) hoặc chất ức chế hai đặc hiệu hoặc kép MASP-2/MASP-3 có thể được sử dụng để điều trị cho các đối tượng mắc PNH, và cũng có thể được sử dụng để cải thiện (tức là, ức chế, ngăn chặn hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của) sự tan máu ngoại mạch ở các bệnh nhân mắc PNH trải qua việc điều trị bằng chất ức chế C5 như eculizumab (Soliris®).

Ví dụ 6

Ví dụ này mô tả thử nghiệm sự tan máu thử nghiệm hồng cầu thỏ được phủ manan đối với sự phân hủy khi có mặt huyết thanh của chuột nhắt WT hoặc MASP-1/3-/-.

Phương pháp

1. Thử nghiệm sự tan máu của thỏ RBC (được phủ manan) trong huyết thanh của chuột nhắt thiếu hụt MASP-1/3 và huyết thanh đối chứng WT

Ngày 1. Chuẩn bị thỏ RBC

Vật liệu bao gồm: máu tươi của thỏ, BBS/ Mg^{++}/Ca^{++} (axit barbituric 4,4 mM, natri barbiton 1,8 mM, NaCl 145 mM, độ pH=7,4, Mg^{++} 5 mM, Ca^{++} 5 mM), BBS/ Mg^{++}/Ca^{++} với gelatin 0,1%, crom clorua được chứa trong dung dịch đệm; tức là, $CrCl_3.6\ H_2O$ (0,5 mg /mL trong BBS/ Mg^{++}/Ca^{++}) và manan, 100 µg/mL trong BBS/ Mg^{++}/Ca^{++}.

1. Máu toàn phần của thỏ (2 mL) được chia vào hai ống eppendorf 1,5 mL và được ly tâm trong khoảng thời gian 3 phút ở 8000 vòng/phút (khoảng 5,9 rcf) trong thiết bị ly tâm lạnh bằng ống eppendorf ở nhiệt độ 4°C. Viên kết RBC được rửa ba lần sau khi tạo huyền phù lại trong đá băng BBS/Mg^{++}/Ca^{++}. Sau khi rửa lần ba, viên kết này được tạo huyền phù lại trong 4 mL BBS/Mg^{++}/Ca^{++}. Hai mL của phần phân ước này được bổ sung vào ống falcon 15 mL để sử dụng làm đối chứng không được phủ. 2 mL còn lại của phần phân ước RBC được pha loãng trong 2 mL dung dịch đệm $CrCl_3$, 2 mL dung dịch manan được bổ sung vào và huyền phù được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút bằng cách trộn nhẹ. Phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 7,5 mL BBS/0,1% gelatin/Mg^{++}/Ca^{++} vào hỗn hợp. Hồng cầu được tạo viên kết và RBC được rửa hai lần bằng BBS/0,1% gelatin/Mg^{++}/Ca^{++} như được mô tả ở trên. Huyền phù RBC được bảo quản trong BBS/0,1% gelatin/ Mg^{++}/Ca^{++} ở nhiệt độ 4°C.

2. 100 µL RBC đã được tạo huyền phù được pha loãng bằng 1,4 mL nước và được quay xuống ở 8000 vòng/phút (khoảng 5,9 rcf) trong thời gian 3 phút và OD của phần dịch nổi trên bề mặt được điều chỉnh đến 0,7 ở bước sóng 541nm (OD bằng 0,7 ở bước sóng 541nm tương ứng với khoảng 10^9 hồng cầu/mL).

3. RBC đã được tạo huyền phù lại được pha loãng bằng BBS/0,1% gelatin/Mg^{++}/Ca^{++} đến nồng độ của 10^8 /mL.

4. Các dung dịch pha loãng của huyết thanh thử nghiệm được chuẩn bị trong BBS đá băng/gelatin/ Mg^{++}/Ca^{++} và 100 µL của mỗi dung dịch pha loãng huyết thanh được hút bằng pipet vào lỗ tương ứng của đĩa đáy tròn. 100 µL RBC đã được

pha loãng thích hợp (108/mL) được bổ sung vào mỗi lỗ. Là đối chứng cho sự phân hủy hoàn toàn, nước đã tinh chế (100 µL) được trộn với RBC đã được pha loãng (100 µL) để gây ra sự phân hủy 100%, trong khi BBS/0,1% gelatin/ Mg^{++}/Ca^{++} mà không có huyết thanh (100 µL) được sử dụng làm đối chứng âm. Đĩa này sau đó được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C.

5. Đĩa đáy tròn được ly tâm ở 3250 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt từ mỗi lỗ (100 µL) được chuyển vào các lỗ tương ứng của đĩa đáy phẳng và OD được đọc trong máy đọc ELISA ở bước sóng 415-490nm. Các kết quả được báo cáo dưới dạng tỷ số giữa OD ở bước sóng 415 nm và OD ở bước sóng 49,0 nm.

Kết quả

Fig.23 minh họa bằng đồ thị sự tan máu (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu thỏ đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) của hồng cầu thỏ được phủ manan bởi huyết thanh của chuột nhắt trên một phạm vi nồng độ trong huyết thanh ở huyết thanh từ đối chứng MASP-1/3-/- và WT. Như được thể hiện trên Fig.23, cho thấy rằng ức chế MASP-3 ngăn chặn sự phân hủy qua trung gian bổ thể của hồng cầu thỏ WT được phủ manan. Các kết quả này còn hỗ trợ việc sử dụng chất ức chế MASP-3 để điều trị một hoặc nhiều khía cạnh của PNH như được mô tả trong Ví dụ 5. Ví dụ 7

Ví dụ này mô tả sự tạo ra các kháng thể đơn dòng MASP-1 và MASP-3 sử dụng hệ thống *in vitro* bao gồm dòng tế bào DT40 được cải biến, DTLacO.

Bối cảnh/cơ sở lý luận

Các kháng thể kháng lại MASP-1 của người và MASP-3 được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống *in vitro* bao gồm dòng tế bào DT40 được cải biến, DTLacO, cho phép sự kích thích đảo ngược sự đa dạng hóa của polypeptit cụ thể, như còn được mô tả trong WO2009029315 và US2010093033. DT40 là dòng tế bào B của gà được biết đến là làm đột biến chủ yếu các gen globulin miễn dịch (Ig) chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của nó trong môi trường nuôi cấy. Tương tự các tế bào B khác, việc gây đột

biến cơ định này hướng đích các đột biến đến vùng V của các gen Ig, và vì thế, các CDR của các phân tử kháng thể được biểu hiện. Sự gây đột biến cơ định trong các tế bào DT40 diễn ra bằng cách chuyển đổi gen sử dụng dưới dạng các trình tự cho một dãy các đoạn gen V không có chức năng (các gen pseudo-V; ψV) được đặt ở vị trí ngược chiều của mỗi vùng V chức năng. Việc làm khuyết vùng ψV trước đây đã được chứng minh là gây ra sự chuyển đổi trong cơ chế đa dạng hóa từ sự chuyển đổi gen sang siêu đột biến soma, cơ chế này thường được quan sát thấy trong các tế bào B của người. Dòng u lympho tế bào B của gà DT40 đã cho thấy là điểm khởi đầu hứa hẹn đối với quá trình tiến hóa của kháng thể *ex vivo* (Cumbers, S.J. *et al. Nat Biotechnol* 20, 1129-1134 (2002); Seo, H. *et al. Nat Biotechnol* 23, 731-735 (2005)). Các tế bào DT40 tăng sinh mạnh mẽ trong môi trường nuôi cấy, với thời gian gấp đôi 8-10 giờ (so với 20-24 giờ đối với dòng tế bào B của người), và chúng hỗ trợ rất hiệu quả sự hướng đích gen tương đồng (Buerstedde, J.M. *et al. Embo J* 9, 921-927 (1990)). Các tế bào DT40 tạo ra tính đa dạng trình tự vùng V có tiềm năng lớn trong khi chúng có thể tiếp cận hai con đường sinh lý riêng biệt để đa dạng hóa, chuyển đổi gen và siêu đột biến soma, tạo ra các đột biến được tạo khuôn và không được tạo khuôn, một cách tương ứng (Maizels, N. *Annu Rev Genet* 39, 23-46 (2005)). Các globulin miễn dịch (Ig) chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đã được đa dạng hóa được biểu hiện dưới dạng IgM được biểu hiện trên bề mặt tế bào. IgM bề mặt có dạng hóa trị hai, tương tự về mặt cấu trúc với phân tử IgG. Các tế bào biểu hiện IgM với tính đặc hiệu đối với kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách liên kết các phiên bản được biểu hiện trên màng hoặc được cố định dễ tan của kháng nguyên. Tuy nhiên, tính hữu dụng của các tế bào DT40 đối với quá trình tiến hóa của kháng thể bị hạn chế trong thực tế do - như trong các dòng tế bào được biến nạp khác - sự đa dạng hóa xuất hiện ở tốc độ sinh lý thấp hơn 1%.

Trong hệ thống được sử dụng trong ví dụ này, như được mô tả trong WO2009029315 và US2010093033, các tế bào DT40 được xử lý kỹ thuật để gia tăng tốc độ đa dạng hóa của gen Ig mà không làm mất khả năng cải biến di truyền hơn nữa hoặc tiềm năng đối với cả chuyển đổi gen và siêu đột biến soma để góp phần vào

quá trình gây đột biến. Hai cải biến chủ chốt đối với DT40 được thực hiện để làm tăng tốc độ đa dạng hóa và, do đó, cả độ phức tạp của các tính đặc hiệu liên kết trong thư viện tế bào. Thứ nhất, sự đa dạng hóa của gen Ig là dưới sự kiểm soát của mạng lưới điều hòa chất kìm hãm/hoạt động của lactoza *E. coli* tiềm năng. Multime bao gồm khoảng 100 đoạn lặp được polyme hóa của chất hoạt động lactoza *E. coli* tiềm năng (PolyLacO) được cài ngược chiều với các gen IgH và Igλ được biểu hiện và được bố trí lại bằng cách hướng đích gen tương đồng. Các yếu tố điều hòa được dung hợp với protein kìm hãm lactoza (LacI) sau đó có thể được giới hạn ở thành phần điều hòa LacO để điều hòa sự đa dạng hóa, tận dụng ái lực cao ($k_D=10^{-14}$ M) của chất kìm hãm lactoza đối với ADN có hoạt tính. Các tế bào DT40 PolyLacO-λ_R, trong đó PolyLacO chỉ được tích hợp ở Igλ, thể hiện sự tăng tốc độ đa dạng hóa của gen Ig gấp 5 lần so với các tế bào DT40 bố mẹ trước thao tác xử lý kỹ thuật bất kỳ (Cummings, W.J. *et al. PLoS Biol* 5, e246 (2007)). Sự đa dạng hóa còn được làm tăng cường trong các tế bào được xử lý kỹ thuật để mang PolyLacO hướng đích đến cả hai gen Igλ và IgH ("DTLacO"). Các tế bào DTLacO được nhận thấy là có tốc độ đa dạng hóa tăng cao từ 2,5 đến 9,2 lần so với 2,8% đặc trưng cho dòng DT40 PolyLacO-λ_R LacI-HP1 bố mẹ. Vì thế, việc hướng đích các thành phần PolyLacO đến cả các gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng làm gia tăng sự đa dạng hóa 21,7 lần so với dòng tế bào gốc DT40. Việc giới hạn các yếu tố điều hòa ở locus Ig không chỉ làm biến đổi tần suất gây bột biến, mà còn có thể thay đổi cả con đường gây đột biến tạo ra tập hợp lớn hơn của các thay đổi trình tự độc nhất (Cummings et al. 2007; Cummings et al. 2008). Thứ hai, tập hợp đa dạng của các điểm khởi đầu trình tự đối với sự đa dạng hóa của gen Ig được gia tăng yếu tố đã giới hạn được tạo ra. Các điểm khởi đầu trình tự đa dạng này được bổ sung vào DTLacO bằng cách hướng đích các vùng biến đổi chuỗi nặng Ig được bố trí lại, được phân lập từ gà hai tháng tuổi, đến locus của chuỗi nặng. Việc bổ sung các vùng biến đổi chuỗi nặng này tạo ra kho gồm 10^7 điểm khởi đầu mới để đa dạng hóa kháng thể. Việc đưa các điểm khởi đầu mới này vào dòng tế bào DTLacO cho phép nhận biết các dòng vô tính liên kết với một đích cụ thể, và sau đó là sự thuần thục ái lực nhanh bằng các yếu tố giới hạn. Sau khi

thuần thục ái lực, IgG tái tổ hợp thể khảm, có chiều dài đầy đủ được tạo thành bằng cách tách dòng các trình tự biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bố trí lại, được làm thuần thục (VH và Vλ; bao gồm vùng khung của gà và các vùng quyết định tính bổ sung hoặc CDR) thành các vectơ biểu hiện chứa vùng hằng định IgG1 và lamda của người. Các mAb tái tổ hợp này thích hợp cho các ứng dụng *in vitro* và *in vivo*, và chúng hoạt động như điểm khởi đầu để làm giống như của người.

Phương pháp

Chọn lọc để liên kết kháng nguyên MASP-1 và MASP-3

Các phương pháp lựa chọn ban đầu được thực hiện bằng cách liên kết các tập hợp DTLacO được đa dạng hóa bằng cách hướng đích gen đến các hạt được tạo phức với MASP-1 của người (SEQ ID NO:8) và kháng nguyên MASP-3 (SEQ ID NO:2); và các lựa chọn sau đó bằng FACS, sử dụng kháng nguyên dễ tan được đánh dấu huỳnh quang (Cumbers, S.J. *et al. Nat Biotechnol* **20**, 1129-1134 (2002); Seo, H. *et al. Nat Biotechnol* **23**, 731-735 (2005). Do trình tự axit amin đã được bảo toàn trong chuỗi alpha được phân chia giữa MASP-1 và MASP-3 (được thể hiện trên Fig.2), và các trình tự chuỗi beta riêng biệt (được thể hiện trên Fig.2), các sàng lọc song song, riêng rẽ đối với các chất liên kết với MASP-1 và MASP-3 được tiến hành để nhận biết MAb đặc hiệu MASP-1, MAb đặc hiệu MASP-3 và cả các mAb có khả năng liên kết với cả MASP-1 và MASP-3 (đặc hiệu kép). Hai dạng kháng nguyên được sử dụng để lựa chọn và sàng lọc các chất liên kết. Đầu tiên, MASP-1 hoặc MASP-3 tái tổ hợp, có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh, đã được dung hợp miền Fc được liên kết với các hạt protein G từ tính Dynal hoặc được sử dụng trong các lựa chọn dựa trên FACS sử dụng kháng thể thứ cấp IgG(Fc) của người kháng được đánh dấu PECy5. Theo một cách khác, các phiên bản tái tổ hợp của protein MASP-1 hoặc protein MASP-3 được đánh dấu trực tiếp bằng Dylight flo và được sử dụng để lựa chọn và sàng lọc.

Liên kết và ái lực

Các kháng thể tái tổ hợp được tạo ra bằng cách tách dòng vùng V được khuếch đại PCR thành vectơ mà hỗ trợ sự biểu hiện của IgG1 của người trong các tế bào

293F (Yabuki et al., *PLoS One,* 7(4):e36032 (2012)). Động học liên kết bão hòa được xác định bằng cách nhuộm các tế bào DTLacO biểu hiện kháng thể liên kết MASP-1 hoặc MASP-3 với các nồng độ khác nhau của kháng nguyên dễ tan được đánh dấu huỳnh quang. Các thử nghiệm chức năng đối với hoạt tính đặc hiệu MASP-3 bao gồm sự kết lắng C3b phụ thuộc vào MASP-3 và sự phân cắt yếu tố D phụ thuộc vào MASP-3 được tiến hành như được mô tả trong các ví dụ 8 và 9, một cách tương ứng. Thử nghiệm chức năng đối với hoạt tính đặc hiệu MASP-1, cụ thể là việc ức chế sự kết lắng C3b phụ thuộc MASP-1 được tiến hành như được mô tả dưới đây.

Kết quả

Nhiều kháng thể liên kết MASP-1 và MASP-3 được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trên đây. Sự liên kết, như được thể hiện bằng phân tích FACS, được mô tả đối với dòng vô tính tiêu biểu M3J5 và M3M1, được phân lập khi sàng lọc đối với các chất liên kết MASP-3.

Fig.24A là biểu đồ FACS về sự liên kết kháng nguyên/kháng thể MASP-3 đối với dòng vô tính DTLacO M3J5. Fig.24B là biểu đồ FACS về sự liên kết kháng nguyên/kháng thể MASP-3 đối với dòng vô tính DTLacO M3M1. Trên Fig.24A và Fig.24B, đường cong đậm màu xám là đối chứng âm được nhuộm IgG1, và đường cong đậm màu đen là nhuộm MASP-3.

Fig.25 minh họa bằng đồ thị đường cong liên kết bão hòa của dòng vô tính M3J5 (Dòng vô tính 5) đối với kháng nguyên MASP-3. Như được thể hiện trên Fig.25, ái lực liên kết biểu kiến của kháng thể M3J5 đối với MASP-3 là khoảng 31 nM.

Việc phân tích trình tự các dòng vô tính đã được nhận biết được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn. Tất cả các dòng vô tính đều được so sánh với các trình tự VH và VL (DT40) phổ biến và so sánh với nhau. Các trình tự đối với hai dòng vô tính được đề cập ở trên, M3J5 và M3M1 được bố trí thẳng hàng với hai dòng vô tính tiêu biểu bổ sung, D14 và 1E10, được nhận biết trong các lần sàng lọc

đối với các mảnh CCP1-CCP2-SP của MASP-1 và MASP-3, một cách tương ứng. D14 và 1E10 liên kết các vùng chung với cả MASP-1 và MASP-3.

Fig.26A là sự sắp xếp thẳng hàng trình tự axit amin của các vùng VH của M3J5, M3M1, D14 và 1E10 với trình tự DT40 VH của gà.

Fig.26B là sắp xếp thẳng hàng trình tự axit amin của các vùng VL của M3J5, M3M1, D14 và 1E10 với trình tự DT40 VL của gà.

Trình tự axit amin VH và VL của mỗi dòng vô tính được nêu dưới đây.

Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)

Fig.26A thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng axit amin của các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) đối với DTLacO bố mẹ (SEQ ID NO:300), các dòng vô tính liên kết MASP-3 M3J5 (SEQ ID NO:301), và M3M1 (SEQ ID NO:302), và các dòng vô tính liên kết kép MASP-1/MASP-3 D14 (SEQ ID NO:306), và 1E10 (SEQ ID NO:308). Các CDR theo Kabat trong các trình tự VH dưới đây được định vị ở các vị trí axit amin sau đây: H1:aa 31-35; H2:aa 50-62; và H3:aa 95-102.

Các CDR theo Chothia trong các trình tự VH dưới đây được định vị ở các vị trí axit amin sau đây: H1: aa 26-32; H2: aa 52-56; và H3: aa 95-101.DTLacO VH bố mẹ: (SEQ ID NO:300)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNAMGWVRQAPGKGLEWVA
GIDDDGSGTRYAPAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYYCTKC
AYSSGCDYEGGYIDAWGHGTEVIVSS

Dòng vô tính M3J5 VH: (SEQ ID NO:301)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTFSSYAMGWMRQAPGKGLEYVA
GIRSDGSFTLYATAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYFCTRSG
NVGDIDAWGHGTEVIVSSDòng vô tính M3M1 VH: (SEQ ID NO:302)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFDFSSYQMNWIRQAPGKGLEFVAA
INRFGNSTGHGAAVKGRVTISRDDGQSTVRLQLSNLRAEDTATYYCAKGV

YGYCGSYSCCGVDTIDAWGHGTEVIVSSDòng vô tính D14 VH: (SEQ ID NO:306)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA GIYKSGAGTNYAPAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKT TGSGCSSGYRAEYIDAWGHGTEVIVSSDòng vô tính 1E10 VH: (SEQ ID NO:308)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYDMVWVRQAPGKGLEFVA GISRNDGRYTEYGSAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCAR DAGGSAYWFDAGQIDAWGHGTEVIVSSTrình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)

Fig.26B thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng axit amin trong các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) đối với DTLacO bố mẹ (SEQ ID NO:303) và các dòng vô tính liên kết MASP-3 M3J5 (SEQ ID NO:304), và M3M1 (SEQ ID NO:305), và các dòng vô tính liên kết kép MASP-1/MASP-3 D14 (SEQ ID NO:307) và 1E10 (SEQ ID NO:309). DTLacO VL bố mẹ: (SEQ ID NO:303)

ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYD NDKRPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGT TLTVL

Dòng vô tính M3J5 VL: (SEQ ID NO:304)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGYSGYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIY YNNKRPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGA GTTLTVL

Dòng vô tính M3M1 VL: (SEQ ID NO:305)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYY NNKRPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGT TLTVL

Dòng vô tính D14 VL: (SEQ ID NO:307)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYY
NNKRPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGT
TLTVL

Dòng vô tính 1E10 VL: (SEQ ID NO:309)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYY
NNKRPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGT
TLTVL

Thử nghiệm chức năng LEA-2 (phụ thuộc MASP-2)

MASP-1 góp phần vào LEA-2 thông qua khả năng hoạt hóa MASP-2 của nó (xem Fig.1). Thử nghiệm MBL sàng lọc hệ thống bổ thể Wieslab® (Euro Diagnostica, Malmö, Thụy Điển) đo sự kết lắng của C5b-C9 trong các điều kiện mà tách sự hoạt hóa phụ thuộc vào LEA-2 (tức là, hoạt tính của con đường lectin truyền thống). Thử nghiệm này được tiến hành theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất với dòng vô tính 1E10 tiêu biểu được thử nghiệm dưới dạng nồng độ cuối cùng bằng 400 nM.

Fig.27 là biểu đồ cột thể hiện hoạt tính ức chế mAb 1E10 so với huyết thanh dương tính được cung cấp với kit thử nghiệm, cũng như kháng thể đối chứng isotyp. Như được thể hiện trên Fig.27, mAb 1E10 thể hiện việc ức chế một phần sự hoạt hóa phụ thuộc vào LEA-2 (thông qua ức chế sự hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-1 của MASP-2), trong khi đó kháng thể đối chứng isotyp thì không. Sự ức chế mạnh hơn sẽ đạt được bằng cách tiếp tục làm thuần thục ái lực cho kháng thể này để liên kết MASP-1 bằng cách sử dụng các yếu tố giới hạn trong hệ thống DTLacO.

Thử nghiệm chức năng LEA-1 (phụ thuộc MASP-3) đối với các mAb tiêu biểu được mô tả dưới đây trong các ví dụ 8 và 9.

Tóm tắt kết quả

Các kết quả trên cho thấy rằng nền DTLacO cho phép phát hiện *ex vivo* nhanh các kháng thể đơn dòng MASP-1 và MASP-3 với các đặc tính ức chế đối với LEA-

1 (như được thể hiện dưới đây trong các ví dụ 8 và 9) và đối với LEA-2 (như được thể hiện trong ví dụ này).

Ví dụ 8

Phân tích con đường bổ thể trong huyết thanh 3MC bằng *S. aureus*

Bối cảnh/cơ sở lý luận

Xác định được rằng MASP-3 không được hoạt hóa thông qua sự tiếp xúc với manan, zymosan A hoặc N-axetyl xystein pha lỏng không được cố định khi có hoặc không có huyết thanh bình thường của người. Tuy nhiên, xác định được rằng MASP-3 tái tổ hợp và tự nhiên được hoạt hóa trên bề mặt của được bất hoạt bằng nhiệt *S. aureus* với sự có mặt và không có mặt huyết thanh bình thường của người (NHS) hoặc huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt (HIS) (dữ liệu không được thể hiện). Cũng xác định được rằng sự kết lắng C3b xuất hiện trên bề mặt của *S. aureus* khi có mặt huyết thanh bình thường của người, và mà sự kết lắng có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng. Do đó, con đường nhánh (AP) đáp ứng với *S. aureus* được đo như được mô tả trong ví dụ này bằng cách đánh giá sự góp phần của MASP-3 vào LEA-1.

Phương pháp

MASP-3 tái tổ hợp: trình tự polynucleotit mã hóa MASP-3 tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ của người, phiên bản hoạt hóa serin proteaza (SP) được cắt cụt của MASP-3 (CCP1-CCP2-SP), và dạng được bất hoạt SP của MASP-3 (S679A) được tách dòng thành vectơ biểu hiện pTriEx7 của động vật có vú (Invivogen). Cấu trúc biểu hiện tạo thành mã hóa MASP-3 chiều dài đầy đủ hoặc mảnh CCP1-CCP2-SP với đuôi Strep đầu tận amino và đuôi His_6 đầu tận carboxy. Các cấu trúc biểu hiện này được chuyển nhiễm vào các tế bào Freestyle 293-F hoặc Expi293F (Invitrogen) theo các phương pháp chuẩn được cung cấp bởi nhà sản xuất. Sau từ ba đến bốn ngày nuôi cấy trong CO_2 5% ở nhiệt độ 37°C, các protein tái tổ hợp được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ái lực Streptactin.

MASP-1 tái tổ hợp: các dạng CCP1-CCP2-SP có chiều dài đầy đủ hoặc được cắt cụt của MASP-1 tái tổ hợp có hoặc không có R504Q làm ổn định (Dobo et al., *J. Immunol* 183:1207, 2009) hoặc các đột biến bất hoạt SP (S646A) và mang đuôi Step đầu tận amino và đuôi His6 đầu tận carboxy được tạo ra như được mô tả đối với MASP-3 tái tổ hợp ở trên.

1. Sự kết lắng C3b và sự phân cắt yếu tố B trên *S. aureus* trong huyết thanh (người) 3MC

Thử nghiệm ban đầu được tiến hành để chứng minh rằng thử nghiệm đếm tế bào theo dòng có khả năng phát hiện sự có hoặc không có sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP (AP-C3b) như sau. Năm phần trăm các huyết thanh sau đây: huyết thanh bình thường của người, huyết thanh của người được rút cạn yếu tố B (yếu tố B), huyết thanh của người cạn yếu tố D và huyết thanh của người được rút cạn properdin (thu được từ Complement Technology, Tyler, Texas, Mỹ) được trộn với kháng thể thử nghiệm trong dung dịch đệm Mg^{++}/EGTA hoặc EDTA ở nhiệt độ 4°C qua đêm. *S. aureus* đã bị tiêu diệt bằng nhiệt (10^8/phản ứng) được bổ sung vào mỗi hỗn hợp đến tổng thể tích bằng 100 µL và được quay ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 40 phút. Vi khuẩn được rửa trong dung dịch đệm rửa, viên kết vi khuẩn được tạo huyền phù lại trong dung dịch rửa và 80 µL phần phân ước của mỗi mẫu được phân tích về sự kết lắng C3b trên bề mặt vi khuẩn, mà được phát hiện ra bằng kháng thể kháng C3c của người (Dako, UK) bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Các kết quả của sự phát hiện C3b bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng được thể hiện trên Fig.28A. Như được thể hiện trên Fig.28A, ô 1, huyết thanh bình thường của người khi có EDTA, mà đã biết là bất hoạt AP, không quan sát thấy sự kết lắng C3b nào (đối chứng âm). Trong huyết thanh bình thường của người được điều trị bằng Mg^{++}/EGTA, chỉ con đường bổ thể không phụ thuộc vào lectin là có thể có chức năng. Trong ô 2, dung dịch đệm Mg^{++}/EGTA được sử dụng, do đó AP có hoạt tính, và sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP được quan sát thấy (đối chứng dương). Như được thể hiện trong các ô 3, 4 và 5, trong huyết thanh cạn yếu tố B, cạn

yếu tố D và cạn properdin, một cách tương ứng, không sự kết lắng C3b được điều khiển bởi con đường nhánh nào được quan sát thấy, như mong đợi. Các kết quả này cho thấy rằng thử nghiệm này có khả năng phát hiện sự kết lắng của C3b phụ thuộc AP.

Sự kết lắng C3b dựa vào thử nghiệm *S. aureus* được tiến hành như được mô tả trên đây để đánh giá khả năng của MASP-3 tái tổ hợp trong việc khôi phục AP (LEA-1) trong huyết thanh 3MC của người, mà thiếu hụt trong MASP-3 (Rooryck C, et al., *Nat Genet.* 43(3):197-203 (2011)). Các tổ hợp sau đây của các chất phản ứng được thử nghiệm.

1. 5% huyết thanh bình thường của người +EDTA

2. 5% huyết thanh bình thường của người +Mg/EGTA

3. 5% huyết thanh 3MC (MASP-$3^{-/-}$) của người + Mg^{++}/EGTA

4. 5% huyết thanh 3MC (MASP-$3^{-/-}$) của người + Mg^{++}/EGTA cộng với rMASP-3 có chiều dài đầy đủ có hoạt tính

5. 5% huyết thanh 3MC (MASP-$3^{-/-}$) của người + Mg^{++}/EGTA cộng với rMASP-3 có hoạt tính được cắt cụt (CCP1/CCP2/SP)

6. 5% huyết thanh 3MC (MASP-$3^{-/-}$) của người + Mg^{++}/EGTA cộng với rMASP-3 bất hoạt (S679A)

7. 5% huyết thanh 3MC (MASP-$3^{-/-}$) của người + Mg^{++}/EGTA cộng với rMASP-1 có chiều dài đầy đủ có hoạt tính

Các hỗn hợp khác nhau chứa 5% huyết thanh và protein tái tổ hợp (5 µg mỗi loại) như được thể hiện ở trên được ủ trong các điều kiện đệm đặc trưng (dung dịch đệm Mg^{++} /EGTA hoặc EDTA) ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau khi ủ qua đêm, 10^8 *S. aureus* đã bị tiêu diệt bằng nhiệt được bổ sung vào mỗi hỗn hợp trên tổng thể tích bằng 100 µL và được quay ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 40 phút. Vi khuẩn được rửa và được tạo huyền phù lại trong dung dịch rửa và 80 µl phần phân ước của mỗi mẫu được phân tích về sự kết lắng C3b bằng FACS. 20 µL phần phân ước còn lại

của mỗi mẫu được sử dụng để đo sự phân cắt yếu tố B bằng phương pháp thẩm tách Tây sử dụng kháng thể kháng yếu tố B như được mô tả dưới đây.

Các kết quả về việc phát hiện C3b bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng được thể hiện trên Fig.28B. Số trên các ô tương ứng với số được ký hiệu đối với mỗi tổ hợp chất phản ứng được minh họa ở trên. Đối chứng âm (ô 1) và đối chứng dương (ô 2) thể hiện sự không có và có kết lắng C3b, như mong đợi. Ô 3 cho thấy rằng sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP không có trong huyết thanh 3MC. Các ô 4 và 5 cho thấy rằng cả rMASP-3 chiều dài đầy đủ có hoạt tính (ô 4) và rMASP-3 có hoạt tính (CCP1-CCP2-SP) (ô 5) đều khôi phục sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trong huyết thanh 3MC. Ô 6 cho thấy rằng rMASP-3 bất hoạt (S679A) không khôi phục sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trong huyết thanh 3MC. Ô 7 cho thấy rằng rMASP-1 không khôi phục sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trong huyết thanh 3MC.

Kết hợp lại, các kết quả này cho thấy rằng MASP-3 là cần thiết cho sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên *S. aureus* trong huyết thanh của người.

Sự hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-3 của yếu tố B

Để phân tích sự hoạt hóa phụ thuộc vào MASP-3 của yếu tố B, các hỗn hợp khác nhau chứa 5% huyết thanh (huyết thanh bình thường của người hoặc huyết thanh của bệnh nhân 3MC) và protein tái tổ hợp như được thể hiện ở trên được phân tích như được mô tả ở trên. Từ mỗi hỗn hợp phản ứng, 20 µL được loại bỏ và được bổ sung vào dung dịch đệm nạp mẫu protein. Mẫu được gia nhiệt ở nhiệt độ 70°C trong thời gian 10 phút và được nạp lên trên gel SDS-PAGE. Phân tích thẩm tách Tây được thực hiện sử dụng kháng thể đa dòng yếu tố B (R&D Systems). Sự hoạt hóa của yếu tố B là rõ ràng bởi sự hình thành của hai sản phẩm phân cắt có phân tử lượng thấp hơn (Bb và Ba) thu được từ protein tiền yếu tố B có phân tử lượng cao hơn.

Fig.29 thể hiện các kết quả của phân tích thẩm tách Tây để xác định sự phân cắt yếu tố B đáp ứng với *S. aureus* trong huyết thanh 3MC khi có hoặc không có

rMASP-3. Như được thể hiện trong làn 1, huyết thanh bình thường của người khi có EDTA (đối chứng âm) thể hiện sự phân cắt yếu tố B rất ít so với huyết thanh bình thường của người khi có Mg^{++}/EGTA, được thể hiện trong làn 2 (đối chứng dương). Như được thể hiện trong làn 3, huyết thanh 3MC thể hiện sự phân cắt yếu tố B rất ít khi có mặt Mg^{++}/EGTA. Tuy nhiên, như được thể hiện trong làn 4, sự phân cắt yếu tố B được khôi phục bằng cách bổ sung và ủ sơ bộ protein MASP-3 tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ (5 µg) vào huyết thanh 3MC.

Thử nghiệm để xác định tác dụng của rMASP-3 đối với tiền yếu tố D trong phân cắt yếu tố B/C3(H_2O)

Thử nghiệm sau đây được tiến hành để xác định yêu cầu tối thiểu đối với sự hoạt hóa/sự phân cắt phụ thuộc vào MASP-3 của yếu tố B.

C3(H_2O) (200ng), yếu tố B sinh chất đã được tinh chế (20 µg), tiền yếu tố D tái tổ hợp (200 ng) và MASP-3 tái tổ hợp của người (200 ng) được trộn cùng nhau trong các hỗn hợp khác nhau (như được thể hiện trên Fig.30), trên tổng thể tích bằng 100 µL trong BBS/Ca^{++}/ Mg^{++} và được ủ ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 30 phút. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung 25 uL dung dịch đệm tra mẫu điện di (loading dye) SDS chứa 2-mercaptoethanol 5%. Sau khi sôi ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 10 phút trong khi lắc (300 vòng/phút), hỗn hợp này được quay xuống ở 1400 vòng/phút trong thời gian 5 phút và 20 uL phần dịch nổi trên bề mặt được nạp và được tách trên SDS gel 10%. Gel này được nhuộm bằng Coomassie màu xanh rực rỡ.

Kết quả

Fig.30 thể hiện SDS-PAGE gel được nhuộm Comassie trong đó sự phân cắt yếu tố B được phân tích. Như được thể hiện trong làn 1, sự phân cắt yếu tố B là tối ưu nhất khi có C3, MASP-3 và tiền yếu tố D. Như được thể hiện trong làn 2, C3 được yêu cầu tuyệt đối; tuy nhiên, như được thể hiện trong các làn 4 và 5, MASP-3 hoặc tiền yếu tố D có khả năng điều tiết sự phân cắt yếu tố B, miễn là C3 có mặt.

Phân tích khả năng của các MASP-3 mAb trong việc ức chế sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP phụ thuộc vào MASP-3

Như được mô tả trong ví dụ này, chứng minh được rằng MASP-3 là cần thiết để kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên *S. aureus* trong huyết thanh của người. Do đó, thử nghiệm sau đây được tiến hành để xác định xem nếu MASP-3 mAb tiêu biểu được nhận biết như được mô tả trong Ví dụ 7, có thể ức chế hoạt tính của MASP-3. Mảnh protein (CCP1-CCP2-SP) MASP-3 tái tổ hợp, có hoạt tính (250 ng) được ủ trước với mAb, mAb1A5 đối chứng isotyp (đối chứng thu được từ nền DTLacO mà không liên kết với MASP-3 hoặc MASP-1), hoặc mAbD14 (liên kết với MASP-3) ở ba nồng độ khác nhau (0,5, 2 và 4 μM) trong thời gian 1 giờ trên nước đá. Hỗn hợp enzym-mAb được tiếp xúc với 5% huyết thanh 3MC (thiếu hụt MASP-3) và $5x10^7$ bị tiêu diệt bằng nhiệt *S. aureus* trong thể tích phản ứng cuối cùng bằng 50 μL. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút, và sau đó được nhuộm để phát hiện sự kết lắng của C3b. Các tế bào vi khuẩn đã nhuộm được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng.

Fig.31 minh họa bằng đồ thị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của việc nhuộm C3b thu được từ ba kháng thể được vẽ đồ thị dưới dạng hàm của nồng độ mAb trong huyết thanh 3MC với sự có mặt của rMASP-3. Như được thể hiện trên Fig.31, mAbD14 thể hiện việc ức chế sự kết lắng C3b theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Ngược lại, cả hai mAb đối chứng đều ức chế sự kết lắng C3b. Các kết quả này cho thấy rằng mAbD14 có thể ức chế sự kết lắng C3b phụ thuộc vào MASP-3. Hoạt tính ức chế được cải thiện đối với mAbD14 được mong đợi sau khi tiếp tục làm thuần thục ái lực cho kháng thể này để liên kết MASP-3 bằng cách sử dụng các yếu tố giới hạn trong hệ thống DTLacO.

Tóm tắt kết quả

Tóm lại, các kết quả trong ví dụ này thể hiện sự phát hiện rõ ràng AP trong huyết thanh thiếu hụt MASP-3. Vì thế, MASP-3 thể hiện sự đóng góp quan trọng vào AP, sử dụng sự hoạt hóa yếu tố B và sự kết lắng C3b làm điểm cuối chức năng. Ngoài

ra, ngoài MASP-3 tái tổ hợp, chức năng, bao gồm phần đầu tận C có hoạt tính xúc tác của MASP-3 sửa chữa thiếu sót ở sự hoạt hóa yếu tố B và sự kết lắng C3b trong huyết thanh từ bệnh nhân 3MC. Ngược lại, như cũng được thể hiện trong ví dụ này, việc bổ sung kháng thể MASP-3 (ví dụ, mAbD14) trong huyết thanh 3MC với rMASP-3 làm ức chế sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP. Vai trò trực tiếp của MASP-3 đối với sự hoạt hóa yếu tố B, và theo đó là AP, được thể hiện thông qua quan sát rằng MASP-3 tái tổ hợp, cùng với C3, là đủ để hoạt hóa tái tổ hợp yếu tố B.

Ví dụ 9

Ví dụ này cho thấy rằng MASP-1 và MASP-3 hoạt hóa yếu tố D.

Phương pháp

MASP-1 và MASP-3 tái tổ hợp được thử nghiệm về khả năng của chúng trong việc phân cắt hai phiên bản tái tổ hợp khác nhau của tiền yếu tố D. Phiên bản thứ nhất (tiền yếu tố D-His) thiếu đuôi đầu tận N, nhưng có đuôi His đầu tận C. Vì thế, phiên bản này của tiền yếu tố D chứa tiền peptit 5 axit amin mà được loại bỏ bằng cách phân cắt trong khi hoạt hóa. Phiên bản thứ hai (ST-tiền yếu tố D-His) có trình tự Strep-TagII trên đầu tận N, vì thế làm tăng mảnh đầu tận N đã được phân cắt lên 15 axit amin. ST-tiền yếu tố D cũng chứa đuôi His_6 tại đầu tận C. Chiều dài tăng của tiền peptit của ST-tiền yếu tố D-His cải thiện sự phân giải giữa dạng được phân cắt và không được phân cắt bằng SDS-PAGE so với sự phân giải có thể có với dạng tiền yếu tố D-HIS.

Các protein MASP-1 hoặc MASP-3 tái tổ hợp (2 µg) được bổ sung vào các cơ chất tiền yếu tố D-His hoặc ST-tiền yếu tố D-His (100 ng) và được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37˚C. Hỗn hợp phản ứng được điện di trên Bis-Tris gel 12% để phân giải tiền yếu tố D và sản phẩm phân cắt yếu tố D có hoạt tính. Các protein đã được phân giải được chuyển vào màng PVDF và được phân tích bằng thẩm tách Tây nhờ sự phát hiện bằng kháng thể yếu tố D được biotin hóa (R&D Systems).

Kết quả

Fig.32 thể hiện sự phân tích thẩm tách Tây của sự phân cắt cơ chất tiền yếu tố D.

Bảng 14: Làn mô tả sự thẩm tách Tây được thể hiện trên Fig.32

Điều kiện thử nghiệm	Làn 1	Làn 2	Làn 3	Làn 4	Làn 5
Tiền yếu tố D	+	+	+	+	+
rMASP-3 (chiều dài đầy đủ)	-	+	_	_	_
rMASP-3a (S679A)	-	-	+	-	-
rMASP-1A (S646A)	-	-	-	+	-
rMASP-1 (CCP-1-CCP2-SP)	-	-	-	-	+

Như được thể hiện trên Fig.32, chỉ có MASP-3 chiều dài đầy đủ (làn 2) và mảnh MASP-1 CCP1-CCP2-SP) (làn 5) ST-tiền yếu tố D-His_6 được phân cắt. MASP-3 chiều dài đầy đủ bất hoạt bằng xúc tác (S679A; làn 3) và MASP-1 (S646A; làn 3) không thể phân cắt cơ chất. Các kết quả giống nhau được thu bằng tiền yếu tố D-His_6 polypeptit (không được thể hiện). So sánh lượng mol dư của MASP-1 (CCP1-CCP2-SP) so với MASP-3 gợi ý rằng MASP-3 là chất xúc tác cho sự phân cắt tiền yếu tố D hiệu quả hơn so với MASP-1, ít nhất trong các điều kiện được mô tả trong bản mô tả này.

Các kết luận: Cả MASP-1 và MASP-3 đều có khả năng phân cắt và hoạt hóa yếu tố D. Hoạt tính này kết nối trực tiếp LEA-1 với sự hoạt hóa của AP. Cụ thể hơn, sự hoạt hóa của yếu tố D bằng MASP-1 hoặc MASP-3 sẽ dẫn đến sự hoạt hóa yếu tố B, sự kết lắng C3b, và có thể là sự opsonin hóa và/hoặc phân hủy.

Thử nghiệm ức chế sự phân cắt phụ thuộc vào MASP-3 của tiền yếu tố D bằng kháng thể MASP-3

Thử nghiệm được tiến hành để xác định tác dụng ức chế của các mAb MASP-3 và MASP-1 tiêu biểu, được nhận biết như được mô tả trong Ví dụ 7, đối đến sự phân cắt yếu tố D phụ thuộc vào MASP-3 như sau. Protein MASP-3 tái tổ hợp, có hoạt tính (80 ng) được ủ trước với 1 µg của mAb D14, M3M1 tiêu biểu và kháng thể đối chứng (mà liên kết đặc hiệu với MASP-1, nhưng không liên kết với MASP-3) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút. Tiền yếu tố D với đuôi Strep đầu tận N (ST-tiền yếu tố D-His, 70 ng) được bổ sung vào và hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ

37°C trong thời gian 75 phút. Các phản ứng sau đó được điện di, thẩm tách và nhuộm bằng kháng yếu tố D như được mô tả trên đây.

Fig.33 là thẩm tách Tây thể hiện hoạt tính ức chế một phần của mAb D14 và M3M1 so với phản ứng đối chứng chỉ chứa MASP-3 và ST-tiền yếu tố D-His (không có mAb; làn 1), cũng như phản ứng đối chứng chứa mAb thu được từ thư viện DTLacO mà liên kết với MASP-1, nhưng không liên kết với MASP-3 (làn 4). Như được thể hiện trên Fig.33, khi không có kháng thể ức chế, MASP-3 phân cắt khoảng 50% tiền yếu tố D thành yếu tố D (làn 1). Kháng thể đặc hiệu MASP-1 đối chứng (làn 4) không thay đổi tỷ số giữa tiền yếu tố D và yếu tố D. Ngược lại, như được thể hiện trong các làn 2 và 3, cả mAb D14 và mAb M3M1 đều ức chế sự phân cắt phụ thuộc vào MASP-3 của tiền yếu tố D thành yếu tố D, dẫn đến sự giảm yếu tố D được tạo ra.

Kết luận

Các kết quả này cho thấy rằng MASP-3 mAb D14 và M3M1 có khả năng ức chế sự phân cắt yếu tố D phụ thuộc vào MASP-3. Hoạt tính ức chế cải thiện đối với mAbD14 và mAb M3M1 được mong đợi sau khi tiếp tục làm thuần thục ái lực cho các kháng thể này để liên kết MASP-3 bằng cách sử dụng các yếu tố giới hạn trong hệ thống DTLacO.

Ví dụ 10

Ví dụ này cho thấy rằng sự thiếu hụt MASP-3 ngăn chặn sự phân hủy qua trung gian bổ thể của hồng cầu thỏ WT được phủ manan.

Bối cảnh/cơ sở lý luận

Như được mô tả trong các ví dụ 5 và 6 ở đây, tác dụng của huyết thanh thiếu hụt MASP-2 và MASP-3 đối với sự phân hủy của các tế bào hồng cầu từ các mẫu máu thu được từ mô hình PNH ở chuột nhắt thể hiện hiệu quả ức chế MASP-2 và/hoặc ức chế MASP-3 để điều trị cho các đối tượng mắc PNH, và cũng hỗ trợ việc sử dụng các chất ức chế MASP-2 và/hoặc các chất ức chế MASP-3 (bao gồm các

chất ức chế MASP-2/MASP-3 đặc hiệu hai hoặc đặc hiệu kép) để cải thiện các tác động tan máu ngoại mạch qua trung gian mảnh C3 ở các đối tượng PNH trải qua liệu pháp bằng chất ức chế C5 như eculizumab.

Như được mô tả trong ví dụ này, thử nghiệm sự kết lắng C3b và thử nghiệm sự tan máu được tiến hành trong huyết thanh thiếu hụt MASP-3 từ các bệnh nhân 3MC bổ sung, xác nhận các kết quả thu được trong các ví dụ 5 và 6. Ngoài ra, các thử nghiệm được tiến hành cho thấy rằng việc bổ sung rMASP-3 vào huyết thanh 3MC có khả năng khôi phục sự kết lắng C3b và hoạt tính tan máu.

Phương pháp

Huyết thanh thiếu hụt MASP-3 thu được từ ba bệnh nhân 3MC khác nhau như sau:

Bệnh nhân 3MC 1: chứa alen mang đột biến biểu hiện exon mã hóa miền serin proteaza loạn chức năng MASP-3, được cung cấp cùng với mẹ và bố của bệnh nhân 3MC (cả hai đều dị hợp tử về alen mang đột biến biểu hiện exon mã hóa miền serin proteaza loạn chức năng MASP-3),

Bệnh nhân 3MC 2: có đột biến C1489T (H497Y) trong exon 12 của MASP-1, exon mà mã hóa miền serin proteaza của MASP-3, tạo ra MASP-3 không chức năng, còn protein MASP-1 có chức năng.

Bệnh nhân 3MC 3: có thiếu sót được xác nhận trong gen MASP-1, tạo ra MASP-3 không chức năng và protein MASP-1 không chức năng.

Thử nghiệm #1: thử nghiệm kết lắng C3b

Thử nghiệm AP được tiến hành trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (BBS/ Mg^{++}/EGTA, không có Ca^{++}, trong đó BBS = dung dịch nước muối đệm barbital chứa sucroza), như được mô tả trong tài liệu Bitter-Suermann et al., *Eur. J. Immunol* 11:291-295 (1981)), trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan ở nồng độ trong huyết thanh nằm trong khoảng từ 0,5 đến 25% và sự kết lắng C3b được đo theo thời gian.

Kết quả

Fig.34 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan dưới dạng hàm của nồng độ trong huyết thanh trong các mẫu huyết thanh thu được từ đối tượng thiếu hụt MASP-3 (3MC), thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL. Như được thể hiện trên Fig.34, và được tóm tắt dưới đây trong bảng 15, huyết thanh bệnh nhân thiếu hụt MASP-3 từ bệnh nhân 2 và bệnh nhân 3 có hoạt tính AP dư ở các nồng độ cao (các nồng độ trong huyết thanh 25%, 12,5%, 6,25%), nhưng AP_{50} cao hơn đáng kể (tức là, cần 8,2% và 12,3% huyết thanh để đạt được 50% mức kết lắng C3 tối đa).

Fig.35A minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan trong điều kiện đặc hiệu AP "truyền thống" (tức là, BBS/EGTA/Mg^{++} không có Ca^{++}) dưới dạng hàm theo thời gian trong mẫu huyết thanh của người 10% thu được từ đối tượng người thiếu hụt MASP-3, thiếu hụt C4 và thiếu hụt MBL.

Bảng 15 dưới đây tóm tắt các kết quả AP_{50} được thể hiện trên Fig.34 và nửa thời gian để kết lắng C3b được thể hiện trên Fig.35A.

Bảng 15: Tóm tắt các kết quả được thể hiện trên các hình vẽ Fig.34 và Fig.35A

Typ huyết thanh	AP_{50} (%)	$T_{1/2}$ (phút)
Bình thường	4,5	26,3
Thiếu hụt MBL (MBL-/-)	5,7	27,5
Thiếu hụt C4 (C4-/-)	5,1	28,6
3MC (Bệnh nhân 3)	8,2	58,2
3MC (Bệnh nhân 2)	12,3	72,4

Lưu ý: Trong dung dịch đệm BBS/Mg^{++}/EGTA, các tác dụng qua trung gian con đường lectin là thiếu hụt do không có mặt Ca^{++} trong dung dịch đệm này. Thử nghiệm #2: Phân tích sự phân cắt tiền yếu tố D trong huyết thanh của bệnh nhân 3MC bằng thẩm tách Tây

Phương pháp: Huyết thanh thu được từ bệnh nhân 3MC #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)) và từ bệnh nhân 3MC #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)). Huyết thanh của bệnh nhân, cùng với huyết thanh từ các đối tượng cho bình thường (W), được

tách riêng bằng gel SDS-polyacrylamit và các protein đã phân giải được thẩm tách vào màng polyvinylidin florua. Tiền yếu tố D của người (25.040 Da) và/hoặc yếu tố D thuần thục (24.405 Da) được phát hiện ra bằng kháng thể đặc hiệu yếu tố D của người.

Kết quả: Các kết quả của thẩm tách Tây được thể hiện trên Fig.35B. Như được thể hiện trên Fig.35B, trong huyết thanh từ các đối tượng cho bình thường (W), kháng thể yếu tố D phát hiện protein có kích thước nhất quán với yếu tố D thuần thục (24.405 Da). Như cũng được thể hiện trên Fig.35B, kháng thể yếu tố D phát hiện protein lớn hơn không đáng kể trong huyết thanh từ bệnh nhân 3MC #2 (P2) và bệnh nhân 3MC #3 (P3), nhất quán với sự có mặt của tiền yếu tố D (25.040 Da) trong các bệnh nhân 3MC này. Thử nghiệm #3: Thử nghiệm bổ thể Wieslab với huyết thanh của bệnh nhân 3MC

Phương pháp: Huyết thanh thu được từ bệnh nhân 3MC #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)) và từ bệnh nhân 3MC #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)) cũng được thử nghiệm về hoạt tính của con đường truyền thống, lectin và nhánh bằng cách sử dụng màn hình hệ thống bổ thể Wieslab Complement System Screen (Euro-Diagnostica, Malmö, Thụy Điển) theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Huyết thanh bình thường của người được thử nghiệm song song làm đối chứng.

Kết quả: Fig.35C minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm con đường cổ điển, con đường lectin và con đường nhánh Weislab với huyết tương thu được từ bệnh nhân 3MC #2, bệnh nhân 3MC #3, và huyết thanh bình thường của người. Như được thể hiện trên Fig.35C, trong các điều kiện của thử nghiệm Wieslab, các con đường cổ điển, nhánh và MBL (lectin) đều có chức năng trong huyết thanh bình thường của người. Trong huyết thanh từ bệnh nhân 3MC #2 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (+/+)), con đường cổ điển và con đường lectin có chức năng, tuy nhiên không có hoạt tính của con đường nhánh có thể phát hiện được. Trong huyết thanh từ bệnh nhân 3MC #3 (MASP-3 (-/-), MASP-1 (-/-)), con đường cổ điển có chức năng, tuy nhiên không có hoạt tính của con đường lectin có thể phát hiện được và không có hoạt tính của con đường nhánh có thể phát hiện được.

Kết quả trên Fig.35B và Fig.35C còn củng cố cho ý hiểu của tác giả sáng chế về vai trò của MASP-1 và MASP-3 trong con đường LEA-1 và LEA-2. Cụ thể, việc không có mặt con đường nhánh với con đường lectin có chức năng gần như đầy đủ trong huyết thanh từ bệnh nhân 2, người mà chỉ thiếu MASP-3, khẳng định rằng MASP-3 là cần thiết cho sự hoạt hóa của con đường nhánh. Huyết thanh từ bệnh nhân 3, người mà thiếu cả MASP-1 và MASP-3, đã mất khả năng để hoạt hóa con đường lectin cũng như con đường nhánh. Kết quả này cũng khẳng định việc cần phải có MASP-1 đối với con đường LEA-2 chức năng, và là nhất quán với Ví dụ 7, và tài liệu này cho thấy rằng MASP-1 hoạt hóa MASP-2. Việc không có khả năng rõ ràng của cả hai huyết thanh trong việc hoạt hóa tiền yếu tố D cũng nhất quán với dữ liệu được mô tả trong Ví dụ 9 mà cho thấy rằng MASP-3 phân cắt tiền yếu tố D. Các quan sát này là nhất quán với con đường LEA-1 và LEA-2 như được nêu bằng sơ đồ trên Fig.1.

Thử nghiệm #4: Thử nghiệm sự tan máu thử nghiệm hồng cầu thỏ được phủ manan đối với sự phân hủy khi có mặt huyết thanh 3MC hoặc bình thường của người (khi không có Ca^{++})

Phương pháp

Chuẩn bị RBC của thỏ khi không có Ca^{++} (tức là, bằng cách sử dụng EGTA)

Máu toàn phần của thỏ (2 mL) được chia vào hai ống eppendorf 1,5 mL và được ly tâm trong khoảng thời gian 3 phút ở 8000 vòng/phút (khoảng 5,9 rcf) trong thiết bị ly tâm lạnh bằng ống eppendorf ở nhiệt độ 4°C. Viên kết RBC được rửa ba lần sau khi tạo huyền phù lại trong BBS đá băng/ Mg^{++}/Ca^{++} (axit barbituric 4,4 mM, natri barbiton 1,8 mM, NaCl 145 mM, độ pH=7,4, Mg^{++} 5 mM, Ca^{++} 5 mM). Sau khi rửa lần ba, viên kết được tạo huyền phù lại trong 4 mL BBS/ Mg^{++}/Ca^{++}. Hồng cầu được tạo viên kết và RBC được rửa bằng BBS/0,1% gelatin/Mg^{++}/Ca^{++} như được mô tả ở trên. Huyền phù RBC được bảo quản trong BBS/0,1% gelatin/ Mg^{++}/Ca^{++} ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, 100 µL RBC đã được tạo huyền phù được pha loãng với 1,4 mL nước và được quay xuống ở 8000 vòng/phút (khoảng 5,9 rcf) trong thời gian 3 phút

và OD của phần dịch nổi trên bề mặt được điều chỉnh đến 0,7 ở bước sóng 541nm (OD bằng 0,7 ở bước sóng 541nm tương ứng với khoảng 10^9 hồng cầu/ml). Sau đó, 1 mL RBC đã được tạo huyền phù lại ở OD 0,7 được bổ sung vào 9 ml BBS/Mg^{++}/EGTA để đạt được nồng độ bằng 10^8 hồng cầu/ml. Các dung dịch pha loãng của huyết thanh thử nghiệm hoặc huyết tương được chuẩn bị trong BBS đá băng, Mg^{++}, EGTA và 100 µL mỗi dung dịch pha loãng huyết thanh hoặc huyết tương được hút bằng pipet vào lỗ tương ứng của đĩa đáy tròn. 100 µL RBC đã được pha loãng thích hợp (10^8 hồng cầu/ml) được bổ sung vào mỗi lỗ. Nước nano được sử dụng để tạo ra đối chứng dương (phân hủy 100%), trong khi phần pha loãng với BBS/Mg^{++}/EGTA mà không có huyết thanh hoặc huyết tương được sử dụng làm đối chứng âm. Đĩa này sau đó được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Đĩa đáy tròn được quay xuống ở 3750 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Sau đó, 100 µL phần dịch nổi trên bề mặt từ mỗi lỗ được chuyển vào các lỗ tương ứng của đĩa đáy phẳng và OD được đọc ở bước sóng 415-490 nm.

Kết quả

Fig.36 minh họa bằng đồ thị tỷ lệ tan máu tính theo phần trăm (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu thỏ đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) hồng cầu thỏ được phủ manan trên một phạm vi nồng độ trong huyết thanh ở huyết thanh từ các đối tượng bình thường và từ hai bệnh nhân 3MC (Bệnh nhân 2 và bệnh nhân 3), được đo khi không có Ca^{++}. Như được thể hiện trên Fig.36, cho thấy rằng sự thiếu hụt MASP-3 làm giảm phần trăm phân hủy qua trung gian bổ thể của hồng cầu được phủ manan so với huyết thanh bình thường của người. Các sai khác giữa hai đường cong từ huyết thanh bình thường của người và hai đường cong từ các bệnh nhân 3MC là có ý nghĩa (p=0,013, kiểm định Friedman).

Bảng 16 dưới đây tóm tắt các kết quả AP_{50} được thể hiện trên Fig.36.

Bảng 16: Tóm tắt các kết quả được thể hiện trên Fig.36

Typ huyết thanh	AP_{50} (%)
Huyết thanh bình thường của người #1	7,1
Huyết thanh bình thường của người #2	8,6
Bệnh nhân 3MC #2	11,9
Bệnh nhân 3MC #3	14,3

Lưu ý rằng khi các mẫu huyết thanh được thể hiện trong bảng 16 được tập hợp, thì giá trị AP_{50} đối với huyết thanh bình thường của người = 7,9 và giá trị AP_{50} đối với huyết thanh 3MC = 12,8 (p=0,031, kiểm định xếp hạng trùng khớp theo cặp Wilcox (Wilcox matched-pairs signed rank test)).

Thử nghiệm #5: Việc hoàn nguyên huyết thanh 3MC ở người bằng MASP-3 tái tổ hợp làm khôi phục sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên các đĩa được phủ zymosan

Phương pháp

Thử nghiệm AP được tiến hành trong điều kiện đặc hiệu AP truyền thống (BBS/Mg^{++}/EGTA, không có Ca^{++}, trong đó BBS=dung dịch nước muối đệm barbital chứa sucroza), như được mô tả trong tài liệu Bitter-Suermann et al., *Eur. J. Immunol* 11:291-295 (1981)), trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan trong các mẫu huyết thanh sau đây (1) huyết thanh của người 5% từ bệnh nhân 3MC #2 với rMASP-3 có hoạt tính có chiều dài đầy đủ được bổ sung vào ở khoảng từ 0 đến 20 µg/mL; (2) huyết thanh của người 10% từ bệnh nhân 3MC #2 với rMASP-3 có hoạt tính có chiều dài đầy đủ được bổ sung vào ở khoảng từ 0 đến 20 µg/mL; và (3) huyết thanh của người 5% từ bệnh nhân 3MC #2 với rMASP-3A bất hoạt (S679A) được bổ sung vào ở khoảng từ 0 đến 20 µg/mL.

Kết quả

Fig.37 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa vi chuẩn độ được phủ zymosan dưới dạng hàm của nồng độ rMASP-3 protein được bổ sung vào các mẫu huyết thanh thu được từ người bệnh 3MC #2 (thiếu hụt MASP-3). Như được thể hiện trên Fig.37, protein MASP-3 tái tổ hợp có hoạt tính

khôi phục sự kết lắng C3b được điều khiển bởi AP trên đĩa được phủ zymosan theo cách phụ thuộc vào nồng độ. Như cũng được thể hiện trên Fig.37, không quan sát thấy sự kết lắng C3b nào trong huyết thanh 3MC chứa rMASP-3 bất hoạt (S679A).
Thử nghiệm #6: việc hoàn nguyên huyết thanh 3MC của người bằng MASP-3 tái tổ hợp làm khôi phục hoạt tính tan máu trong huyết thanh của bệnh nhân 3MC

Phương pháp

Thử nghiệm tan máu được tiến hành bằng cách sử dụng RBC của thỏ sử dụng phương pháp được mô tả ở trên trong thử nghiệm #2 với các huyết thanh thử nghiệm sau đây ở khoảng từ huyết thanh 0 đến 12%: (1) huyết thanh bình thường của người; (2) huyết thanh của bệnh nhân 3MC; (3) huyết thanh của bệnh nhân 3MC cộng với rMASP-3 có chiều dài đầy đủ có hoạt tính (20 μg/ml); và (4) huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt.

Kết quả

Fig.38 minh họa bằng đồ thị tỷ lệ tan máu tính theo phần trăm (như được đo bằng mức giải phóng hemoglobin của hồng cầu thỏ đã phân hủy vào phần dịch nổi trên bề mặt được đo bằng phép đo quang) hồng cầu thỏ được phủ manan trên một phạm vi nồng độ trong huyết thanh ở (1) huyết thanh bình thường của người; (2) huyết thanh của bệnh nhân 3MC; (3) huyết thanh của bệnh nhân 3MC cộng với rMASP-3 chiều dài đầy đủ có hoạt tính (20 μg/ml); và (4) huyết thanh của người được bất hoạt bằng nhiệt, được đo khi không có Ca^{++}. Như được thể hiện trên Fig.38, phần trăm phân hủy của RBC ở thỏ tăng lên đáng kể trong huyết thanh 3MC bao gồm rMASP-3 so với phần trăm phân hủy trong huyết thanh 3MC mà không có rMASP-3 (p=0,0006).

Fig.39 minh họa bằng đồ thị phần trăm phân hủy hồng cầu thỏ trong huyết thanh của người 7% từ bệnh nhân 3MC 2 và từ bệnh nhân 3MC 3 chứa rMASP-3 có hoạt tính ở khoảng nồng độ từ 0 đến 110 μg/ml trong BBS/Mg^{++}/EGTA. Như được thể hiện trên Fig.39, phần trăm phân hủy RBC của thỏ được khôi phục bằng lượng rMASP-3 theo cách phụ thuộc vào nồng độ lên đến hoạt tính 100%.

Thử nghiệm #7: Huyết thanh của bệnh nhân thiếu hụt MASP-3 (3MC) có MASP-2 chức năng nếu có mặt MBL

Phương pháp

Thử nghiệm sự kết lắng C3b được tiến hành bằng cách sử dụng đĩa ELISA được phủ manan dưới để xác định xem liệu huyết thanh 3MC có thiếu hụt LEA-2 không. Huyết tương xitrat được pha loãng trong chất đệm BBS theo các tỷ lệ pha loãng theo dãy (bắt đầu ở 1:80, 1:160, 1: 320, 1:640, 1:1280, 1:2560) và được dàn trên các đĩa được phủ manan. C3b đã kết lắng được phát hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm C3b ở gà kháng của người. Sự kết lắng C3b được điều khiển bằng LEA-2 (các tỷ lệ pha loãng huyết tương là cao để AP và LEA-1 hoạt động) trên đĩa ELISA được phủ manan được đánh giá dưới dạng hàm của nồng độ trong huyết thanh của người trong huyết thanh từ đối tượng người bình thường (NHS), từ hai bệnh nhân 3MC (bệnh nhân 2 và bệnh nhân 3), từ bố mẹ của bệnh nhân 3 và từ đối tượng thiếu hụt MBL.

Kết quả

Fig.40 minh họa bằng đồ thị mức kết lắng C3b được điều khiển bằng LEA-2 (tức là, được điều khiển bằng MASP-2) trên đĩa ELISA được phủ manan dưới dạng hàm của nồng độ huyết thanh của người được pha loãng trong chất đệm BBS, đối với huyết thanh từ đối tượng người bình thường (NHS), từ hai bệnh nhân 3MC (Bệnh nhân 2 và bệnh nhân 3), từ bố mẹ của bệnh nhân 3 và từ đối tượng thiếu hụt MBL. Dữ liệu này chỉ ra rằng bệnh nhân 2 đủ MBL. Tuy nhiên, bệnh nhân 3 và mẹ của bệnh nhân 3 thiếu hụt MBL, và do đó huyết thanh của họ không kết lắng C3b trên Manan thông qua LEA-2. Việc thay thế MBL trong các huyết thanh này khôi phục sự kết lắng C3b qua trung gian LEA-2 trong huyết thanh của bệnh nhân 3 (người mà đồng hợp tử với SNP dẫn đến sự thiếu hụt MASP-3) và mẹ của người đó (người mà dị hợp tử với alen MASP-3 đột biến) (dữ liệu không được thể hiện). Kết quả này cho thấy rằng huyết thanh 3MC không thiếu hụt ở LEA-2, nhưng có vẻ là có MASP-2 chức năng.

Tóm tắt tổng quan và các kết luận

Các kết quả này cho thấy rằng sự thiếu hụt MASP-3 trong huyết thanh của người dẫn đến mất hoạt tính của AP, như được biểu lộ ở sự kết lắng C3b giảm trên các lỗ được phủ zymosan và sự phân hủy hồng cầu thỏ giảm. AP có thể được khôi phục trong cả hai thử nghiệm bằng cách bổ sung huyết thanh vào MASP-3 người tái tổ hợp, có chức năng.

Ví dụ 11

Ví dụ này cho thấy rằng kháng thể đơn dòng kháng MASP-3 của người có vùng V chuột nhắt/vùng hằng định IgG4 người khảm (mAb M3-1, còn được đề cập đến là mAb 13B1) là chất ức chế tiềm năng cho sự hoạt hóa con đường nhánh bổ thể (APC) qua trung gian MASP-3.

Phương pháp

Tạo ra kháng thể đơn dòng (mAb M3-1) kháng MASP-3 của người có vùng hằng định IgG của người/vùng V của chuột nhắt khảm

Kháng thể ức chế (mAb M3-1) từ chuột kháng MASP-3 của người được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho chuột nhắt bất hoạt MASP-1/3 với miền MASP-3 CCP1-CCP2-SP của người (aa 301-728 của SEQ ID NO:2) (cũng xem trong Ví dụ 14). Tóm lại, các tế bào lách từ chuột nhắt đã được gây miễn dịch được dung hợp với P3/NS1/1-Ag4-1 và phần dịch nổi trên bề mặt từ các dòng vô tính tế bào lai tạo thành được sàng lọc về sự tạo ra kháng thể liên kết với MASP-3 của người và về khả năng ngăn chặn sự phân cắt qua trung gian MASP-3 của tiền yếu tố D của bổ thể (pro-CFD) với yếu tố D (CFD). Vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng (mAb) được phân lập bằng RT-PCR, được giải trình tự và tách dòng thành vectơ biểu hiện IgG4 của người. Các kháng thể đơn dòng khảm được biểu hiện trong các tế bào HEK293T được chuyển nhiễm tạm thời, được tinh chế và thử nghiệm về ái lực liên kết với MASP-3 của chuột nhắt và người và về khả năng ức chế sự phân cắt qua trung gian MASP-3 của pro-CFD với CFD.

Kháng thể ức chế MASP-3 đơn dòng M3-1 (13B1) chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) được nêu trong SEQ ID NO:30 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) được nêu trong SEQ ID NO:45. Các trình tự của vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng M3-1 được nêu dưới đây:

Vùng biến đổi chuỗi nặng

Được thể hiện dưới đây là trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) đối với mAb M3-1. CDR theo Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) được gạch chân, tương ứng với các gốc axit amin 31-35 (H1), 50-66 (H2) và 99-102 (H3) có SEQ ID NO:30.

Vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của mAb M3-1 (SEQ ID NO:30)

QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTGKWIEWVKQRPGHGLEWIG EILPGTGSTNYNEKFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLRSE DVWGTGTTVTVSS

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

Được thể hiện dưới đây là trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) đối với mAb M3-1. CDR theo Kabat (24-34 (H1), 50-56 (H2) và 89-97 (H3) được gạch chân, tương ứng với các gốc axit amin 24-40 (L1); 56-62 (L2) và 95-102 (L3) có SEQ ID NO:45. Các vùng này là như nhau bất kể được đánh số theo hệ thống Kabat hay Chothia.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của mAb M3-1 (SEQ ID NO:45)

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNIPT FGGGTKLEIKR

CDR của VU của mAb M3-1

VHCDR1: GKWIE (SEQ ID NO:84)

VHCDR2: EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)

VHCDR3: SEDV (SEQ ID NO:88)

CDR của VL của mAb M3-1

VLCDR1: KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)

VLCDR2: WASTRES (SEQ ID NO:144)

VLCDR3: KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)Như được thể hiện ở trên, kháng thể đơn dòng M3-1 MASP-3 bao gồm (a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa (i) VHCDR1 chứa SEQ ID NO:84, (ii) VHCDR2 chứa SEQ ID NO:86 và (iii) VHCDR3 chứa SEQ ID NO:88; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa (i) VLCDR1 chứa SEQ ID NO:142, (ii) VLCDR2 chứa SEQ ID NO:144 và (iii) VLCDR3 chứa SEQ ID NO:161.

Liên kết của mAb M3-1 với các dạng tái tổ hợp của MASP-3 của người và chuột nhắt

Phiên bản Fab hóa trị một của M3-1 được thử nghiệm về sự liên kết với protein MASP-3 của người và chuột nhắt tái tổ hợp, có chiều dài đầy đủ trong thử nghiệm ELISA. Các phương pháp xác định ái lực liên kết được tiến hành bằng cách phủ các đĩa 96 lỗ bằng kháng thể thu giữ kháng MASP-3 mà liên kết với protein từ nhiều loài. Kháng thể thu giữ đã cho thấy là liên kết với vùng CCP1-CCP2 của MASP-1 và MASP-3. Các phiên bản có chiều dài đầy đủ của protein của người và chuột nhắt được cố định trên các đĩa ELISA được phủ kháng thể thu giữ, và các nồng độ khác nhau của M3-1 Fab được cho liên kết với protein đích trong các lỗ riêng rẽ. M3-1 đã được liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể chuỗi nhẹ kháng kapa mà được liên hợp với HRP (Novus Biologicals NBP1-75064), và được hiển thị bằng bộ thuốc thử cơ chất TMB (BD Biosciences 555214).

Fig.41 minh họa bằng đồ thị một ví dụ tiêu biểu về thử nghiệm liên kết được thực hiện với MASP-3 của người trong đó M3-1 Fab (còn được đề cập đến là 13B1) thể hiện ái lực liên kết biểu kiến (EC_{50}) bằng khoảng 0,117 nM với protein của người.

Fig.42 minh họa bằng đồ thị một ví dụ tiêu biểu về thử nghiệm liên kết được thực hiện với MASP-3 của chuột nhắt trong đó M3-1 Fab thể hiện ái lực liên kết biểu

kiến (EC_{50}) bằng khoảng 0,214 nM với protein của chuột nhắt.

Các kết quả này cho thấy rằng mAb M3-1 (13B1) có ái lực liên kết cao đối với cả MASP-3 của người và chuột nhắt.

Chứng minh rằng mAb M3-1 có khả năng ức chế sự hoạt hóa bổ thể của con đường nhánh (APC) và đo tính hiệu lực *in vitro* của mAb M3-1

Như được mô tả theo sáng chế, xác định được rằng MASP-3 là chất điều hòa chính của APC, ít nhất một phần là do sự cần thiết của nó đối với sự hoạt hóa của CFD, enzym APC trung tâm. Cũng như được mô tả theo sáng chế, MASP-3 tuần hoàn trong cơ thể ở nồng độ tương đối thấp và có tốc độ dị hóa chậm, cho phép sự ức chế lâu dài của con đường tiền viêm thông qua đường dùng của kháng thể MASP-3 qua đường miệng, dưới da và trong tĩnh mạch. Thử nghiệm sau đây được tiến hành để xác định hiệu quả của mAb M3-1 để ức chế sự thuần thục của CFD qua trung gian MASP-3 và ức chế APC trong huyết thanh của người. Huyết thanh bình thường của người chủ yếu chứa CFD có hoạt tính hoặc được xử lý (tức là, thuần thục), vì thế các tác giả sáng chế đã thực hiện các thử nghiệm trong đó huyết thanh của người đã rút cạn CFD (Complement Technology A336) được hoàn nguyên bằng dạng không được xử lý, tái tổ hợp của CFD (pro-CFD). Vì thế, trong hệ thống thử nghiệm này, sự hoạt hóa APC yêu cầu việc xử lý pro-CFD thành CFD có hoạt tính.

APC được kích thích bằng cách bổ sung các hạt zymosan, mà hoạt động như bề mặt hoạt hóa đối với sự kết lắng bổ thể. Các nồng độ khác nhau của mAb M3-1 được bổ sung vào huyết thanh trước khi việc bổ sung pro-CFD tái tổ hợp và zymosan. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 75 phút, và hoạt tính APC được đo bằng phương pháp dò đếm tế bào theo dòng chảy của yếu tố Bb bổ sung (Quidel A252) trên bề mặt của các hạt zymosan.

Fig.43 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng yếu tố Bb của bổ thể trên các hạt zymosan (được xác định bằng cách dò đếm tế bào theo dòng chảy được đo theo đơn vị MFI) khi có mặt các nồng độ khác nhau của mAb M3-1 trong huyết thanh của người cạn CFD. Như được thể hiện trên Fig.43, mAb M3-1 thể hiện sự ức chế tiềm

năng của APC trong huyết thanh của người 10%, với IC_{50} bằng 0,311 nM trong ví dụ thử nghiệm này.

Các kết quả này cho thấy rằng MASP-3 đóng vai trò chủ chốt đối với sự hoạt hóa APC trong mô hình *in vitro* trong huyết thanh của người, và còn cho thấy rằng mAb M3-1 là chất ức chế tiềm năng của APC.

Ức chế APC bằng mAb M3-1 *in vivo*

Để xác định hiệu quả của mAb M3-1 để ức chế APC *in vivo*, nhóm chuột nhắt (n = 4) tiếp nhận một liều tiêm trong tĩnh mạch đuôi của 10 mg/kg mAb M3-1. Máu thu gom được từ động vật được sử dụng để tạo ra huyết thanh, tạo ra thể gốc để đánh giá thông qua đếm tế bào theo dòng về hoạt tính APC trong thử nghiệm *ex vivo* đo mức kết lắng của C3 (cả C3b và iC3b) trên các hạt zymosan. Huyết thanh được tạo ra từ máu được thu gom ở một thời điểm trước định liều và nhiều thời điểm sau định liều (96 giờ, 1 tuần, và 2 tuần) được pha loãng đến 7,5% và các hạt zymosan được bổ sung vào để kích thích APC. Chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể được so sánh với nhóm chuột nhắt đối chứng (n = 4) mà được cho dùng một liều chất dẫn thuốc trong tĩnh mạch.

Fig.44 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3 trên các hạt zymosan ở các thời điểm khác nhau sau một liều mAb M3-1 (10 mg/kg i.v.) ở chuột nhắt loại dại. Như được thể hiện trên Fig.44, ở thời điểm trước định liều, hai điều kiện thể hiện các mức tương đương của hoạt tính APC. Vào thời điểm 96 giờ và hai thời điểm sau đó, nhóm được điều trị bằng mAb M3-1 thể hiện sự ức chế APC về cơ bản là hoàn toàn, trong khi hoạt tính APC của nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc vẫn không giảm sút. Như được thể hiện trên Fig.44, một liều mAb M3-1 được sử dụng trong tĩnh mạch cho chuột nhắt dẫn đến sự loại bỏ gần như hoàn toàn hoạt tính APC toàn thân trong thời gian ít nhất 14 ngày.

Các kết quả này cho thấy rằng mAb M3-1 là chất ức chế tiềm năng của APC *in vivo* trong mô hình chuột nhắt.

Ví dụ 12

Ví dụ này cho thấy rằng kháng thể đơn dòng kháng MASP-3 của người có vùng V của chuột nhắt/vùng hằng định IgG4 của người khảm (mAb M3-1, còn được đề cập đến là mAb 13B1) mang lại lợi ích rõ ràng cho sự sống sót của các tế bào hồng cầu thiếu Crry trong mô hình chuột nhắt liên quan đến hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH).

Phương pháp

Kháng thể đơn dòng kháng MASP-3 của người (mAb M3-1) có vùng V của chuột nhắt/vùng hằng định IgG4 của người khảm được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 11 và Ví dụ 14. Như được mô tả thêm trong Ví dụ 11, xác định được rằng mAb M3-1 là chất ức chế tiềm năng của APC trong mô hình chuột nhắt *in vivo*. Ví dụ này mô tả việc phân tích mAb M3-1 về tính hiệu quả trong mô hình chuột liên quan đến PNH.

Phân tích mAb M3-1 về hiệu quả trong mô hình chuột liên quan đến PNH

Trong mô hình chuột nhắt liên quan đến PNH, các tế bào hồng cầu (RBC) từ chuột nhắt thiếu hụt Crry thiếu chất kìm hãm bề mặt tế bào của APC trong chuột nhắt thu được để sử dụng làm các tế bào cho. RBC thu được từ chuột nhắt cho loại dại (WT) được chạy song song. Các tế bào RBC cho được đánh dấu để phân biệt bằng thuốc nhuộm ưa béo huỳnh quang (Sigma): WT (đỏ), và Crry- (xanh). Trong hai thử nghiệm khác nhau, các tế bào cho WT và Crry- đã được đánh dấu được trộn ở tỷ lệ 1:1 và được tiêm trong tĩnh mạch vào chuột nhắt loại dại nhận và sự sống sót theo phần trăm của Crry thiếu hụt WT và RBC (so với thời điểm sớm) ở chuột nhắt nhận được xác định bằng phương pháp đánh giá thông qua đếm tế bào theo dòng của 20.000 sự kiện tế bào sống. Trong thử nghiệm đầu tiên, nhiều lần điều trị trước khi định liều của kháng thể mAb M3-1 được cung cấp, và tác dụng của mAb M3-1 được so sánh với tác dụng của một kháng thể bổ thể ức chế khác mAb BB5.1 (có sẵn từ Hycult Biotech), là kháng thể ức chế C5 cho thấy là có hiệu quả trong nhiều nghiên cứu ở chuột nhắt (Wang et al., *PNAS* vol 92:8955-8959, 1995; Hugen et al., *Kidney Int* 71(7):646-54, 2007). Sử dụng chất ức chế C5 là tiêu chuẩn điều trị hiện tại cho

người bệnh bằng PNH. Trong thử nghiệm thứ hai, một liều điều trị trước của mAb M3-1 được đánh giá.

Trong thử nghiệm đầu tiên, ba nhóm khác nhau của chuột nhắt (n = 4 trong mỗi điều kiện) được đánh giá: điều kiện điều trị bằng chất dẫn thuốc, điều kiện điều trị bằng mAb M3-1, và điều kiện điều trị bằng mAb BB5.1 (chuột nhắt C5 phong bế mAb). Các tế bào đã được đánh dấu được tiêm vào chuột nhắt vào "ngày 0", và nhiều liều của cả M3-1 và BB5.1 được sử dụng như sau: mAb M3-1 được sử dụng trong tĩnh mạch (10 mg/kg) vào ngày -11, -4, -1, và +6. mAb BB5.1 được sử dụng bằng cách tiêm trong màng bụng (40 mg/kg) vào ngày -1, +3, +6, và +10. Việc điều trị bằng chất dẫn thuốc theo kế hoạch dùng theo liều giống với mAb M3-1.

Fig.45 minh họa bằng đồ thị tỷ lệ sống sót tính theo phần trăm của RBC cho (WT hoặc Crry) trong giai đoạn 14 ngày ở chuột nhắt nhận WT được điều trị bằng mAb M3-1 (10 mg/kg vào ngày -11, 04, -1 và +6), chuột nhắt được điều trị bằng mAb BB5.1, hoặc chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Như được thể hiện trên Fig.45, so với WT RBC mà thể hiện sự sống sót điển hình của RBC ở chuột nhắt trong các động vật được điều trị bằng chất dẫn thuốc, RBC thiếu hụt Crry có sự thanh thải nhanh (trên 75% được thanh thải trong vòng 24 giờ). Việc điều trị chuột nhắt bằng mAb BB5.1 không mang lại sự cải thiện nào so với việc điều trị bằng chất dẫn thuốc đối với sự sống sót RBC thiếu hụt Crry. Ngược lại, việc điều trị bằng mAb M3-1 mang lại sự cải thiện đáng kể sự sống sót của RBC thiếu hụt Crry so với cả động vật được điều trị bằng mAb BB5.1 và động vật được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Tác dụng bảo vệ của mAb M3-1 được quan sát trong suốt thời gian thử nghiệm.

Trong nghiên cứu thứ hai, RBC WT (đỏ)- và Crry (xanh) được đánh dấu để phân biệt được đánh giá trong hai nhóm khác nhau gồm các con chuột nhắt WT (n = 4 trong mỗi điều kiện): được điều trị bằng chất dẫn thuốc và được điều trị bằng mAb M3-1. Một liều của chất dẫn thuốc hoặc kháng thể (20 mg/kg) được đưa vào chuột nhắt nhận bằng cách sử dụng trong tĩnh mạch sáu ngày (ngày 6) trước khi các tế bào cho đã được đánh dấu được tiêm vào chuột nhắt nhận đó. RBC cho đã được đánh

dấu sau đó được phân tích về tỷ lệ sống sót tính theo phần trăm với chuột nhắt nhận ở các thời điểm tăng dần sau khi tiêm trong khoảng thời gian 16 ngày.

Fig.46 minh họa bằng đồ thị tỷ lệ sống sót tính theo phần trăm của RBC cho (WT hoặc Crry) trong giai đoạn 16 ngày ở chuột nhắt nhận WT được điều trị bằng một liều mAb M3-1 (20 mg/kg vào ngày 6) hoặc chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Như được thể hiện trên Fig.46, một liều điều trị trước của mAb M3-1 thể hiện sự sống sót cải thiện của các Crry- RBC so với sự sống sót của Crry- RBC ở chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Ở lần tiêm sau 96 giờ, khoảng 90% WT RBC được điều trị bằng chất dẫn thuốc sống sót trong các điều kiện đối chứng, trong khi đó chỉ có 5% Crry- RBC sống sót trong số chuột nhắt WT được điều trị bằng chất dẫn thuốc. Trái ngược với chuột được điều trị bằng chất dẫn thuốc, 40% Crry- RBC sống sót trong số chuột nhắt được điều trị bằng mAb M3-1.

Kết hợp lại, các kết quả này cho thấy rằng kháng thể ức chế MASP-3 mAb M3-1 mang lại lợi ích rõ ràng cho sự sống sót của RBC thiếu Crry, chất ức chế bổ thể bề mặt chủ yếu trong mô hình chuột nhắt liên quan đến PNH.

Ví dụ 13

Ví dụ này mô tả nghiên cứu cho thấy rằng kháng thể ức chế MASP-3 đơn dòng khảm (mAb M3-1, còn được đề cập đến là mAb 13B1) làm giảm điểm số lâm sàng trong bệnh viêm khớp cảm ứng bởi kháng thể colagen (CAIA), mô hình chuột có bệnh viêm khớp dạng thấp (RA).

Bối cảnh/cơ sở lý luận

CAIA là mô hình động vật được thiết lập tốt của bệnh viêm khớp. Ngoài cung cấp cái nhìn sâu sắc về RA, bệnh lý của mô hình CAIA có sự kết nối được thiết lập với APC. Banda và các cộng sự đã chứng minh các kết quả cải thiện trong mô hình CAIA ở chuột nhắt mang các thiếu sót về thành phần của APC, như yếu tố B và yếu tố D (Banda et al., *J. Immunol* vol 177:1904-1912, 2006 và Banda et al., *Clinical & Exp Imunol* vol 159:100-108, 2009). Các gen bất hoạt của chuột nhắt APC thể hiện các điểm viêm khớp (bệnh) thấp hơn, tỷ lệ mắc thấp hơn, và sự kết lắng yếu tố H và

C3 ít hơn trong màng hoạt dịch và các mô bao quanh so với các đối chứng WT. Ngoài ra, điểm số hoạt tính bệnh, sự kết lắng mô của bổ thể C3 trong khớp, và điểm số tổn thương mô bệnh học được giảm đáng kể trong chuột nhắt bất hoạt MASP1/3 (Banda et al., *J Immunol* vol 185:5598-5606, 2010). Do đó, kháng thể ức chế MASP-3 mAb M3-1 được phân tích về tính hiệu quả trong CAIA.

Phương pháp

Kháng thể đơn dòng MASP-3 khảm (mAb M3-1) được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 11 và Ví dụ 14. Như được mô tả thêm trong Ví dụ 11, xác định được rằng mAb M3-1 là chất ức chế tiềm năng của APC trong mô hình chuột nhắt *in vivo*.

mAb M3-1 được thử nghiệm trong mô hình CAIA như sau. Chuột nhắt loại dại (n=7) được tiêm trong tĩnh mạch với 3 mg dung dịch hỗn hợp chứa các kháng thể kháng colagen vào ngày 0. Chuột nhắt được cho dùng theo liều trong màng bụng với *E. coli* lipopolysacarit (LPS) (25 µg/chuột nhắt) vào ngày +3. Như được mô tả trong tài liệu Nandakumar et al. (*Am J Pathol* 163(5):1827-1837, 2003), chứng viêm khớp thường xuất hiện trong mô hình này vào ngày +3 đến +10. Các mẫu huyết thanh cuối cùng được thu gom vào ngày +14. mAb M3-1 (5 mg/kg và 20 mg/kg) được dùng theo liều vào các ngày -12, -5, +1 và ngày +7. Chất dẫn thuốc (PBS) được tiêm làm đối chứng âm.

Các điểm số lâm sàng được đánh giá đối với mỗi con chuột nhắt trên tất cả 4 chân vào các ngày nghiên cứu từ 0 đến 14 bằng cách sử dụng các tiêu chuẩn cho điểm sau đây:

0= bình thường

1= 1 khớp chân trước và/hoặc sau bị ảnh hưởng hoặc ban đỏ lan tỏa và sưng tấy rất nhỏ

2= 2 khớp chân trước và/hoặc sau bị ảnh hưởng hoặc ban đỏ lan tỏa và sưng tấy nhẹ

3= 3 khớp chân trước và/hoặc sau bị ảnh hưởng hoặc ban đỏ lan tỏa và sưng

tấy vừa phải

4= ban đỏ lan tỏa và sưng tấy rõ rệt, hoặc 4 khớp ngón chân bị ảnh hưởng

5= ban đỏ lan tỏa nghiêm trọng và sưng tấy nghiêm trọng toàn bộ chân, không có khả năng gập ngón chân.Tỷ lệ mắc = % chuột nhắt trong nhóm điều trị thể hiện các triệu trứng viêm khớp cũng được xác định.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.47 (các điểm số lâm sàng) và Fig.48 (tỷ lệ mắc bệnh viêm khớp). Fig.47 minh họa bằng đồ thị điểm số lâm sàng ở chuột nhắt được điều trị bằng mAb M3-1 (5 mg/kg hoặc 20 mg/kg) hoặc chất dẫn thuốc trong khoảng thời gian 14 ngày. Fig.48 minh họa bằng đồ thị phần trăm mắc bệnh viêm khớp ở chuột nhắt được điều trị bằng mAb M3-1 (5 mg/kg hoặc 20 mg/kg) hoặc chất dẫn thuốc trong khoảng thời gian 14 ngày. Như được thể hiện trên Fig.47, mAb M3-1 cho thấy lợi ích trị liệu rõ rệt đối với cả hai điểm cuối bắt đầu vào ngày 5 và kéo dài trong suốt thời gian nghiên cứu. Như được thể hiện trên Fig.48, trong khi tỷ lệ mắc bệnh đạt đến 100% ở các con được điều trị bằng chất dẫn thuốc, thì hai phần ba số động vật trong điều kiện 5 mg/kg mAb M3-1 không bị bệnh. Ngoài ra, chỉ một phần các con vật (tức là, chỉ một trong tổng số n = 7) thể hiện các triệu trứng viêm khớp bất kỳ trong điều kiện 20 mg/kg mAb M3-1.

Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy rằng kháng thể ức chế MASP-3 mAb M3-1 mang lại lợi ích trị liệu rõ rệt trong mô hình CAIA, mô hình chuột được thiết lập tốt của bệnh viêm khớp dạng thấp (RA) và mô hình liên kết mạnh mẽ với sự hoạt hóa APC. Như được thể hiện trong Ví dụ 11, một liều mAb M3-1 được sử dụng trong tĩnh mạch cho chuột nhắt dẫn đến sự loại bỏ gần như hoàn toàn hoạt tính APC toàn thân trong thời gian ít nhất 14 ngày. Như được thể hiện trong ví dụ này, trong mô hình động vật được kích thích bằng cách sử dụng các kháng thể tự kháng kháng lại mô liên kết của chuột nhắt, mAb M3-1 làm giảm tỷ lệ mắc và độ nghiêm trọng của các điểm viêm khớp lâm sàng theo kiểu phụ thuộc liều lượng. So với các con vật được điều trị bằng đối chứng, mAb M3-1 làm giảm tỷ lệ mắc và độ nghiêm trọng của bệnh khoảng 80% ở liều cao nhất được thử nghiệm. Do đó, mong đợi rằng việc sử

dụng kháng thể ức chế MASP-3, như mAb M3-1 sẽ là liệu pháp hiệu quả ở các bệnh nhân mắc viêm khớp, như viêm khớp dạng thấp, viêm xương khớp, viêm khớp dạng thấp độ tuổi thanh thiếu niên, viêm khớp liên quan đến lây nhiễm, viêm khớp vảy nến, cũng như viêm cột sống dính khớp và bệnh Bechcet.

Ví dụ 14

Ví dụ này mô tả việc tạo ra kháng thể ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao.

Bối cảnh/cơ sở lý luận

Các kháng thể đặc hiệu đối với MASP-3 đã được mô tả với số lượng có hạn (Thiel et al., *Mol. Immunol.* 43:122, 2006; Moller-Kristensen et al., *Int. Immunol.* 19:141, 2006; Skjoedt et al., *Immunobiol* 215:921, 2010). Các kháng thể này hữu ích cho các thử nghiệm phát hiện như thẩm tách Tây, kết tủa miễn dịch, và làm các chất phát hiện hoặc thu giữ trong các phân tích ELISA. Tuy nhiên, các kháng thể được mô tả trong tài liệu Thiel et al., 2006, Moller-Kristensen et al., 2006 và Skjoedt et al., 2010 không được thấy là ức chế hoạt tính xúc tác của MASP-3.

Các kháng thể MASP-3 cũng đã được tạo ra trước đây, như được mô tả trong Ví dụ 7 trong bản mô tả (cũng được công bố như trong Ví dụ 15 của WO2013/192240) bằng cách sàng lọc thư viện kháng thể của gà trong dòng tế bào DT40 được cải biến, DTLacO, đối với các phân tử liên kết MASP-3. Các kháng thể này liên kết với MASP-3 của người trong khoảng nanomol với EC_{50} nằm trong khoảng từ 10 nM đến 100 nM và ức chế một phần sự phân cắt của pro-CFD bằng MASP-3.

Ví dụ này mô tả sự tạo ra kháng thể ức chế kháng MASP-3 của người với ái lực liên kết mạnh khác thường (tức là, ái lực liên kết dưới nanomol, nằm trong khoảng từ ≤500 pM đến 20 pM). Các kháng thể được mô tả trong ví dụ này liên kết đặc hiệu với MASP-3 của người với ái lực cao (ví dụ, ≤ 500 pM), ức chế sự thuần thục của yếu tố D, và không liên kết với MASP-1 của người (SEQ ID NO:8).

Phương pháp

1. Tạo ra kháng thể đơn dòng kháng MASP-3 của người có vùng hằng định IgG của người/vùng V của chuột nhắt khảm

Chuột bất hoạt MASP-1/3, C57BL/6 từ bảy đến mười bốn tuần tuổi được gây miễn dịch với polypeptit MASP-3 CCP1/CCP2/SP của người (các gốc axit amin 299-728 có SEQ ID NO:2) bao gồm đuôi epitop StrepTag II trên đầu tận N; hoặc được gây miễn dịch với miền SP của MASP-3 của người (các gốc axit amin 450-728 có SEQ ID NO:2), bao gồm StrepTagII trên đầu tận N, bằng cách sử dụng hệ thống chất phù trợ Sigma (Sigma Adjuvant System) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Chuột nhắt được tiêm trong màng bụng với 50 µg chất sinh miễn dịch cho mỗi con chuột nhắt. Chuột nhắt đã được gây miễn dịch được tiêm liều bổ sung 14 ngày sau đó với chất sinh miễn dịch bổ sung trong chất phù trợ. Sau đó, trong thời gian một vài tuần, chuột nhắt được tiêm liều bổ sung mỗi 14 đến 21 ngày bằng chất sinh miễn dịch trong PBS. Các mẫu huyết thanh từ chuột nhắt được chuẩn bị định kỳ từ đuôi chảy máu và được thử nghiệm bằng ELISA về sự có mặt của các kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Chuột có hiệu giá kháng thể đáng kể tiếp nhận liều bổ sung chất sinh miễn dịch tiền dung hợp trong PBS bốn ngày trước khi dung hợp lách. Ba ngày trước khi dung hợp, chuột nhắt được điều trị dưới da ở gốc đuôi với 50 µg chất chủ vận mAb kháng CD40 trong PBS (R&D Systems, Minneapolis, MN) để làm tăng số lượng tế bào B (xem tài liệu Rycyzyn et al., *Hybridoma* 27:25-30, 2008). Chuột nhắt được giết trợ tử và các tế bào lá lách được thu gom và được dung hợp với dòng tế bào u tủy ở chuột được chọn P3/NSI/1-AG4-1 (NS-1) (ATCC số TIB18) bằng cách sử dụng polyetylen glycol 50% hoặc polyetylen glycol 50% cộng với DMSO 10%. Các thể dung hợp tạo ra các tế bào lai mà được dàn trên các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ chứa môi trường HAT (hypoxanthin, aminopterin và thymidin) để ức chế sự tăng sinh của các tế bào không được dung hợp, các thể lai u tủy và thể lai lá lách. Sau khi lựa chọn tế bào lai, phần dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được thử nghiệm về việc liên kết MASP-3 (ELISA) và việc ức chế sự hoạt hóa của tiền yếu tố D. Các tế bào lai dương tính được nhận biết và được tách dòng phụ bằng các phương pháp pha loãng theo dãy.

Bảng 17: Tóm tắt các thử nghiệm dung hợp

Dung hợp	Chất sinh miễn dịch: MASP-3 của người	Tổng số tế bào lai	Tế bào lai liên kết MASP-3	Tế bào lai chức năng MASP-3
1	SP	434	38	10
2	SP	279	13	0
3	CCP1/CCP2/SP	348	40	2
4	CCP1/CCP2/SP	319	60	2
5	CCP1/CCP2/SP	651	152	1
6	CCP1/CCP2/SP	1297	ND	1

Lưu ý: "ND" có nghĩa là sự dung hợp này chỉ được sàng lọc về sự ức chế chức năng hoạt hóa pro-CFD.

Kết quả

Như được thể hiện trong bảng 17, tổng số 3328 tế bào lai từ chuột nhắt MASP1/3 KO đã được gây miễn dịch được sàng lọc, trong đó >303 được thấy là liên kết với MASP-3 và khoảng 16 được thấy là liên kết với MASP-3 và ức chế sự hoạt hóa pro-CFD. mAb M3-1 (13B1) được mô tả trong Ví dụ 11 là một trong số 16 kháng thể ức chế MASP-3 chức năng được mô tả trong bảng 17. Như được mô tả trong Ví dụ 15, xác định được rằng tất cả 16 kháng thể ức chế MASP-3 chức năng đều liên kết với MASP-3 của người với ái lực liên kết mạnh khác thường (≤ 500 pM).

Thảo luận

Ví dụ này mô tả việc tạo ra các kháng thể ức chế MASP-3 của người với ái lực liên kết mạnh khác thường (tức là, ái lực liên kết dưới nanomol, nằm trong khoảng từ ≤500 pM đến 20 pM) bằng cách gây miễn dịch cho chuột nhắt bất hoạt MASP1/3. Các kháng thể được mô tả trong ví dụ này liên kết đặc hiệu với MASP-3 của người với ái lực cao (ví dụ, ≤ 500 pM), ức chế sự thuần thục yếu tố D, và không liên kết với MASP-1 của người. Như được mô tả trong bản mô tả này, trình tự axit amin của MASP-3 người, chuột nhắt và gà bộc lộ rằng miền SP của MASP-3 được bảo toàn ở mức độ cao, đặc biệt là ở vị trí hoạt hóa (xem Fig.4 và Fig.5). Có thể là có khả năng tạo ra kháng thể ức chế MASP-3 với ái lực liên kết mạnh khác thường ở chuột nhắt

MASP1/3 KO, như được mô tả trong ví dụ này, một phần là do tránh sự dung nạp miễn dịch mà có thể cản trở sự tạo ra các kháng thể đặc hiệu với điểm xúc tác MASP-3 hoạt lực cao ở các động vật loại dại.

Ví dụ 15

Ví dụ này mô tả sự tách dòng và phân tích trình tự của mAb ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao.

Phương pháp

Tách dòng và tinh chế các kháng thể tái tổ hợp

Các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tách dòng từ các tế bào lai như được mô tả trong các ví dụ 11 và 14 bằng cách sử dụng RT-PCR và được giải trình tự. MAb khảm của người-chuột nhắt bao gồm vùng biến đổi của mAb chuột nhắt được dung hợp với chuỗi nặng IgG4 của người (SEQ ID NO:311) và vùng hằng định của chuỗi nhẹ kapa (SEQ ID NO:313) được tạo ra dưới dạng protein tái tổ hợp trong các tế bào Expi293F. Vùng bản lề hằng định IgG4 (SEQ ID NO:311) chứa cải biến thay thế axit amin S228P ổn định. Theo một phương án, các mAb khảm được dung hợp với vùng bản lề hằng định IgG4 của người (SEQ ID NO:312) mà chứa cải biến thay thế axit amin S228P và cũng chứa đột biến thúc đẩy các tương tác FcRn ở độ pH thấp. Trình tự của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trên Fig.49A và Fig.49B, một cách tương ứng ("SIN" = "SEQ ID NO:" trên Fig.49A và Fig.49B), và được bao gồm dưới đây. Các vùng bổ thể (CDR) và vùng khung (FR) của mỗi trình tự được nêu trong các bảng 18-22 dưới đây.

Fig.50A là thụ đồ của vùng VH của mAb ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao được tạo ra trong chuột nhắt MASP1/3 KO. Fig.50B là thụ đồ của vùng VL của mAb ức chế kháng MASP-3 của người có ái lực cao được tạo ra trong chuột nhắt MASP1/3 KO. Như được thể hiện trên Fig.50A và Fig.50B, một vài nhóm kháng thể có liên quan được nhận biết. Được thể hiện dưới đây là trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) đối với mỗi kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao. Các CDR theo Kabat được gạch chân.

Vùng biến đổi chuỗi nặng: 4D5_VH: SEQ ID NO:24

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTTDDINWVKQRPGQGLEWIGW
IYPRDDRTKYNDKFKDKATLTVDTSSNTAYMDLHSLTSEDSAVYFCSSLED
TYWGQGTLVAVSS1F3_VH: SEQ ID NO:25

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPGQGLEWIGW
IYPRDGSIKYNEKFTDKATLTVDVSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCSGVEDS
YWGQGTLVTVSS4B6_VH: SEQ ID NO:26

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPGQGLEWIGW
IYPRDGTTKYNEEFTDKATLTVDVSSSTAFMELHSLTSEDSAVYFCSSVEDS
YWGQGTLVTVSS1A10_VH: SEQ ID NO:27

QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNDINWVKQRPGQGLEWIGW
IYPRDGTTKYNEKFTDKATLTVDVSSSTAFMELHRLTSEDSAVYFCSSVED
SYWGQGTLVTVSS10D12_VH: SEQ ID NO:28

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMGW
INTYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSARTPYLQINNLKNEDTATYFCARGGE
AMDYWGQGTSVTVSS35C1_VH: SEQ ID NO:29

QIQLVQSGPELKTPGETVKISCKASGYIFTSYGITWVKQAPGKGLKWMGWI
NTYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTTTYFCTRGGDA
LDYWGQGTSVTVSS13B1_VH: SEQ ID NO:30

QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFTGKWIEWVKQRPGHGLEWIG
EILPGTGSTNYNEKFKGKATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLRSE
DVWGTGTTVTVSS1G4_VH: SEQ ID NO:31

QVQLKQSGAELMKPGASVKLACKATGYTFTGYWIEWIKQRPGQGLEWIG
EMLPGSGSTHYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSGLTTEDSAIYYCVRSI
DYWGQGTTLTVSS1E7_VH: SEQ ID NO:32

QVQLKQSGPELARPWASVKISCQAFYTFSRRVHFAIRDTNYWMQWVKQR
PGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS
AVYYCASGSHYFDYWGQGTTLTVSS2D7_VH: SEQ ID NO:33

EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYTLTDYYMNWVKQSHGKSLEWIG
DVNPNNDGTTYNQKFKGRATLTVDKSSNTASMELRSLTSEDSAVYYCAIC
PFYYLGKGTHFDYWGQGTSLTVSS49C11_VH: SEQ ID NO:34

EVQLQQSGPVLVKPGASGKMSCKASGYKFTDYYMIWVKQSHGKSLEWIG
VIKIYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARGP
SLYDYDPYWYFDVWGTGTTVTVSS15D9_VH: SEQ ID NO:35

QVQLKQSGTELMKPGASVNLSCKASGYTFTAYWIEWVKQRPGHGLEWIG
EILPGSGTTNYNENFKDRATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARSYY
YASRWFAFWGQGTLVTVSS2F5_VH: SEQ ID NO:36

EVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPGQGLEWIG
DIYPGSGSTNYNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRR
YYATAWFAYWGQGTLVTVSS1B11_VH: SEQ ID NO:37

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIAR
IYPGSGNTYYNEKFKGKATLTAEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARNYY
ISSPWFAYWGQGTLVTVSS2F2_VH: SEQ ID NO:38

QVQLKQSGAELVTPGASVKMSCKASGYTFTTYPIEWMKQNHGKSLEWIG
NFHPYNDDTKYNEKFKGKATLTVEKSSNTVYLELSRLTSDDSAVYFCARR
VYYSYFWFGYWGHGTLVTVSS11B6_VH: SEQ ID NO:39

QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTTYPIEWMKQNHGKSLEWIG
NFHPYNGDSKYNEKFKGKATLTVEKSSSTVYLELSRLPSADSAIYYCARRH
YAASPWFAHWGQGTLVTVSS

Bảng 18: Các trình tự VH của kháng thể MASP-3 (các vùng CDR và FR, Kabat)

Kháng thể	HC FR1	HC CDR1
4D5	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
1F3	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
4B6	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
1A10	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:55)	SNDIN (SEQ ID NO:62)
10D12	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:71)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
35C1	QIQLVQSGPELKTPGETVKISCKASGYIFT (SEQ ID NO:78)	SYGIT (SEQ ID NO:79)
13B1	QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFT (SEQ ID NO:83)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
1G4	QVQLKQSGAELMKPGASVKLACKATGYTFT (SEQ ID NO:90)	GYWIE (SEQ ID NO:91)
2F5	EVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO:97)	SYWIT (SEQ ID NO:98)
1B11	QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:102)	DYYIN (SEQ ID NO:103)
1E7	QVQLKQSGPELARPWASVKISCQAFYTFSR (SEQ ID NO:108)	RVHFAIRDTNYWMQ (SEQ ID NO:109)
2F2	QVQLKQSGAELVTPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO:113)	TYPIE (SEQ ID NO:114)
11B6	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO:120)	TYPIE (SEQ ID NO:114)
2D7	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYTLT (SEQ ID NO:124)	DYYMN (SEQ ID NO:125)

49C11	EVQLQQSGPVLVKPGASGKMSCKASGYKFT (SEQ ID NO:131)	DYYMI (SEQID NO:132)
15D9	QVQLKQSGTELMKPGASVNLSCKASGYTFT (SEQ ID NO:136)	AYWIE (SEQ ID NO:137)

Kháng thể	HC FR2	HC CDR2
4D5	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
1F3	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGSIKYNEKFTD (SEQ ID NO:63)
4B6	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGTTKYNEEFTD (SEQ ID NO:67)
1A10	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDGTTKYNEKFTD (SEQ ID NO:69)
10D12	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
35C1	WVKQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:80)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
13B1	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGTGSTNYNEKFKG (SEQ ID NO:86)
1G4	WIKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:92)	EMLPGSGSTHYNEKFKG (SEQ ID NO:93)
2F5	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	DIYPGSGSTNYNEKFKS (SEQ ID NO:99)
1B11	WVKQRPGQGLEWIA (SEQ ID NO:104)	RIYPGSGNTYYNEKFKG (SEQ ID NO:105)
1E7	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO:110)
2F2	WMKQNHGKSLEWIG (SEQ ID NO:115)	NFHPYNDDTKYNEKFKG (SEQ ID NO:116)
11B6	WMKQNHGKSLEWIG (SEQ ID NO:115)	NFHPYNGDSKYNEKFKG (SEQ ID NO:121)

2D7	WVKQSHGKSLEWIG (SEQ ID NO:126)	DVNPNNDGTTYNQKFKG (SEQ ID NO:127)
49C11	WVKQSHGKSLEWIG (SEQ ID NO:126)	VIKIYNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:133)
15D9	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGSGTTNYNENFKD (SEQ ID NO:138)

Kháng thể	HC FR3	HC CDR3
4D5	KATLTVDTSSNTAYMDLHSLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:59)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
1F3	KATLTVDVSSSTAYMELHSLTSEDSAVYFCSG (SEQ ID NO:64)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
4B6	KATLTVDVSSSTAFMELHSLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:68)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
1A10	KATLTVDVSSSTAFMELHRLTSEDSAVYFCSS (SEQ ID NO:70)	VEDSY (SEQ ID NO:65)
10D12	RFAFSLETSARTPYLQINNLKNEDTATYFCAR (SEQ ID NO:75)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
35C1	RFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTTTYFCTR (SEQ ID NO:81)	GGDALDY (SEQ ID NO:82)
13B1	KATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSAMYYCLR (SEQ ID NO:87)	SEDV (SEQ ID NO:88)
1G4	KATFTADTSSNTAYMQLSGLTTEDSAIYYCVR (SEQ ID NO:94)	SIDY (SEQ ID NO:95)
2F5	KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:100)	RRYYATAWFAY (SEQ ID NO:101)
1B11	KATLTAEKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR (SEQ ID NO:106)	NYYISSPWFAY (SEQ ID NO:107)
1E7	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAS (SEQ ID NO:111)	GSHYFDY (SEQ ID NO:112)
2F2	KATLTVEKSSNTVYLELSRLTSDDSAVYFCAR (SEQ ID NO:117)	RVYYSYFWFGY (SEQ ID NO:118)
11B6	KATLTVEKSSSTVYLELSRLPSADSAIYYCAR	RHYAASPWFAH

	(SEQ ID NO:122)	(SEQ ID NO:123)
2D7	RATLTVDKSSNTASMELRSLTSEDSAVYYCAI (SEQ ID NO:128	CPFYYLGKGTHFDY (SEQ ID NO:129)
49C11	KATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:134)	GPSLYDYDPYWYFDV (SEQ ID NO:135)
15D9	RATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAIYYCAR (SEQ ID NO:139)	SYYYASRWFAF (SEQ ID NO:140)

Kháng thể	HC FR4	
4D5	WGQGTLVAVSS (SEQ ID NO:61)	
1F3	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
4B6	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1A10	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
10D12	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:77)	
35C1	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:77)	
13B1	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	
1G4	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:96)	
2F5	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1B11	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
1E7	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:96)	
2F2	WGHGTLVTVSS (SEQ ID NO:119)	
11B6	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	
2D7	WGQGTSLTVSS (SEQ ID NO:130)	
49C11	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	

15D9	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:66)	

Được thể hiện dưới đây là các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) đối với kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao. Các CDR theo Kabat được gạch chân. Các vùng này là như nhau bất kể được đánh số theo hệ thống Kabat hay Chothia.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ: 4D5_VL: SEQ ID NO:40

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSP
KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLY
TFGGGTKLEIKR1F3_VL: SEQ ID NO:41

DIVMTQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLISRTRKNYLSWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTF
GGGTKLEIKR4B6_VL: SEQ ID NO:42 (tương tự đối với 1A10_VL)

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLISRTRKNYLSWYQQKPGQSPK
LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLYTF
GGGTKLEIKR10D12_VL: SEQ ID NO:43

DVLMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRL
IYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPWTF
GGGTKLEIKR35C1_VL: SEQ ID NO:44

DIVMTQAPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLSWLLQRPGQSPKRLI
YLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFG
GGTKLEIKR13B1_VL: SEQ ID NO:45

DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSP
KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNIPT
FGGGTKLEIKR1G4_VL: SEQ ID NO:46

DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQSLVQSNGNTYLHWYLQKPGQSPKL
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTF
GGGTKLEIKR1E7_VL: SEQ ID NO:47

DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHWYQQRTNGSPRLLIKYASES
ISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEIK
R2D7_VL: SEQ ID NO:48

DIQMTQTPASLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWYQQKPNGTVKLLVFYT
SRLHSGVPSRFSGSGSGAEHSLTISNLEQEDVATYFCQQGFTLPWTFGGGTK
VEIKR49C11_VL:SEQ ID NO:49

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASFSCRSSQSLIHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKL
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTF
GGGTKLEIKR15D9_VL: SEQ ID NO:50

DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCRASQNVGPNLAWYQQKPGQSPKALIYS
ASYRFSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNRYPFTFGSGT
KLEIKR2F5_VL: SEQ ID NO:51

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLISS
ASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDVADYFCQQYNSYPLTFGAG
TKLELKR1B11_VL: SEQ ID NO:52

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGPNVAWYQQKPGQSPKALIYS
ASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYNRYPLTFGAG
TKLELKR2F2_VL: SEQ ID NO:53

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTCKASQNVGTHVAWYQQKPGQSPKALIY
SASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPRALTFG
AGTKLELKR11B6_VL: SEQ ID NO:54

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTCKASQNVGPTVAWYQQKPGQSPKALIYS
ASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVHSEDLAEYFCQQYNSYPFTFGSGT
KLEIKR

Bảng 19: Trình tự VL của kháng thể MASP-3 (các vùng CDR và FR, Kabat và Chothia)

Kháng thể	LC FR1	LC CDR1
4D5	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTC (SEQ ID NO:141)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
1F3	DIVMTQSPSSLAVSAGERVTMSC (SEQ ID NO:148)	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
4B6	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
1A10*	[4B6 LC được sử dụng: SEQ ID NO:151]	[4B6 LC được sử dụng: SEQ ID NO:149]
10D12	DVLMTQTPLTLSVTIGQPASISC (SEQ ID NO:152)	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
35C1	DIVMTQAPLTLSVTIGQPASISC (SEQ ID NO:158)	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
13B1	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
1G4	DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISC (SEQ ID NO:162)	RSSQSLVQSNGNTYLH (SEQ ID NO:163)
2F5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC (SEQ ID NO:168)	KASQNVGTAVA (SEQ ID NO:169)
1B11	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC (SEQ ID NO:175)	KASQNVGPNVA (SEQ ID NO:176)
1E7	DIQLTQSPAILSVSPGERVSFSC (SEQ ID NO:181)	RASQSIGTSIH (SEQ ID NO:182)
2F2	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTC (SEQ ID NO:187)	KASQNVGTHVA (SEQ ID NO:188)
11B6	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTC (SEQ ID NO:187)	KASQNVGPTVA (SEQ ID NO:191)
2D7	DIQMTQTPASLSASLGDRVTISC (SEQ ID NO:195)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO:196)
49C11	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASFSC (SEQ ID NO:202)	RSSQSLIHSNGNTYLH (SEQ ID NO:203)
15D9	DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTC (SEQ ID NO:205)	RASQNVGPNLA (SEQ ID NO:206)

Kháng thể	LC FR2	LC CDR2
4D5	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1F3	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4B6	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1A10	[4B6 LC được sử dụng: SEQ ID NO:143]	[4B6 LC được sử dụng: SEQ ID NO:144]
10D12	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
35C1	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
13B1	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1G4	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:164)	KVSNRFS (SEQ ID NO:165)
2F5	WYQQKPGQSPKLLIS (SEQ ID NO:170)	SASNRYT (SEQ ID NO:171)
1B11	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
1E7	WYQQRTNGSPRLLIK (SEQ ID NO:183)	YASESIS (SEQ ID NO:184)
2F2	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
11B6	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRYS (SEQ ID NO:178)
2D7	WYQQKPNGTVKLLVF (SEQ ID NO:197)	YTSRLHS (SEQ ID NO:198)
49C11	WYLQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:164)	KVSNRFS (SEQ ID NO:165)
15D9	WYQQKPGQSPKALIY (SEQ ID NO:177)	SASYRFS (SEQ ID NO:207)

Kháng thể	LC FR3	LC CDR3
4D5	GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:145)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1F3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)

4B6	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1A10	[4B6 LC được sử dụng: SEQ ID NO:150]	[4B6 LC được sử dụng: SEQ ID NO:146]
10D12	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
35C1	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPYT (SEQ ID NO:160)
13B1	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
1G4	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO:166)	SQSTHVPPT (SEQ ID NO:167)
2F5	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDVADYFC (SEQ ID NO:172)	QQYNSYPLT (SEQ ID NO:173)
1B11	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC (SEQ ID NO:179)	QQYNRYPLT (SEQ ID NO:180)
1E7	GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC (SEQ ID NO:185)	QQSNSWPYT (SEQ ID NO:186)
2F2	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO:189)	QQYNSYPRALT (SEQ ID NO:190)
11B6	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVHSEDLAEYFC (SEQ ID NO:192)	QQYNSYPFT (SEQ ID NO:193)
2D7	GVPSRFSGSGSGAEHSLTISNLEQEDVATYFC (SEQ ID NO:199)	QQGFTLPWT (SEQ ID NO:200)
49C11	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC (SEQ ID NO:166)	SQSTHVPWT (SEQ ID NO:204)
15D9	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC (SEQ ID NO:189)	QQYNRYPFT (SEQ ID NO:208)

Kháng thể	LC FR4	
4D5	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1F3	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
4B6	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1A10	[4B6 LC được sử dụng: SEQ ID NO:147]	
10D12	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
35C1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
13B1	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
1G4	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
2F5	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
1B11	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
1E7	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
2F2	FGAGTKLELKR (SEQ ID NO:174)	
11B6	FGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:194)	
2D7	FGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:201)	
49C11	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
15D9	FGSGTKLEIKR (SEQ ID NO:194)	

*Lưu ý: chuỗi nhẹ đối với mAb 1A10 không được nhận biết, vì thế chuỗi nhẹ từ 4B6 được sử dụng với 1A10 HC.

Bảng 20: Các trình tự liên ứng đối với CDR của HC nhóm IA

Kháng thể	Vùng	Trình tự
4D5	HC-CDR1	TDDIN (SEQ ID NO:56)
1F3	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
4B6	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
1A10	HC-CDR1	SNDIN (SEQ ID NO:62)
Liên ứng	HC-CDR1	XXDIN (SEQ ID NO:209) trong đó X ở vị trí 1 là S hoặc T; và X ở vị trí 2 là N hoặc D
4D5	HC-CDR2	WIYPRDDRTKYNDKFKD (SEQ ID NO:58)
1F3	HC-CDR2	WIYPRDGSIKYNEKFTD (SEQ ID NO:63)
4B6	HC-CDR2	WIYPRDGTTKYNEEFTD (SEQ ID NO:67)
1A10	HC-CDR2	WIYPRDGTTKYNEKFTD (SEQ ID NO:69)
Liên ứng	HC-CDR2	WIYPRDXXXKYNXXFXD (SEQ ID NO:210) trong đó X ở vị trí 7 là G hoặc D; X ở vị trí 8 là S, T hoặc R; X ở vị trí 9 là I hoặc T; X ở vị trí 13 là E hoặc D; X ở vị trí 14 là K hoặc E; X ở vị trí 16 là T hoặc K
4D5	HC-CDR3	LEDTY (SEQ ID NO:60)
1F3	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
4B6	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
1A10	HC-CDR3	VEDSY (SEQ ID NO:65)
Liên ứng	HC-CDR3	XEDXY (SEQ ID NO:211) trong đó X ở vị trí 1 là L hoặc V, và trong đó X ở vị trí 4 là T hoặc S

Bảng 21: Các trình tự liên ứng đối với CDR của LC nhóm IA

Kháng thể	Vùng	Trình tự
4D5	LC-CDR1	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
4D5-NQ	LC-CDR1	KSSQSLLQSRTRKNYLA (SEQ ID NO:257)
4D5-NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
4D5-ST	LC-CDR1	KSSQSLLNTRTRKNYLA (SEQ ID NO:259)
1F3	LC-CDR1	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
4B6	LC-CDR1	KSSQSLLISRTRKNYLS (SEQ ID NO:149)
Liên ứng*	LC-CDR1	KSSQSLLXXRTRKNYLX (SEQ ID NO:212) trong đó X ở vị trí 8 là N, I, Q hoặc A;

		trong đó X ở vị trí 9 là S hoặc T; và trong đó X ở vị trí 17 là A hoặc S
4D5	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
1F3	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4B6	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
Liên ứng	LC-CDR2	WASTRES (SEQ ID NO:144)
4D5	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
1F3	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
4B6	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
Liên ứng	LC-CDR3	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)

*Lưu ý: Các trình tự liên ứng CDR-L1 bao gồm các biến thể được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 19.

Bảng 22: Các trình tự liên ứng đối với CDR của HC nhóm IB

Kháng thể	Vùng	Trình tự
10D12	HC-CDR1	SYGMS (SEQ ID NO:72)
35C1	HC-CDR1	SYGIT (SEQ ID NO:79)
Liên ứng	HC-CDR1	SYGXX (SEQ ID NO:213) trong đó X ở vị trí 4 là M hoặc I; và trong đó X ở vị trí 5 là S hoặc T
10D12	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
35C1	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
Liên ứng	HC-CDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:74)
10D12	HC-CDR3	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
35C1	HC-CDR3	GGDALDY (SEQ ID NO:82)
Liên ứng	HC-CDR3	GGXAXDY (SEQ ID NO:214) trong đó X ở vị trí 3 là E hoặc D; và trong đó X ở vị trí 5 là M hoặc L

Bảng 23: Các trình tự liên ứng đối với CDR của LC nhóm IB

Kháng thể	Vùng	Trình tự
10D12	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
10D12-DE	LC-CDR1	KSSQSLLDSEGKTYLN (SEQ ID NO:261)

10D12-DA	LC-CDR1	KSSQSLLDSAGKTYLN (SEQ ID NO:262)
10D12-GA	LC-CDR1	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:263)
35C1	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
Liên ứng*	LC-CDR1	KSSQSLLDSXXKTYLX (SEQ ID NO:215) Trong đó X ở vị trí 10 là D, E hoặc A; Trong đó X ở vị trí 11 là G hoặc A; và trong đó X ở vị trí 16 là N hoặc S
10D12	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
35C1	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
Liên ứng	LC-CDR2	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
10D12	LC-CDR3	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
35C1	LC-CDR3	WQGTHFPYT (SEQ ID NO:160)
Liên ứng	LC-CDR3	WQGTHFPXT (SEQ ID NO: 216) Trong đó X ở vị trí 8 là W hoặc Y

*Lưu ý: Các trình tự liên ứng CDR-L1 bao gồm các biến thể được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 19.

ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mAb chuột nhắt:

SEQ ID NO:217: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 4D5 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT
TCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAACCGACG
ATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTG
GATGGATTTATCCTAGAGATGATAGAACTAAGTACAATGACAAGTTCA
AGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCTTCCAACACAGCGTACA
TGGACCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTC
AAGCCTCGAGGATACTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCGCTGTCTCT
TCA

SEQ ID NO:218: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 1F3 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT
TCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACG

ATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTG
GATGGATTTATCCTAGAGATGGGAGTATTAAATATAATGAGAAATTCAC
GGACAAGGCCACATTGACAGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTACAT
GGAGCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCA
GGTGTCGAGGATTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTT
CA

SEQ ID NO:219: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 4B6 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCT
TCAGTGAAATTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACG
ATATAAACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTG
GATGGATTTATCCTAGAGATGGTACTACTAAGTACAATGAGGAGTTCAC
GGACAAGGCCACATTGACTGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTTCATG
GAGCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTTCAA
GTGTCGAGGATTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTC
A

SEQ ID NO:220: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 1A10 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT
TCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAACG
ATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTG
GATGGATTTATCCTAGAGATGGTACTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAC
GGACAAGGCCACATTGACTGTTGACGTATCCTCCAGCACAGCGTTCATG
GAGCTCCACAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTTCAA
GTGTCGAGGATTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTC
A

SEQ ID NO:221: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 10D12 (bố mẹ)

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAG
ACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATATTTTCACAAGCTATG
GAATGAGCTGGGTGAGACAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGG

GCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATGCTGATGACTTCAA
GGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGAACTCCCTATTTGC
AGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGCGCAA
GAGGGGGCGAAGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG
TCTCCTCA

SEQ ID NO:222: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 35C1 (bố mẹ)

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGACGCCAGGAGAG
ACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATATCTTCACATCCTATG
GAATTACCTGGGTGAAACAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGG
GCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATGCTGATGACTTCAA
GGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACGTCTGCCAGCACTGCCTATTTGC
AGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGACTACATATTTCTGTACAA
GAGGGGGTGATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG
TCTCCTCA

SEQ ID NO:223: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 13B1 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCC
TCAGTGAAGCTTTCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCACTGGCAAGT
GGATAGAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACATGGCCTAGAGTGGATTG
GAGAGATTTTACCTGGAACTGGTAGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAA
GGGCAAGGCCACATTCACTGCAGACTCATCCTCCAACACAGCCTACATG
CAACTCAGCAGCCTGACAACTGAAGACTCTGCTATGTATTATTGTTTAA
GATCCGAGGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:224: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 1G4 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCC
TCAGTGAAGCTTGCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCACTGGCTACT
GGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTG
GAGAGATGTTACCTGGAAGTGGTAGTACTCACTACAATGAGAAGTTCA
AGGGTAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACAT

GCAACTCAGCGGCCTGACAACTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGTA
AGAAGCATAGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:225: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 1E7 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGCAAGGCCTTGGGCT
TCAGTGAAGATATCCTGCCAGGCTTTCTACACCTTTTCCAGAAGGGTGC
ACTTTGCCATTAGGGATACCAACTACTGGATGCAGTGGGTAAAACAGA
GGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATCGGGGCTATTTATCCTGGAAATG
GTGATACTAGTTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTG
CAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATC
TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCATCCGGTAGCCACTACTTTGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:226: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 2D7 (bố mẹ)

GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGGCCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCT
TCAGTGAAGGTATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGCTCACTGACTACT
ACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTG
GAGATGTTAATCCTAACAATGATGGTACTACCTACAACCAGAAATTCAA
GGGCAGGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTTCCAACACAGCCTCCATG
GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTACTACTGTGCAA
TATGCCCCTTTTATTACCTCGGTAAAGGGACCCACTTTGACTACTGGGG
CCAAGGCACCTCTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:227: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 49C11 (bố mẹ)

GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGTGCTGGTGAAGCCTGGGGCTT
CAGGGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGATACAAATTCACTGACTACTA
TATGATCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG
AGTTATTAAAATTTATAACGGTGGTACGAGCTACAACCAGAAGTTCAAG
GGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGG
AGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAG
AGGGCCATCTCTCTATGATTACGACCCTTACTGGTACTTCGATGTCTGG
GGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:228: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 15D9 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGAACTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCC
TCAGTGAACCTTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACTGCCTACTG
GATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGG
AGAGATTTTACCTGGAAGTGGTACTACTAACTACAATGAGAACTTCAAG
GACAGGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACATGC
AACTCAGCAGCCTGACAAGTGAGGACTCTGCCATCTATTACTGTGCAAG
ATCCTATTACTACGCTAGTAGATGGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACT
CTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:229: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 2F5 (bố mẹ)

GAGGTCCAGCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCT
TCAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACT
GGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTG
GAGATATTTATCCTGGTAGTGGTAGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAA
GAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACAT
GCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCA
AGAAGGAGATACTACGCTACGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGG
ACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:230: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 1B11 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCT
TCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCACTGACTACT
ATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTG
CAAGGATTTATCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGAAGTTCAA
GGGCAAGGCCACACTGACTGCAGAAAAATCCTCCAGCACTGCCTACAT
GCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCA
AGAAATTACTACATTAGTAGTCCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGA
CTCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:231: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 2F2 (bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTAGTGACGCCTGGAGCC
TCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTATC
CTATAGAGTGGATGAAACAGAATCATGGAAAGAGCCTAGAGTGGATTG
GAAATTTTCATCCTTACAATGATGATACTAAGTACAATGAAAAGTTCAA
GGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAAAAATCCTCTAACACAGTCTACTTG
GAGCTCAGCCGATTAACATCTGATGACTCTGCTGTTTATTTCTGTGCAA
GGAGGGTCTACTATAGTTACTTCTGGTTTGGTTACTGGGGCCACGGGAC
TCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID NO:232: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng 11B6 (Bố mẹ)

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTAGTGAAACCTGGAGCC
TCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTATC
CTATAGAGTGGATGAAGCAGAATCATGGGAAGAGCCTAGAGTGGATTG
GAAATTTTCATCCTTACAATGGTGATTCTAAGTACAATGAAAAGTTCAA
GGGCAAGGCCACCTTGACTGTAGAAAAATCCTCTAGCACAGTCTACTTA
GAACTCAGCCGATTACCATCTGCTGACTCTGCTATTTATTACTGTGCAA
GGAGGCACTACGCTGCTAGTCCCTGGTTTGCTCACTGGGGCCAAGGGAC
TCTGGTCACTGTCTCTTCA

ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (mAb chuột nhắt):

SEQ ID NO:233: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 4D5 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAG
AGAAGGTCACTATGACCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTA
GAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGT
CTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCC
TGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCTCTCTCACCATC
AGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTT
ATAATCTGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:234: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 1F3 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAG
AGAGGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCATCAGTAG
AACCCGAAAGAACTATTTGTCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTC
TCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCT
GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA
GCAGTGTACAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTA
TAATCTGTACACGTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:235: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 4B6/1A10 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAG
AGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCATCAGTAG
AACCCGAAAGAACTATTTGTCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTC
TCCTAAACTGCTGATCTATTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCT
GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA
GCAGTGTACAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAACAATCTTA
TAATCTGTACACGTTCGGCGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:236: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 10D12 (bố mẹ)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGAC
AACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGA
TGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCA
AAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACA
GGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACA
TTTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:237: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 35C1 (bố mẹ)

GATATTGTGATGACGCAGGCTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGAC
AACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGA
TGGAAAGACATATTTGAGTTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCA
AAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACA
GGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACA
TTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:238: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 13B1 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAG
AGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTA
GAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGT
CTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCC
TGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTT
ATAATATTCCGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:239: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 1G4 (bố mẹ)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG
AACAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCAAGTCAGAGCCTTGTACAAAGTAA

TGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCA
AAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACA
GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACA
TGTTCCTCCGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:240: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 1E7 (bố mẹ)

GACATCCAGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAG
AAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTGGCACAAGCA
TACACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAA
GTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGA
TATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCGTACACGTTC
GGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:241: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2D7 (bố mẹ)

GATATCCAGATGACACAGACTCCAGCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAG
ACAGAGTCACCATCAGTTGTAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTTTTT
AAACTGGTATCAACAGAAACCGAATGGAACTGTTAAACTCCTAGTCTTC
TACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG
GGTCTGGAGCAGAGCATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAGGAAG
ATGTTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTTTTACGCTTCCGTGGACGTTC
GGTGGGGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:242: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 49C11(bố mẹ)

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG
ATCAAGCCTCCTTCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTATACACAGTAA
TGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCA
AAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACA
GGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCA

GAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACA
TGTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:243: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 15D9 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAATAGGAG
ACAGGGTCAGCGTCACCTGCAGGGCCAGTCAGAATGTGGGTCCCAATTT
AGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTAC
TCGGCATCCTACCGATTCAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG
GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGA
CTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGGTATCCATTCACGTTC
GGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:244: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2F5 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAG
ACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTGCTG
TAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTC
CTCGGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAATATGCAGTCTGAAG
ACGTGGCAGATTATTTCTGCCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTT
CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:245: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 1B11 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACTTCAGTAGGAG
ACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTCCTAATG
TAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTA
CTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGACTATTTCTGTCAGCAATATAACCGCTATCCTCTCACGTTC
GGTGCTGGGACCAAACTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:246: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 2F2 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAG
ACAGGGTCAACGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTCATG
TAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTA
CTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGCGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
ACCTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCGAGCGCT
CACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

SEQ ID NO:247: ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ 11B6 (bố mẹ)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAG
ACAGGGTCAACGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTCCTACTGT
AGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTAATTTAC
TCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG
GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCACTCTGAAGA
CTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATTCACGTTC
GGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGGSEQ ID NO:310: vùng hằng định IgG4 của người

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:311: vùng hằng định IgG4 của người có đột biến S228P

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSLGKSEQ ID NO:312: vùng hằng định IgG4 của người có đột biến S228P và và cả đột biến (Xtend) mà thúc đẩy các tương tác FcRn ở độ pH thấp

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VLHEALHSHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO:313: vùng hằng định IgK của người

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGECVí dụ 16

Ví dụ này mô tả đặc tính chức năng của tái tổ hợp kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được tinh chế trong một vài thử nghiệm *in vitro*.

Phương pháp

MASP-3 mAb tái tổ hợp được tạo ra như được mô tả trong các ví dụ 11 và 14 được đặc trưng để (i) liên kết với MASP-3 của người và MASP-3 của các loài khác; (ii) khả năng ức chế sự phân cắt của cơ chất nhân tạo; (iii) khả năng ức chế tiền yếu tố D với sự phân cắt yếu tố D; (iv) ức chế sự kết lắng bổ thể trong huyết thanh của người và (v) ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ trong huyết thanh của người như sau:

1. Thử nghiệm xác định sự liên kết với MASP-3 của người và chuột nhắt

Thử nghiệm ELISA:

Thử nghiệm liên kết của MASP-3 với MASP-3 mAb tái tổ hợp được tinh chế:

MASP-3 của người

Thử nghiệm ELISA kẹp được tiến hành để đánh giá sự liên kết của 16 kháng thể MASP-3 tái tổ hợp được tinh chế với MASP-3 của người (mảnh CCP1-CCP2-SP) như sau. Đĩa ELISA được phủ trong dung dịch đệm cacbonat/bi-cacbonat qua đêm ở nhiệt độ 4°C với kháng thể thu giữ αM3-259 ở 4 µg/mL. αM3-259 là MASP-3 mAb khảm của người-gà, tái tổ hợp ái lực cao từ gà được gây miễn dịch bằng vùng CCP1-CCP2-SP của MASP-3 của người. Các nghiên cứu lập bản đồ miền cho thấy rằng αM3-259 liên kết vùng CCP1-CCP2 của MASP-3 từ nhiều loài, bao gồm người, khỉ đuôi dài, chuột nhắt, chuột cống và chó. Như được thể hiện trên Fig.51C, αM3-259 cũng liên kết với MASP-1. Đĩa này được phong bế sau đó bằng 1% BSA/PBS, được rửa trong PBS và sau đó được ủ trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng với MASP-3 CCP1-CCP2-SP (2 µg/mL). Đĩa này sau đó được rửa (PBS-T, 0,05%) và kháng thể MASP-3 ứng viên được bổ sung vào sau khi ủ một giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa này được rửa (PBS-T, 0,05%) và kháng thể dò được bổ sung vào (kháng thể từ chuột nhắt kháng kapa-HRP của người, SouthernBiotech #9230-05) trong thời gian một giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau một lần rửa nữa (PBS-T, 0,05%), đĩa này được làm hiện ảnh (5 phút) bằng OPT EIA TMB (BD Biosciences #555214). Việc đọc độ hấp thụ ở A450 được đo bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Spectramax M5e.

Kết quả

Fig.51A và Fig.51B minh họa bằng đồ thị các ái lực của MASP-3 mAb (tái tổ hợp được tinh chế) đối với MASP-3 của người (CCP1-CCP2-SP). Như được thể hiện trên Fig.51A, Fig.51B, và trong bảng 24, MASP-3 mAb có ái lực cao với MASP-3 của người, nằm trong khoảng từ 0,241 nM đến 0,023 nM. Các giá trị này thấp hơn từ 10 đến 100 lần so với các giá trị được báo cáo cho các MASP-3 mAb được mô tả trước đây (xem Ví dụ 7 trong bản mô tả, cũng được công bố như trong Ví dụ 15 trong WO2013/192240). Tính đặc hiệu liên kết của MASP-3 mAb:

Để xác định tính đặc hiệu của MASP-3 mAb có ái lực cao đối với MASP-3, các thử nghiệm liên kết được tiến hành để đánh giá sự liên kết của 16 kháng thể MASP-3 tái tổ hợp được tinh chế với MASP-1 của người và với MASP-2 của người. Sự liên kết được xác định như được mô tả đối với ELISA liên kết MASP-1, ngoại trừ MASP-1A tái tổ hợp (mảnh S646A, CCP1-CCP2-SP) và MASP-2 (mảnh CCP1-CCP2-SP) được cố định trực tiếp trên đĩa.Kết quả:

Fig.51C minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm liên kết trong đó các kháng thể ức chế MASP-3 của người có ái lực cao tái tổ hợp được tinh chế tiêu biểu đã cho thấy là có chọn lọc trong việc liên kết với MASP-3 và không liên kết với MASP-1 của người.

Fig.51D minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm liên kết trong đó các kháng thể ức chế MASP-3 của người có ái lực cao tái tổ hợp được tinh chế tiêu biểu đã cho thấy là có chọn lọc trong việc liên kết với MASP-3 và không liên kết với MASP-2 của người.MASP-3 của chuột nhắt:

Liên kết của MASP-3 mAb với MASP-3 của chuột nhắt được đo như được mô tả ở trên đối với MASP-3 của người ngoại trừ việc MASP-3 của chuột nhắt tái tổ hợp, chiều dài đầy đủ (SEQ ID NO:3) được thu giữ trên đĩa với αM3-259. mAb đối chứng âm được sử dụng trong cả hai thử nghiệm là mAb77, mAb khảm của gà-người, tái tổ hợp thu được từ gà đã được gây miễn dịch giống với αM3-259, tuy nhiên, mAb 77 không liên kết với MASP-3 của chuột nhắt.

Kết quả

Fig.52 minh họa bằng đồ thị các ái lực của các MASP-3 mAb tiêu biểu (tái tổ hợp được tinh chế) đối với MASP-3 của chuột nhắt có chiều dài đầy đủ. Như được thể hiện trên Fig.52, hầu hết các MASP-3 mAb được thử nghiệm cũng đều có ái lực cao đối với MASP-3 của chuột nhắt.

Các giá trị ái lực (EC50) của 16 MASP-3 mAb khảm tái tổ hợp đối với MASP-3 của người và chuột nhắt được tóm tắt trong bảng 24.

Bảng 24: Ái lực liên kết của các MASP-3 mAb đối với MASP-3 của người và chuột nhắt (Fig.51A, Fig.51B và Fig.52)

Dòng vô tính của kháng thể	Kháng nguyên được sử dụng để tạo ra mAb	Ái lực liên kết của MASP-3 của người (CCP1-CCP2-SP) (EC_{50} nM)	Ái lực liên kết của MASP-3 của chuột nhắt (chiều dài đầy đủ) (EC_{50} nM)
1A10*	SP	0,241	0,15
1B11	SP	0,059	1,10
1E7	SP	0,112	117,00
1F3	SP	0,236	0,111
1G4	SP	0,177	3,70
2D7	SP	0,122	NA
2F2	SP	0,057	0,105
2F5	SP	0,073	0,102
4B6	SP	0,211	0,188
4D5	SP	0,058	0,098
10D12	CCP1-CCP2-SP	0,089	0,081
11B6	CCP1-CCP2-SP	0,060	0,066
13B1	CCP1-CCP2-SP	0,059	0,035
15D9	CCP1-CCP2-SP	0,074	0,092
35C1	CCP1-CCP2-SP	0,091	0,209
49C11	CCP1-CCP2-SP	0,069	0,064

Ba trong số các MASP-3 mAb- 13B1, 10D12 và 4D5 - cũng được thử nghiệm về sự liên kết với MASP-3 tái tổ hợp của khỉ đuôi dài, chó, và chuột cống. Các kết quả này được tóm tắt dưới đây trong bảng 25.

Bảng 25: Tóm tắt các thử nghiệm liên kết loài chéo của MASP-3 mAb

Các loài của MASP-3	Xếp loại liên kết Fab
Người	13B1 (pM) ≈ 10D12 (pM) ≈ 4D5 (pM)
Khỉ đuôi dài	13B1 (pM) ≈ 4D5 (pM) > 10D12 (pM)
Chó	13B1 (pM) > 10D12 (pM) >> 4D5 (nM)

Chuột cống	13B1 (pM) ≈ 10D12 (pM) >> 4D5 (nM)
Chuột nhắt	10D12 (pM) > 13B1 (pM) >> 4D5 (nM)

Như được thể hiện trong bảng 25, các MASP-3 mAb 13B1, 10D12 và 4D5 liên kết với tất cả năm loài của MASP-3 được thử nghiệm (người, chuột nhắt, chuột cống, chó và khỉ đuôi dài). Trong khi các mAb này liên kết với người bằng ái lực cao (≤500 pM), chúng liên kết với các loài khác của MASP-3 với các ái lực thay đổi.

2. Thử nghiệm sự phân cắt tripeptit sinh huỳnh quang

Bối cảnh/cơ sở lý luận

Ngoài cơ chất tự nhiên đã biết của nó (Iwaki et al., *J. Immunol.* 187:3751, 2011; Cortesio and Jiang, *Arch. Biochem. Biophys*. 449:164-170, 2006), MASP-3 đã cho thấy là thủy phân các cơ chất tripeptit khác nhau (Cortesio and Jiang, Ibid.). Do các cơ chất rất nhỏ, nên các phân tử này có thể được sử dụng để lập bản đồ điểm xúc tác của proteaza. Việc ức chế sự phân cắt của tri-peptit là một dấu hiệu cho thấy chất ức chế, như kháng thể, ngăn chặn trực tiếp sự tiếp cận của cơ chất nhỏ này với điểm xúc tác hoặc gây ra sự dịch chuyển cấu hình trong miền SP mà tương tự từ chối sự tiếp cận. Như vậy, kháng thể này cũng có thể được mong đợi là ngăn chặn sự xúc tác của các cơ chất tự nhiên lớn bằng cách cản trở vị trí hoạt hóa của enzym. Về mặt chức năng, điều này sẽ gần đúng nhất với chuột nhắt hoặc bệnh nhân 3MC không có MASP-3 (thiếu hụt MASP-3).Phương pháp:

Các lần chuẩn độ của mAb tái tổ hợp (3 lần pha loãng từ 666 nM thành 0,91 nM) được ủ với MASP-3 CCP1-CCP2-SP (197 nM) trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Cơ chất tri-peptit BOC-V-P-R-AMC (t-Butyloxycacbonyl-Val-Pro-Arg-7-Amino-4-metylcoumarin) (R&D Systems, Cat. No. ES011) được bổ sung vào ở nồng độ cuối cùng bằng 0,2 mM. Việc thủy phân liên kết Arg-AMC amit làm giải phóng AMC, một nhóm huỳnh quang cao. Các giá trị động lực kích thích 380nm/bức xạ 460nm được ghi lại 5 phút một lần ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 70 phút bằng cách sử dụng máy đọc đĩa huỳnh quang Spectramax M5e.

Kết quả

Fig.53 minh họa bằng đồ thị các kết quả của thử nghiệm đo mức ức chế sự phân cắt tripeptit sinh huỳnh quang phụ thuộc vào MASP-3 với các kháng thể đơn dòng MASP-3.

Như được thể hiện trên Fig.53, MASP-3 mAb được thử nghiệm rơi vào ba nhóm riêng biệt:

1. MASP-3 mAb là các chất ức chế sự phân cắt peptit mạnh bằng MASP-3:

   1A10 (29,77 nM), 1G4 (29,64 nM), 1F3 (32,99 nM), 4B6 (26,03 nM), 4D5 (27,54 nM), 10D12 (30,94 nM) và 13B1 (30,13 nM).

2. MASP-3 mAb là các chất ức chế sự phân cắt peptit yếu hoặc rất yếu bằng MASP-3: 15D9, 11B6, 2F5, 1E7 và 2D7

3. MASP-3 mAb là trung tính hoặc có mặt để kích thích sự phân cắt peptit bằng MASP-3: 1B11; 2F2; 77 (mAb đối chứng)

3. Ức chế sự phân cắt tiền yếu tố D thành yếu tố D

Phương pháp

Protein MASP-3 tái tổ hợp của người, có hoạt tính (240 ng mỗi phản ứng) được ủ trước với MASP-3 mAb tiêu biểu và mAb đối chứng (mà liên kết với MASP-1 nhưng không liên kết với MASP-3) trong dung dịch đệm GVB++ với tổng thể tích bằng 9 µL ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 15 phút. Sau đó 70 ng tiền yếu tố D với đuôi epitop Strep-tag II đầu tận N (ST-tiền yếu tố D-His) được bổ sung vào mỗi ống để tạo ra thể tích cuối cùng cho mỗi hỗn hợp phản ứng là 10 µL. Các hỗn hợp phản ứng được ủ trong máy luân nhiệt ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 6 giờ. Một phần mười từ mỗi hỗn hợp phản ứng sau đó được điện di trên Bis-Tris gel 12% để phân giải tiền yếu tố D và sản phẩm phân cắt yếu tố D có hoạt tính. Các protein đã được phân giải được chuyển vào màng PVDF và được phân tích bằng cách sử dụng thẩm tách Tây nhờ sự phát hiện bằng kháng thể yếu tố D được biotin hóa (R&D Systems).

Kết quả

Fig.54 thể hiện phân tích thẩm tách Tây chứng minh khả năng của các MASP-3 mAb tiêu biểu trong việc phong bế sự phân cắt qua trung gian MASP-3 tái tổ hợp của tiền CFD thành CFD trong thử nghiệm *in vitro*. Như được thể hiện trên Fig.54, các mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu 13B1, 4B6, 1G4, 2D7, 10D12, 1A10, 4D5, 1E7, và mAb khảm của người-chuột nhắt 1F3 thể hiện sự ức chế từ một phần đến toàn bộ sự phân cắt tiền CFD trong thử nghiệm này.

4. Thử nghiệm sự kết lắng yếu tố Bb trên Zymosan

Phương pháp

Các nồng độ khác nhau của MASP-3 mAb được bổ sung vào huyết thanh của người đã rút cạn CFD 10% (Complement Technology A336) và GVB + Mg/EGTA (20 nM) và được ủ trong thời gian 30 phút trên nước đá trước khi bổ sung ST-tiền yếu tố D-His tái tổ hợp (2 µg/mL cuối cùng) và zymosan (0,1 mg/mL cuối cùng) vào. Các hạt zymosan hoạt động như bề mặt hoạt hóa đối với sự kết lắng bổ thể. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C và hoạt tính APC được đo bằng phương pháp dò đếm tế bào theo dòng chảy của yếu tố Bb bổ thể (Quidel antibody A252) trên bề mặt của các hạt zymosan.

Kết quả

Fig.55A minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng của yếu tố Bb trên các hạt zymosan (được xác định bằng cách dò đếm tế bào theo dòng chảy được đo theo đơn vị MFI) khi có mặt các nồng độ khác nhau của các MASP-3 mAb 1F3, 1G4, 2D7 và 4B6 trong huyết thanh của người đã rút cạn yếu tố D ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 70 phút.

Fig.55B minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng của yếu tố Bb trên các hạt zymosan (được xác định bằng cách dò đếm tế bào theo dòng chảy được đo theo đơn vị MFI) khi có mặt các nồng độ khác nhau của các MASP-3 mAb 4D5, 10D12 và 13B1 trong huyết thanh của người đã rút cạn CFD ở nhiệt 37°C trong thời gian 70 phút.

Các kết quả được thể hiện trong Fig.55A và Fig.55B được tóm tắt dưới đây trong bảng 26.

Bảng 26: Ức chế sự kết lắng của yếu tố Bb lên zymosan bằng các MASP-3 mAb (Fig.55A và Fig.55B)

Kháng thể	Ức chế sự kết lắng của yếu tố Bb trên Zymosan (IC_{50} nM)
1F3	0,1
1G4	1,1
2D7	3,5
4B6	0,2
4D5	0,4
10D12	0,5
13B1	0,3

Như được thể hiện trên Fig.55A, Fig.55B và trong bảng 26, các MASP-3 mAb thể hiện sự ức chế tiềm năng của APC trong huyết thanh của người, với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 3,5 nM. Các kết quả này cho thấy rằng MASP-3 đóng vai trò chủ chốt trong quá trình hoạt hóa APC trong mô hình *in vitro* trong huyết thanh của người, và cũng cho thấy rằng kháng thể ức chế MASP-3 là các chất ức chế tiềm năng của APC.

5. Thử nghiệm để đo khả năng của các MASP-3 mAb tiêu biểu trong việc ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ

Phương pháp

Để theo dõi sự ức chế của APC trong một trường hợp thử nghiệm khác, các tác giả sáng chế đã đánh giá khả năng của các MASP-3 mAb tiêu biểu trong việc ngăn chặn sự phân hủy của hồng cầu thỏ trong huyết thanh của người. Các nồng độ khác nhau của các MASP-3 mAb được bổ sung vào huyết thanh của người đã rút cạn yếu tố D 10% và GVB + Mg/EGTA (20 nM) và được ủ trong thời gian 30 phút trên nước đá trước khi bổ sung ST-tiền yếu tố B-His tái tổ hợp (nồng độ cuối cùng 2 µg/mL) và hồng cầu (nồng độ cuối cùng $2,5x10^8$ tế bào/mL) vào. Các hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 70 phút và sự tan máu qua trung gian APC

được đo bằng cách pha loãng hỗn hợp phản ứng và đo độ hấp thụ (A405), mà chỉ báo cho các mức hemoglobin tự do.

Kết quả

Fig.56A minh họa bằng đồ thị mức độ ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ khi có mặt các nồng độ khác nhau của các MASP-3 mAb 1A10, 1F3, 4B6, 4D5, 1G4 và 2F2 trong huyết thanh của người đã rút cạn CFD. Fig.56B minh họa bằng đồ thị mức độ ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ khi có mặt các nồng độ khác nhau của các MASP-3 mAb 1B11, 1E7, 1G4, 2D7 và 2F5 trong huyết thanh của người đã rút cạn CFD. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 27.

Bảng 27: Ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ bằng các MASP-3 mAb (Fig.56A và Fig.56B)

Kháng thể	Ức chế sự phân hủy hồng cầu thỏ (IC_{50} nM)
1A10	0,2
1F3	0,2
4B6	0,2
4D5	0,1
1G4	2,7
2F2	0,8
1B11	NA
1E7	NA
2D7	5,4
2F5	0,9

Như được thể hiện trên Fig.56A, Fig.56B và trong bảng 27, các MASP-3 mAb thể hiện sự ức chế sự tan máu được điều khiển bằng APC của hồng cầu thỏ, với các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 5,4 nM. Các kết quả này chứng thực cho các quan sát về kháng thể MASP-3 trong thử nghiệm zymosan, và cũng cho thấy rằng kháng thể ức chế MASP-3 là các chất ức chế tiềm năng của APC.

6. Ức chế sự phân cắt tiền yếu tố D trong huyết thanh của bệnh nhân 3MC

Phương pháp

MASP-3 mAb tái tổ hợp tiêu biểu (4D5) được thử nghiệm về khả năng để phong bế sự phân cắt MASP-3 tái tổ hợp (và sự hoạt hóa) của tiền yếu tố D có nguồn gốc từ huyết thanh bình thường của người và huyết thanh từ bệnh nhân B 3MC ("Pat B"), một cá nhân không phát hiện thấy MASP-3 trong huyết thanh và xuất hiện sự thiếu hụt trong APC.Huyết thanh bình thường của người và huyết thanh của bệnh nhân B (nồng độ cuối cùng 10%) và GVB + Mg/EGTA (30 nM) được ủ không có enzym hoặc với MASP-3 tái tổ hợp có hoạt tính (rMASP-3; 0,5 µg/mL), rMASP-3 bất hoạt, hoặc rMASP-3 có hoạt tính cộng với MASP-3 mAb 4D5 (nồng độ cuối cùng 500 nM) trên nước đá trong thời gian 1 giờ. Zymosan (nồng độ cuối cùng 0,1 mg/mL) được bổ sung vào, và hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau thời gian 2 giờ, các mẫu được ly tâm và phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom. Các mẫu này được kết tủa miễn dịch bằng kháng thể dê được tạo ra dựa trên yếu tố D của người (R&D Systems AF1824), được làm biến tính nhiệt và được điều trị bằng peptit-N-glycosidaza (New England Biolabs P0704L). Các protein đã được thu giữ và loại glycosyl hóa được phân giải bằng SDS-PAGE và các gel được điện thấm để phân tích thẩm tách Tây với kháng CFD được biotinyl hóa (R&D Systems BAF1824) và Streptavidin-HRP có độ nhạy cao (Thermo Fischer Scientific 21130).

Kết quả

Fig.57 thể hiện thẩm tách Tây phân tích mức tiền yếu tố D và yếu tố D ở huyết thanh của bệnh nhân B 3MC với sự có mặt của rMASP-3 có hoạt tính, rMASP-3 bất hoạt, và rMASP-3 có hoạt tính cộng với mAb 4D5. Như được thể hiện trên Fig.57, huyết thanh bình thường của người chủ yếu chứa dạng thuần thục, trong khi huyết thanh của bệnh nhân B phần lớn chứa dạng zymogen của yếu tố D. Như cũng được thể hiện trên Fig.57, rMASP-3 có hoạt tính khi có mặt zymosan gây ra sự phân cắt của tiền yếu tố D trong huyết thanh của bệnh nhân 3, trong khi dạng bất hoạt (zymogen) của MASP-3 thì không. Cuối cùng, như được thể hiện trên Fig.57, MASP-3 mAb 4D5 phong bế sự phân cắt của tiền yếu tố D trong huyết thanh của bệnh nhân 3 khi có mặt rMASP-3 có hoạt tính. Các kết quả này còn thể hiện vai trò của MASP-3 đối với sự phân cắt của tiền yếu tố D trong quá trình hoạt hóa của APC, và cho thấy

rằng mAb ức chế MASP-3 có khả năng phong bế sự phân cắt tiền yếu tố D qua trung gian MASP-3 và từ đó phong bế APC.

Ví dụ 17

Phân tích các mAb ức chế MASP-3 tiêu biểu 10D12 và 13B1 về khả năng ức chế APC *in vivo*.

1. Ức chế APC bằng mAb M3-1 (13B1) và 10D12 *in vivo*:

Phương pháp

Để xác định hiệu quả của mAb MASP-3 13B1 (M3-1) và 10D12 để ức chế APC *in vivo*, một nhóm chuột nhắt (n = 4) tiếp nhận một liều tiêm 10 mg/kg mAb 13B1 qua tĩnh mạch đuôi và nhóm chuột nhắt thứ hai (n=4) tiếp nhận một liều tiêm 10 mg/kg mAb 10D12 qua tĩnh mạch đuôi. Máu thu gom từ các con chuột này được sử dụng để điều chế huyết thanh, tạo ra nền cho việc đánh giá đếm tế bào theo dòng chảy về hoạt tính APC trong thử nghiệm *ex vivo* bằng cách đo mức kết lắng C3 (cũng như C3b và iC3b, Dako F020102-2) trên các hạt zymosan. Huyết thanh được điều chế từ máu thu được ở thời điểm trước định liều và các thời điểm sau định liều (96 giờ, 1 tuần, và 2 tuần) được pha loãng đến 7,5% và các hạt zymosan (nồng độ cuối 0,1 mg/mL) được bổ sung vào để cảm ứng APC. Các con chuột được điều trị bằng kháng thể được so sánh với nhóm chuột đối chứng (n = 4) đã dùng một liều chất dẫn thuốc qua đường trong tĩnh mạch.Kết quả:

Fig.58 minh họa bằng đồ thị mức độ kết lắng C3 trên các hạt zymosan ở các thời điểm khác nhau sau một liều của mAb M3-1 (13B1), mAb 10D12, hoặc chất dẫn thuốc ở chuột nhắt kiểu dại. Như được thể hiện trên Fig.58, ở thời điểm trước khi định liều, ba điều kiện này thể hiện các mức hoạt tính APC tương đương. Ở 96 giờ và hai thời điểm sau đó, cả hai nhóm điều trị bằng mAb đều thể hiện sự loại bỏ gần như hoàn toàn hoạt tính APC toàn thân, trong khi hoạt tính APC của nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc vẫn không giảm sút.

Các kết quả này cho thấy rằng mAb MASP-3 M3-1 (13B1) và mAb 10D12 là

các chất ức chế mạnh APC *in vivo* ở chuột nhắt.

2. Trạng thái của yếu tố B ở chuột nhắt được điều trị bằng mAb MASP-3 10D12

Phương pháp

Trong quá trình chuyển hóa của zymogen yếu tố B thành enzym phân hủy protein hoạt tính, yếu tố B được phân cắt thành các mảnh Ba (~30 kDa) và Bb (~60 kDa) bởi yếu tố D. Trạng thái của mảnh Ba trong huyết thanh của chuột nhắt thu được từ chuột nhắt được điều trị bằng mAb MASP-3 10D12 được xác định như sau.

Chuột nhắt (n=4) được cho dùng hai liều tiêm 10 mg/kg mAb 10D12 qua tĩnh mạch đuôi. Hai liều điều trị này diễn ra cách nhau bảy ngày và máu được thu gom từ chuột ba ngày sau liều tiêm thứ hai. Nhóm thứ hai gồm bốn con chuột nhắt tiếp nhận một liều chất dẫn thuốc (PBS) qua đường trong tĩnh mạch. Máu thu gom từ cả hai nhóm được sử dụng để điều chế huyết thanh, tạo ra nền cho việc hoạt hóa bổ thể. Các hạt zymosan (nồng độ cuối cùng 0,1 mg/mL) được bổ sung vào huyết thanh đã pha loãng (nồng độ cuối cùng 7,5%) và được ủ trong 35 phút ở nhiệt độ 37°C.

Kết quả

Để đo mức hoạt hóa APC, Fig.59 thể hiện thẩm tách Tây phân tích trạng thái của mảnh Ba trong huyết thanh của chuột nhắt thu được từ chuột nhắt được điều trị bằng mAb 10D12 hoặc PBS và được kích thích bằng zymosan. Mỗi làn trên Fig.59 đại diện cho một chuột nhắt khác nhau, và các làn xen kẽ thể hiện huyết thanh từ chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc tiêu biểu liền kề với chuột nhắt được điều trị bằng mAb MASP-3 nhằm mục đích so sánh. Hai điều kiện đối chứng, từ chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc hoặc mAb 10D12 được thể hiện trong làn 1 và 2, một cách tương ứng (bắt đầu từ bên trái của thẩm tách) là các đại diện cho mức cơ sở của Ba có mặt trong các mẫu huyết thanh khi không có zymosan. Tất cả các làn 3 đến 10 đều thể hiện mức mảnh Ba có mặt sau khi ủ với zymosan. Trong tất cả các trường hợp, chuột nhắt được điều trị bằng mAb MASP-3 thể hiện mức mảnh Ba giảm so với chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc.

3. Huyết thanh từ chuột nhắt được điều trị bằng mAb 10D12 ức chế sự tan máu

Phương pháp

Để đo mức ức chế APC bởi kháng thể ức chế MASP-3, các tác giả sáng chế đã đánh giá khả năng của kháng thể MASP-3 để phong bế sự phân hủy hồng cầu thỏ trong huyết thanh từ chuột nhắt được điều trị bằng mAb MASP-3 10D12 tiêu biểu so với huyết thanh từ chuột nhắt được điều trị bằng đối chứng dẫn thuốc.

Chuột nhắt (n=4/nhóm) được cho dùng ba mũi tiêm đối chứng chất dẫn thuốc (PBS), 10 mg/kg mAb MASP-3 10D12, hoặc 25 mg/kg mAb MASP-3 10D12, qua tĩnh mạch đuôi. Các lần điều trị diễn ra cách nhau bảy ngày và máu được thu gom từ chuột ba ngày sau mũi tiêm thứ ba. Máu được sử dụng để điều chế huyết thanh, tạo ra nền cho các phản ứng tan máu. Hồng cầu (nồng độ cuối 2,5 x 10^8 tế bào/mL) được bổ sung vào huyết thanh hỗn hợp 20% từ bốn con chuột trong GVB + Mg/EGTA (20 nM). Các hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37°C và sự tan máu qua trung gian APC được đo bằng cách pha loãng hỗn hợp phản ứng và đo độ hấp thụ (A405).

Kết quả

Fig.60 minh họa bằng đồ thị mức độ ức chế sự tan máu bởi huyết thanh 20% từ chuột nhắt được điều trị bằng MASP-3 mAb 10D12 (10 mg/kg hoặc 25 mg/kg) hoặc chuột nhắt được điều trị bằng đối chứng dẫn thuốc. Như được thể hiện trên Fig.60, huyết thanh từ chuột nhắt được điều trị bằng mAb MASP-3 10D12 ở cả hai nồng độ 10mg/kg và 25 mg/kg đều thể hiện sự tan máu tổng thể ít hơn trong khoảng thời gian thử nghiệm 1 giờ so với chuột nhắt được điều trị bằng chất dẫn thuốc.

Tóm tắt kết quả chung

Như được mô tả trong ví dụ này, mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu 13B1 và 10D12 ức chế APC *in vivo*. Như được mô tả trong Ví dụ 12, xác định được rằng kháng thể đơn dòng MASP-3 13B1 (còn được đề cập đến là mAb M3-1) mang lại lợi ích rõ ràng cho sự sống sót của tế bào hồng cầu thiếu Crry trong mô hình chuột nhắt liên quan đến hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH). Như được mô tả trong

Ví dụ 13, xác định được rằng mAb MASP-3 M3-1 làm giảm tỷ lệ mắc và độ nghiêm trọng của các điểm số viêm khớp lâm sàng theo cách phụ thuộc liều.

Ví dụ 18

Ví dụ này mô tả các kết quả của phân tích sự gắn kết epitop của mAb ức chế MASP-3 hoạt lực cao.

1. Phân tích liên kết cạnh tranh

Phương pháp

Các đĩa thử nghiệm ELISA 96 lỗ được phủ kháng thể thu giữ, αM3-259, mAb isotyp IgG4 đã cho thấy là liên kết vùng CCP1-CCP2 của MASP-1 và MASP-3. Protein MASP-3 có chiều dài đầy đủ của người được cố định trên đĩa thông qua kháng thể thu giữ αM3-259. Trong các lỗ riêng không được phủ, dãy pha loãng 2 lần của một mAb MASP-3 thử nghiệm của isotyp IgG4 được trộn với nồng độ không đổi của một kháng thể MASP-3 thử nghiệm khác của isotyp IgG1. Hỗn hợp này được bổ sung vào các lỗ được phủ và cho liên kết với MASP-3 được thu giữ. Sự cạnh tranh tiềm tàng giữa hai kháng thể này được xác định bằng cách phát hiện đồng dạng IgG1 nhờ sử dụng kháng thể liên hợp với HRP kháng vùng bản lề IgG1 của người (Southern Biotech 9052-05), và bộ thuốc thử cơ chất TMB (BD Biosciences 555214).

Kết quả

Fig. 61A-61E minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh.

Fig.61A minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết các mAb MASP-3 (IgG4) phong bế sự tương tác giữa mAb 4D5 (IgG1) và MASP-3 của người.

Fig.61B minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết các mAb MASP-3 (IgG4) phong bế sự tương tác giữa mAb 10D12 (IgG1) và MASP-3 của người.

Fig.61C minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết các mAb MASP-3 (IgG4) phong bế sự tương tác giữa mAb 13B1 (IgG1) và MASP-3 của người.

Fig.61D minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết các mAb MASP-3 (IgG4) phong bế sự tương tác giữa mAb 1F3 (IgG1) và MASP-3 của người.

Fig.61E minh họa bằng đồ thị các kết quả của phân tích liên kết cạnh tranh để nhận biết các mAb MASP-3 (IgG4) phong bế sự tương tác giữa mAb 1G4 (IgG1) và MASP-3 của người.

Dữ liệu từ Fig.61A đến Fig.61E được tóm tắt dưới đây trong bảng 28.

Dữ liệu này chỉ ra rằng các mAb MASP-3 4D5, 10D12, 13B1, 1A10, 1F3 và 1G4 có epitop chung hoặc các epitop chồng lặp trên MASP-3 của người. Ngạc nhiên là, 1G4 có khả năng rất hạn chế để phong bế sự gắn kết của năm mAb khác với MASP-3, nhưng các mAb này phong bế hầu như hoàn toàn sự gắn kết của chính 1G4 với MASP-3.

2. Phân tích sự gắn kết của mAb với các peptit biểu hiện các epitop MASP-3 thẳng và không liên tục

Phương pháp

14 trong số 16 mAb MASP-3 được đánh giá bằng Pepscan để nhận biết các vùng của MASP-3 mà chúng liên kết. Để tái cấu trúc cả hai epitop thẳng và không liên tục tiềm năng của phân tử đích, ngân hàng peptit được tổng hợp tương ứng với các gốc axit amin 299 đến 728 có SEQ ID NO:2 (MASP-3 của người). Các gốc axit amin 1-298 của MASP-3 không có mặt trong chất sinh miễn dịch và không được bao gồm trong phân tích này. Phân tích epitop bằng Pepscan bao gồm việc sử dụng công nghệ CLIPS, công nghệ này cố định về mặt cấu trúc các peptit trong các cấu trúc ba chiều xác định (xem tài liệu Timmerman et al., *J Mol Recog.* 20:283-299, 2007 và Langedijk et al., *Analytical Biochemistry* 417:149-155, 2011). Sự gắn kết của mỗi

kháng thể với mỗi peptit đã được tổng hợp được thử nghiệm trong ELISA trên cơ sở Pepscan.

Kết quả

Các kết quả gắn kết peptit từ Pepscan đối với mỗi kháng thể được phân tích được mô tả dưới đây và được tóm tắt trong bảng 4, bảng 28 và trên Fig.62-Fig.67.

Các kháng thể 1F3, 4B6, 4D5 và 1A10 (Nhóm IA)

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, các kháng thể 1F3, 4B6, 4D5 và 1A10 liên kết các chất sao chép epitop không liên tục và cũng liên kết các chất sao chép thẳng và ràng buộc đơn giản. Phân tích số liệu cho thấy rằng các kháng thể 1F3, 4B6, 4D5 và 1A10 đều nhận biết một cách vượt trội đoạn duỗi peptit $_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SEQ ID NO:9) của MASP-3. Peptit này nằm ngay liền kề với vị trí hoạt động histidin, H497. Số liệu thu được đối với các kháng thể này với các chất sao chép không liên tục đề xuất rằng các đoạn duỗi peptit $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SEQ ID NO:11), $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SEQ ID NO:13) và $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SEQ ID NO:14) của MASP-3 cũng góp phần vào sự liên kết. Peptit $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SEQ ID NO:11) chứa vị trí hoạt động aspartat (D553).Kháng thể 10D12 (Nhóm IB)

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, kháng thể 10D12 liên kết các peptit với trình tự lõi $_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SEQ ID NO:9) của MASP-3, trình tự liền kề với vị trí hoạt động histidin, H497. Kháng thể 13B1 (Nhóm IC)

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, kháng thể 13B1 nhận biết epitop không liên tục bao gồm các đoạn duỗi peptit $_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SEQ ID NO:10) và $_{626}$PHAECKTSYESRS$_{638}$ (SEQ ID NO:12) của MASP-3, trong đó đoạn duỗi peptit $_{626}$PHAECKTSYESRS$_{638}$ (SEQ ID NO:12) có vẻ là phần trội của epitop do nó cũng có thể được liên kết ở dạng ràng buộc đơn giản. Peptit $_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SEQ ID NO:10) bao gồm vị trí hoạt động histidin, H497.Kháng thể 1G4 (Nhóm II)

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện nghiêm ngặt thấp, kháng thể 1G4 nhận biết epitop không liên tục bao gồm các đoạn duỗi peptit $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SEQ ID NO:17), $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SEQ ID NO:19) và $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO:23) của MASP-3, trong đó đoạn duỗi peptit $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO:23) là phần trội của epitop. Peptit trội này nằm trong ba axit amin của vị trí hoạt động serin, S664.Các kháng thể 1E7 và 2D7 (Nhóm IIIA)

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện nghiêm ngặt cao và thấp, một cách tương ứng, các kháng thể 1E7 và 2D7 nhận biết epitop không liên tục bao gồm các đoạn duỗi peptit $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SEQ ID NO:17), $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SEQ ID NO:19) và $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO:23) của MASP-3, trong đó đoạn duỗi peptit $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO:23) là phần trội của epitop và nằm trong ba axit amin của vị trí hoạt động serin, S664.Các kháng thể 2F5 và 15D9 (Nhóm IIIB)

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện nghiêm ngặt thấp, các kháng thể 2F5 và 15D9 nhận biết một cách vượt trội epitop không liên tục bao gồm các đoạn duỗi peptit $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SEQ ID NO:17), $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$ (SEQ ID NO:18), $_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SEQ ID NO:20) và $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO:23) của MASP-3. Các peptit $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$ (SEQ ID NO:18) và $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SEQ ID NO:23) nằm trong bốn hoặc ba axit amin của vị trí hoạt động các gốc H497 và S664, một cách tương ứng.

Kháng thể 1B11 (Nhóm IIIC)

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, kháng thể 1B11 nhận biết epitop không liên tục bao gồm các đoạn duỗi peptit $_{435}$ECGQPSRSLPSLV$_{447}$ (SEQ ID NO:16), $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SEQ ID NO:17), $_{583}$APHMLGL$_{589}$ (SEQ ID NO:21) và $_{614}$SDVLQYVKLP$_{623}$ (SEQ ID NO:22) của MASP-3.

Bảng 28: Tóm tắt phân tích liên kết epitop

Số tham chiếu/Nhóm mAb MASP-3	Các mảnh liên kết peptit (các epitop) trên MASP-3 của người (có/gen dẫn hướng)	Cạnh tranh với	Thử nghiệm cắt peptit
4D5 Nhóm IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ức chế
1F3 Nhóm IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ức chế
4B6 Nhóm IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ức chế
1A10 Nhóm IA	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9) $_{544}$DFNIQNYNHDIALVQ$_{558}$ (SIN:11) $_{639}$GNYSVTENMFC$_{649}$ (SIN:13) $_{704}$VSNYVDWVWE$_{713}$ (SIN:14)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ức chế
10D12 Nhóm IB	$_{498}$VLRSQRRDTTVI$_{509}$ (SIN:9)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ức chế
13B1 Nhóm IC	$_{494}$TAAHVLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:10) $_{626}$PHAECKTSCÓRS$_{638}$ (SIN:12)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ức chế
Nhóm I trình tự lõi	$_{498}$VLRSQRRDTTV$_{508}$ (SIN:15)		
1G4 Nhóm II-cạnh tranh chéo với Nhóm I và III	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)	1F3, 1G4, 4D5, 10D12, 13B1	ức chế
1E7 Nhóm IIIA	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)	1G4	ức chế yếu

2D7 Nhóm IIIA	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{514}$EHVTVYLGLH$_{523}$ (SIN:19) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)		ức chế yếu
2F5 Nhóm IIIB	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$(SIN 18) $_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SIN:20) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)		Không hiệu quả
15D9 Nhóm IIIB	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{479}$KWFGSGALLSASWIL$_{493}$(SIN 18) $_{562}$PVPLGPHVMP$_{571}$ (SIN:20) $_{667}$AFVIFDDLSQRW$_{678}$ (SIN:23)		Không hiệu quả
1B11 Nhóm IIIC	$_{435}$ECGQPSRSLPSLV$_{447}$ (SIN:16) $_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17) $_{583}$APHMLGL$_{589}$ (SIN:21) $_{614}$SDVLQYVKLP$_{623}$ (SIN:22)		Kích thích
Trình tự lõi đối với Nhóm II và Nhóm III	$_{454}$RNAEPGLFPWQ$_{464}$ (SIN:17)		
2F2 Nhóm IV	Liên kết epitop không được xác định	1F3, 4D5, 11B6, 2F2	Kích thích
11B6 Nhóm IV	Liên kết epitop không được xác định	1F3, 4D5, 11B6, 2F2	Không hiệu quả

Fig.62 là sơ đồ đại cương thể hiện các vùng tiếp xúc trên MASP-3 của người bởi các mAb MASP-3, như được xác định bằng phân tích Pepscan. Như được thể hiện trên Fig.62, tất cả các mAb MASP-3 đều có các vùng tiếp xúc trong chuỗi beta chứa miền SP của MASP-3. Một mAb, 1B11, cũng có vùng tiếp xúc giữa các miền CCP2 và SP trong chuỗi alpha của MASP-3.

Fig. 63A đến Fig.67 thể hiện mô hình 3-D minh họa các vùng tiếp xúc của mAb MASP-3 có ái lực cao trên các miền CCP1/2/SP của MASP-3 của người, trong đó vị trí hoạt động miền SP của MASP-3 hướng về phía trước và bộ ba xúc tác được thể hiện dưới dạng chuỗi bên.

Fig.63A thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và mAb MASP-3 có ái lực cao 1F3, 4D5 và 1A10, bao gồm các gốc aa từ 498 đến 509 (SEQ ID NO:9), các gốc aa từ 544-558 (SEQ ID NO:11), các gốc aa từ 639 đến 649 (SEQ ID NO:13) và các gốc aa từ 704 đến 713 (SEQ ID NO:14).

Fig.63B thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và mAb MASP-3 có ái lực cao 10D12, bao gồm các gốc aa từ 498 đến 509 (SEQ ID NO:9).

Fig.64 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và mAb MASP-3 có ái lực cao 13B1, bao gồm các gốc aa từ 494 đến 508 (SEQ ID NO:10) và các gốc aa từ 626 đến 638 (SEQ ID NO: 12).

Fig.65 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và mAb MASP-3 có ái lực cao 1B11, bao gồm các gốc aa từ 435 đến 447 (SEQ ID NO:16), các gốc aa từ 454 đến 464 (SEQ ID NO:17), các gốc aa từ 583 đến 589 (SEQ ID NO:21) và các gốc aa từ 614 đến 623 (SEQ ID NO:22).

Fig.66 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và mAb MASP-3 có ái lực cao 1E7, 1G4 và 2D7, bao gồm các gốc aa từ 454 đến 464 (SEQ ID NO:17), các gốc aa từ 514 đến 523 (SEQ ID NO:19) và các gốc aa từ 667 đến 678 (SEQ ID NO:23).

Fig.67 thể hiện các vùng tiếp xúc giữa MASP-3 của người và mAb MASP-3 có ái lực cao 15D9 và 2F5, bao gồm các gốc aa từ 454 đến 464 (SEQ ID NO:17), các gốc aa từ 479 đến 493 (SEQ ID NO:18), các gốc aa từ 562 đến 571 (SEQ ID NO:20), và các gốc aa từ 667 đến 678 (SEQ ID NO:23).Tóm lại, các profin liên kết cuối cùng thu được đối với 12 trong số 14 kháng thể. Tất cả 12 kháng thể được lập bản đồ đều nhận biết các epitop tiếp xúc với dung môi trong miền peptidaza S1. Vùng lân cận gần của một số thể quyết định epitop với các gốc cho vị trí hoạt động bộ ba xúc tác (H497, D553, S664) là nhất quán với mô hình trong đó các mAb MASP-3 ức chế ái lực cao phong bế hoạt tính enzym bằng cách ngăn cản sự tương tác enzym-cơ chất.

Ví dụ 19

Ví dụ này mô tả việc nhân hóa các mAb MASP-3 tiêu biểu và việc xử lý kỹ thuật các vị trí biến đổi sau dịch mã tiềm năng.

Phương pháp

1. Nhân hóa các mAb MASP-3 có ái lực cao

Phương pháp

Để làm giảm nguy cơ sinh miễn dịch, kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu 4D5, 10D12 và 13B1 được làm giống như của người bằng phương pháp ghép CDR. Các CDR của mỗi kháng thể MASP-3 được ghép vào các trình tự khung liên ứng gần nhất của người. Một số gốc vùng Vernier được biến đổi bằng cách gây đột biến định vị Quickchange (Agilent Technologies). Các vùng VH và VL được làm giống như của người thu được được chuyển vào các cấu trúc biểu hiện IgG1 hoặc IgG4 và IgK của người trên cơ sở pcDNA3.1, và các kháng thể tái tổ hợp này được biểu hiện và được tinh chế như được mô tả ở trên. Ái lực của kháng thể được làm giống như của người được xác định bằng ELISA sử dụng các mảnh Fab đơn trị, và hoạt lực được đánh giá bằng thử nghiệm kết lắng C3 sử dụng các dạng IgG4 nguyên vẹn.

Kết quả

Trình tự axit amin của các dạng được làm giống như của người tiêu biểu của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ đối với các mAb 4D5, 10D12 và 13B1 được nêu dưới đây. Các CDR (Kabat) được gạch chân.

4D5:

h4D5_VH-14 (SEQ ID NO:248)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIG
WIYPRDDRTKYNDKFKDKATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSSL
EDTYWGQGTLVTVSS

h4D5_VH-19 (SEQ ID NO:249)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTDDINWVRQAPGQGLEWIG
WIYPRDDRTKYNDKFKDRATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCSSL
EDTYWGQGTLVTVSS

h4D5_VL-1 (SEQ ID NO:250)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTF
GQGTKVEIKR10D12:

h10D12_VH-45 (SEQ ID NO:251)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMG
WINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTAVYFCARGG
EAMDYWGQGTLVTVSSh10D12_VH-49 (SEQ ID NO:252)

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTSYGMSWVRQAPGKGLKWMG
WINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTATYFCARGG
EAMDYWGQGTLVTVSSh10D12_VL-21 (SEQ ID NO:253)

DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR
LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWT
FGQGTKVEIKR13B1

h13B1_VH-9 (SEQ ID NO:254)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIG
EILPGTGSTNYAQKFQGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLRSE
DVWGQGTLVTVSSh13B1_VH-10 (SEQ ID NO:255)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGKWIEWVRQAPGQGLEWIG
EILPGTGSTNYNEKFKGRATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLRSED
VWGQGTLVTVSSh13B1_VL-1 (SEQ ID NO:256)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNIPTF
GQGTKVEIKR

Ái lực của các kháng thể được làm giống như của người tiêu biểu 4D5, 10D12 và 13B1 với MASP-3 của người được thể hiện dưới đây trong bảng 29.

Bảng 29: Liên kết của các mAb MASP-3 được làm giống như của người tiêu biểu với MASP-3

Kháng thể MASP-3 dòng vô tính (dạng Fab)	EC_{50} liên kết MASP-3 của người (nM)
Fab gốc của 4D5	0,107
h4D5_14-1 Fab (VH-14 và VL-1)	0,085
h4D5_19-1 Fab (VH-19 và VL-1)	0,079
Fab gốc của 10D12	0,108
h10D12_45-21 Fab (VH-45 và VL-21)	0,108
h10D12_49-21 Fab (VH-49 và VL-21)	0,115
Fab gốc của 13B1	0,123
h13B1_9-1 Fab (VH-9 và VL-1)	0,101
h13B1_10-1 Fab (VH-10 và VL-1)	0,097

Phần trăm đồng nhất của các trình tự khung được làm giống như của người với các trình tự khung dòng mầm của người:

h4D5_VH-14=90%; h4D5_VH-19=91%; h4D5_VL-1=100%;

h10D12_VH-45=92%; h10D12_VH-49=91%; h10D12_VL-21=93%;

h13B1_VH-9=95%; h13B1_VH-10=94%; h13B1_VL-1=100%

2. Sự gây đột biến các mAb MASP-3 tiêu biểu để loại bỏ các vị trí biến đổi Asn/Asp trong CDR-1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 4D5, 10D12 và 13B1

MAb ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu 4D5, 10D12 và 13B1 được phân tích về sự biến đổi sau dịch mã. Các gốc Asparagin có Glyxin, Serin, Histidin, Alanin

hoặc Asparagin (môtíp "NG", "NS", "NH", "NA", hoặc "NN") kế tiếp thường nhạy với sự thủy phân nhóm amit của chuỗi bên Asparagin, hoặc "loại amit". Các gốc axit aspartic có Glyxin hoặc Prolin (môtíp "DG" hoặc "DP") kế tiếp thường nhạy với sự hoán chuyển, hoặc "đồng phân hóa". Các biến đổi này dẫn đến tính không đồng nhất điện tích và có thể ảnh hưởng đến chức năng của kháng thể nếu chúng xảy ra ở giao diện liên kết. Chúng cũng có thể gia tăng nguy cơ phân mảnh, sinh miễn dịch và kết tụ.

Các môtíp biến đổi sau dịch mã tiềm năng được nhận biết trong CDR-1 của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 4D5, 10D12 và 13B1.

4D5 và 13B1 chứa một vị trí loại amit Asn có thể có trong CDR1 của chuỗi nhẹ (được thể hiện là "NS" ở các vị trí 8 và 9 có SEQ ID NO:142 được gạch chân trong bảng 30 dưới đây. Cũng được thể hiện trong bảng 30, 10D12 chứa một vị trí đồng phân hóa Asp có thể có trong CDR1 của chuỗi nhẹ.

Các biến thể của phiên bản được làm giống như của người của các mAb MASP-3 được tạo ra bằng cách gây đột biến định hướng điểm như được thể hiện trong bảng 30. Các biến thể này được biểu hiện và tinh chế như được mô tả ở trên. Ái lực được xác định bằng ELISA bằng cách sử dụng các mảnh Fab đơn trị, và hoạt lực được đánh giá bằng thử nghiệm kết lắng C3 sử dụng các dạng IgG4 nguyên vẹn như được mô tả ở trên.

Bảng 30: Các biến thể của CDR-L1 đối với 4D5, 10D12 và 13B1

Kháng thể	Vùng	Trình tự
4D5 gốc	LC-CDR1	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
4D5-NQ đột biến	LC-CDR1	KSSQSLLQSRTRKNYLA (SEQ ID NO:257)
4D5-NA đột biến	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
4D5-ST đột biến	LC-CDR1	KSSQSLLNTRTRKNYLA (SEQ ID NO:259)
13B1 gốc	LC-CDR1	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:142)
13B1-NQ	LC-CDR1	KSSQSLLQSRTRKNYLA (SEQ ID NO:257)
13B1-NA	LC-CDR1	KSSQSLLASRTRKNYLA (SEQ ID NO:258)
13B1-ST	LC-CDR1	KSSQSLLNTRTRKNYLA (SEQ ID NO:259)
Liên ứng đối với 4D5, 13B1 và	LC-CDR1	KSSQSLLXXRTRKNYLA (SEQ ID NO:260) trong đó X ở vị trí 8 là N, Q hoặc A; và trong đó

biến thể		X ở vị trí 9 là S hoặc T
10D12 gốc	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:153)
10D12-DE đột biến	LC-CDR1	KSSQSLLDSEGKTYLN (SEQ ID NO:261)
10D12-DA đột biến	LC-CDR1	KSSQSLLDSAGKTYLN (SEQ ID NO:262)
10D12-GA đột biến	LC-CDR1	KSSQSLLDSDAKTYLN (SEQ ID NO:263)
35C1	LC-CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLS (SEQ ID NO:159)
Liên ứng của 10D12, 35C1 và biến thể	LC-CDR1	KSSQSLLDSXXKTYLX (SEQ ID NO:215) trong đó X ở vị trí 10 là D, E hoặc A; trong đó X ở vị trí 11 là G hoặc A; và trong đó X ở vị trí 16 là N hoặc S

Bảng 31: Liên kết của các ứng viên được gây đột biến của các mAb được làm giống như của người 4D5, 10D12 và 13B1 với MASP-3 của người

Kháng thể MASP-3 dòng vô tính (dạng Fab)	EC_{50} liên kết MASP-3 của người (pM)
h4D5_19-1 Fab gốc (VH-19 và VL-1)	102
h4D5-19-1-NQ Fab (VH-19 và VL-1-NQ)	732
h4D5-19-1-NA Fab (VH-19 và VL-1-NA)	122
h4D5-19-1-ST Fab (VH-19 và VL-1-ST)	151
h10D12_45-21 Fab gốc (VH-45 và VL-21)	108
h10D12-45-21-DE Fab (VH-45 và VL-21-DE)	326
h10D12-45-21-DA Fab (VH-45 và VL-21-DA)	294
h10D12-45-21-GA Fab (VH-45 và VL-21-GA)	181
h13B1_10-1 Fab gốc (VH-10 và VL-1)	100
h13B1_10-1-NQ Fab (VH-10 và VL-1-NQ)	138
h13B1_10-1-NA Fab (VH-10 và VL-1-NA)	105
h13B1_10-1-ST Fab (VH-10 và VL-1-ST)	120

Bảng 32: Các trình tự VH (các CDR và các vùng FR, Kabat) của kháng thể MASP-3 được làm giống như của người

Kháng thể	HC FR1	HC CDR1
4D5 gốc (SIN:24)	QVQLKQSGPELVKPGASVKLSCKAS GYTFT (SEQ ID NO:55)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
h4D5_VH -14 (SIN:248)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT (SEQ ID NO:264)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
h4D5_VH -19 (SIN:249)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT (SEQ ID NO:264)	TDDIN (SEQ ID NO:56)
10D12 gốc (SIN:28)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASG YIFT (SEQ ID NO:71)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
h10D12_V H-45 (SIN:251)	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASG YIFT (SEQ ID NO:269)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
h10D12- VH-49 (SIN:252)	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASG YIFT (SEQ ID NO:269)	SYGMS (SEQ ID NO:72)
13B1 gốc (SIN:30)	QVQLKQSGAELMKPGASVKLSCKAT GYTFT (SEQ ID NO:83)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
h13B1_V H-9 (SIN:254)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT (SEQ ID NO:273)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
h13B1_V H-10 (SIN:255)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT (SEQ ID NO:273)	GKWIE (SEQ ID NO:84)
Kháng thể	HC FR2	HC CDR2
4D5 gốc	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:57)	WIYPRDDRTKYND KFKD (SEQ ID NO:58)
h4D5_VH -14	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:265)	WIYPRDDRTKYND KFKD (SEQ ID NO:58)
h4D5_VH -19	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:265)	WIYPRDDRTKYND KFKD

		(SEQ ID NO:58)
10D12 gốc	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYAD DFKG (SEQ ID NO:74)
h10D12_V H-45	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYAD DFKG (SEQ ID NO:74)
h10D12- VH-49	WVRQAPGKGLKWMG (SEQ ID NO:73)	WINTYSGVPTYAD DFKG (SEQ ID NO:74)
13B1 gốc	WVKQRPGHGLEWIG (SEQ ID NO:85)	EILPGTGSTNYNEK FKG (SEQ ID NO:86)
h13B1_V H-9	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:274)	EILPGTGSTNYAQK FQG (SEQ ID NO:275)
h13B1_V H-10	WVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:274)	EILPGTGSTNYNEK FKG (SEQ ID NO:86)
Kháng thể	HC FR3	HC CDR3
4D5 gốc	KATLTVDTSSNTAYMDLHSLTSEDSA VYFCSS (SEQ ID NO:59)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
h4D5_VH -14	KATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTA VYYCSS (SEQ ID NO:266)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
h4D5_VH -19	RATLTVDTSSNTAYMELSSLRSEDTA VYYCSS (SEQ ID NO:267)	LEDTY (SEQ ID NO:60)
10D12 gốc	RFAFSLETSARTPYLQINNLKNEDTAT YFCAR (SEQ ID NO:75)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
h10D12_V H-45	RFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTAV YFCAR (SEQ ID NO:270)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)
h10D12- VH-49	RFVFSLDTSVRTPYLQISSLKAEDTAT YFCAR (SEQ ID NO:271)	GGEAMDY (SEQ ID NO:76)

13B1 gốc	KATFTADSSSNTAYMQLSSLTTEDSA MYYCLR (SEQ ID NO:87)	SEDV (SEQ ID NO:88)
h13B1_V H-9	RATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCLR (SEQ ID NO:276)	SEDV (SEQ ID NO:88)
h13B1_V H-10	RATFTADSSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCLR (SEQ ID NO:276)	SEDV (SEQ ID NO:88)
Kháng thể	HC FR4	
4D5 gốc	WGQGTLVAVSS (SEQ ID NO:61)	
h4D5_VH -14	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:268)	
h4D5_VH -19	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:268)	
10D12 gốc	WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:77)	
h10D12_V H-45	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)	
h10D12-VH-49	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:272)	
13B1 gốc	WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO:89)	
h13B1_V H-9	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:277)	
h13B1_V H-10	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:277)	

Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người với các biến thể:

h4D5_VL-1-NA (SEQ ID NO:278)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLYTF GQGTKVEIKRh10D12_VL-21-GA (SEQ ID NO:279)

DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDAKTYLNWLLQRPGQSPKR
LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPWT
FGQGTKVEIKRh13B1_VL-1-NA (SEQ ID NO:280)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLASRTRKNYLAWYQQKPGQPPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNIPTF
GQGTKVEIKR

Bảng 33: Các trình tự VL (các CDR và các vùng FR, Kabat) (cộng với các biến thể trong LC-CDR1) của kháng thể MASP-3 được làm giống như của người

Kháng thể	LC FR1	LC CDR1
4D5 gốc (SIN:40)	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMTC (SEQ ID NO:141)	KSSQSLLNSRTRKN YLA (SEQ ID NO:142)
h4D5_VL-1 (SIN:250)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLNSRTRKN YLA (SEQ ID NO:142)
h4D5_VL-1-NA (SIN:278)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLASRTRKN YLA (SEQ ID NO:258)
10D12 gốc (SIN:43)	DVLMTQTPLTLSVTIGQPASISC (SEQ ID NO:152)	KSSQSLLDSDGKTY LN (SEQ ID NO:153)
h10D12_VL-21 (SIN:253)	DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISC (SEQ ID NO:285)	KSSQSLLDSDGKTY LN (SEQ ID NO:153)
h10D12_VL-21-GA (SIN:279)	DVLMTQTPLSLSVTPGQPASISC (SEQ ID NO:285)	KSSQSLLDSDAKTY LN (SEQ ID NO:263)
13B1 gốc	DIVMTQSPSSLAVSAGEKVTMSC (SEQ ID NO:151)	KSSQSLLNSRTRKN YLA (SEQ ID NO:142)
h13B1_VL-1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLNSRTRKN YLA (SEQ ID NO:142)
h13B1_VL-1-NA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (SEQ ID NO:281)	KSSQSLLASRTRKN YLA (SEQ ID NO:258)

Kháng thể	LC FR2	LC CDR2
4D5 gốc	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h4D5_VL-1	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h4D5_VL-1-NA	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
10D12 gốc	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
h10D12_VL-21	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
h10D12_VL-21-GA	WLLQRPGQSPKRLIY (SEQ ID NO:154)	LVSKLDS (SEQ ID NO:155)
13B1 gốc	WYQQKPGQSPKLLIY (SEQ ID NO:143)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h13B1_VL-1	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
h13B1_VL-1-NA	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:282)	WASTRES (SEQ ID NO:144)
Kháng thể	LC FR3	LC CDR3
4D5 gốc	GVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVQAEDL AVYYC (SEQ ID NO:145)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
h4D5_VL-1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
h4D5_VL-1-NA	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNLYT (SEQ ID NO:146)
10D12 gốc	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDL GVYYC (SEQ ID NO:156)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
h10D12_VL-21	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYC (SEQ ID NO:286)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)

h10D12_VL-21-GA	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO:286)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO:157)
13B1 gốc	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC (SEQ ID NO:150)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
h13B1_VL-1	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
h13B1_VL-1-NA	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:283)	KQSYNIPT (SEQ ID NO:161)
Kháng thể	LC FR4	
4D5 gốc	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h4D5_VL-1	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	
h4D5_VL-1-NA	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	
10D12 gốc	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h10D12_VL-21	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:287)	
h10D12_VL-21-GA	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:287)	
13B1 gốc	FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:147)	
h13B1_VL-1	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	
h13B1_VL-1-NA	FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:284)	

Ví dụ 20

Phân tích mAb ức chế MASP-3 tiêu biểu 13B1 ở mô hình chuột nhắt có bệnh đa xơ cứng.

Bối cảnh/cơ sở lý luận: bệnh viêm não tủy tự miễn thực nghiệm (EAE), một rối loạn tự miễn mắc phải gây viêm và hủy myelin, là mô hình động vật được thiết lập có

bệnh đa xơ cứng (MS). Bằng chứng cho thấy rằng APC đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển/tiến triển của EAE được cung cấp bởi các báo cáo rằng bệnh này được làm giảm ở chuột nhắt được điều trị bằng kháng thể trung hòa yếu tố B (Hu et al., *Mol. Immunol.* 54:302, 2013). Ví dụ này mô tả việc phân tích kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu, 13B1, trong mô hình EAE.

Phương pháp

Cảm ứng EAE

Kit để cảm ứng EAE, mua từ Hooke Laboratories (Lawrence, MA) được sử dụng để cảm ứng EAE trong nghiên cứu này. Kit này chứa kháng nguyên thần kinh MOG_{35-55} trong chất phù trợ Freund đầy đủ (CFA) cũng như độc tố ho gà.

30 con chuột nhắt cái C57 Bl/6J loại dại được sử dụng cho nghiên cứu này và được làm thích nghi với điều kiện sống trong ít nhất một tuần trước khi cảm ứng EAE. Chuột nhắt ở khoảng 10 tuần tuổi tại thời điểm cảm ứng. Như được thể hiện trong bảng 34 dưới đây, tại thời điểm cảm ứng, mỗi con chuột nhắt tiếp nhận hai mũi tiêm 100 µL MOG35-55 qua đường dưới da (sc) và một mũi tiêm 100 µL (400 ng) độc tố ho gà qua đường trong màng bụng (ip). Mũi tiêm độc tố ho gà thứ hai được sử dụng 24 giờ sau mũi tiêm thứ nhất.

Điều trị: 30 con chuột nhắt được chia thành ba nhóm với 10 con/nhóm và được điều trị bằng mAb đối chứng isotyp không liên quan 10 mg/kg i.v.); mAb 13B1 (kháng MASP-3, 10 mg/kg i.v.) hoặc mAb 1379 (kháng yếu tố B (*Hu et al., Mol. Immunol.* 54:302, 2013) 40 mg/kg i.p.). Như được thể hiện trong bảng 34, việc định liều với mAb đối chứng isotyp và mAb MASP-3 13B1 diễn ra hằng tuần bắt đầu vào ngày -16 và kết thúc vào ngày +12. Việc định liều với mAb 1379 diễn ra cách nhật từ ngày +3 đến ngày +11, theo chế độ định liều được mô tả trong tài liệu Hu et al., *Mole Immunol* 54:302-308, (2013).

Bảng 34: Các phương pháp thử nghiệm để thử nghiệm EAE với mAb MASP-3 13B1

Ngày dùng	Độc tố ho gà 400 ng i.p.	MOG peptit 35-55 250 µg	mAb 1379 (kháng yếu tố B) 40 mg i.p.	MAb đối chứng isotyp 10 mg/kg i.v.	mAb 13B1 (kháng MASP-3) 10 mg/kg i.v.
-16				+	+
-9				+	+
-2				+	+
0	+	+			
+1	+				
+3			+		
+5			+	+	+
+7			+		
+9			+		
+11			+		
+12				+	+

Cho điểm: Chuột nhắt được kiểm tra cách nhật cho đến khi biểu hiện các triệu chứng, sau đó chúng được kiểm tra hằng ngày. Các dấu hiệu ban đầu của bệnh xuất hiện 7-12 ngày sau khi gây miễn dịch, như mong đợi. Chuột nhắt được cho điểm theo thang điểm được thể hiện dưới đây trong bảng 35.

Bảng 35: Tiêu chuẩn cho điểm cho mô hình EAE

Điểm	Quan sát lâm sàng
0,0	Không có thay đổi rõ rệt về chức năng vận động của chuột nhắt so với các chuột nhắt không được gây miễn dịch. Khi được nhấc lên ở phần gốc đuôi, thì đuôi căng ra và dựng đứng. Các chân sau thường dạng ra. Khi chuột nhắt đi bộ, không có dáng đi hoặc nghiêng đầu.
0,5	Chóp đuôi ủ rũ. Khi chuột nhắt được nhấc lên ở phần gốc đuôi, thì đuôi căng ra ngoại trừ chóp đuôi. Sự căng cơ cảm nhận được ở đuôi, trong khi đuôi tiếp tục chuyển động.

1,0	Đuôi ủ rũ. Khi chuột nhắt được nhấc lên ở phần gốc đuôi, thì thay vì dựng đứng, toàn bộ đuôi phủ lên ngón. Các chân sau thường dạng ra. Không quan sát thấy dấu hiệu vận động đuôi.
1,5	Đuôi ủ rũ và chân sau bị hạn chế. Khi được nhấc lên ở phần gốc đuôi, thì toàn bộ đuôi phủ lên ngón. Khi chuột nhắt được thả lên khung lưới, ít nhất một chân sau không chuyển động nhất quán. Đi loạng choạng rất không đáng kể.
2,0	Đuôi ủ rũ và các chân sau yếu. Khi được nhấc lên ở phần gốc đuôi, các chân không dạng ra, mà khép lại gần nhau. Khi chuột nhắt được quan sát việc đi lại, nó đi loạng choạng thấy rõ. Một bàn chân có thể có các ngón kéo lê, nhưng chân còn lại không có hạn chế chuyển động rõ ràng; HOẶC, Chuột nhắt có vẻ là ở điểm 0,0, nhưng quan sát thấy có các dấu hiệu nghiêng đầu khi đi lại. Thăng bằng kém.
2,5	Đuôi ủ rũ và các chân sau kéo lê. Cả hai chân sau có sự vận động nhất định, nhưng đều kéo lê ở bàn chân (chuột nhắt đi bằng bàn chân sau). - HOẶC- không có sự vận động ở một chân/một chân kéo lê hoàn toàn, nhưng vận động ở chân còn lại.- HOẶC - độ nghiêm trọng của EAE có vẻ nhẹ khi được nhấc lên (như điểm số 0,0-1,5), nhưng nghiêng đầu mạnh khiến cho chuột nhắt thỉnh thoảng ngã.
3,0	Đuôi ủ rũ và liệt hoàn toàn các chân sau (phổ biến nhất). - HOẶC - Đuôi ủ rũ và hầu như liệt hoàn toàn các chân sau. Một hoặc cả hai chân sau không thể đi chập chững, mà chân sau cũng không thể di chuyển về phía hông. - HOẶC - Đuôi ủ rũ kèm liệt một chân trước và một chân sau. - HOẶC - TẤT CẢ TRONG SỐ: nghiêng đầu nghiêm trọng, chỉ đi lại dọc theo mép lồng, xô đẩy vào thành lồng, lảo đảo khi được nhấc lên ở phần gốc đuôi.

3,5	Đuôi ủ rũ và liệt hoàn toàn các chân sau. Ngoài ra: Chuột nhắt vận động quanh lồng, nhưng khi được đặt nghiêng một bên, không thể tự chỉnh lại. Các chân sau cùng ở một bên cơ thể. - HOẶC - Chuột nhắt vận động quanh lồng, nhưng nửa sau dẹt như cái bánh kếp, tạo nên dáng gù ở nửa trước của chuột nhắt
4,0	Đuôi ủ rũ, liệt chân sau hoàn toàn và liệt chân trước một phần. Chuột nhắt vận động tối thiểu quanh lồng nhưng có vẻ tỉnh táo và ăn được. Thường thì trợ tử được khuyến cáo sau khi chuột nhắt đạt điểm 4,0 trong 2 ngày. Tuy nhiên, với việc dùng thuốc nước hằng ngày qua đường s.c., một số con có thể phục hồi đến 3,5 hoặc 3,0. Khi chuột nhắt được trợ tử do liệt nghiêm trọng, điểm 5,0 được cho đối với chuột nhắt đó trong phần còn lại của thử nghiệm.
4,5	Liệt chân sau hoàn toàn và liệt chân trước một phần, không có sự vận động quanh lồng. Chuột nhắt không tỉnh táo. Chuột nhắt có sự vận động tối thiểu ở các chân trước. Chuột nhắt chỉ đáp ứng với tiếp xúc. Việc trợ tử được khuyến cáo. Khi chuột nhắt được trợ tử do liệt nghiêm trọng, điểm 5,0 được cho đối với chuột nhắt đó trong phần còn lại của thử nghiệm.
5,0	Chuột nhắt tự ý lăn mình trong lồng.

Kết quả

Fig.68 minh họa bằng đồ thị các kết quả của mô hình EAE ở chuột nhắt được điều trị bằng mAb ức chế MASP-3 13B1 (10mg/kg), mAB yếu tố B 1379 (40 mg/kg) hoặc mAb đối chứng isotyp (10 mg/kg), trong đó các mũi tên quay xuống biểu thị việc định liều kháng thể kháng yếu tố B và các mũi tên quay lên biểu thị liều cuối của mAb 13B1. Như được thể hiện trên Fig.68, chuột nhắt được điều trị bằng mAb ức chế MASP-3 13B1 và mAB yếu tố B 1379 biểu hiện sự cải thiện ở các triệu chứng

lâm sàng được cho điểm theo các thông số được thể hiện trong bảng 35, so với đối chứng isotyp.

Theo như trên đây, kháng thể ức chế MASP-3, như kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao được bộc lộ trong bản mô tả này, được mong đợi là có lợi (bảo vệ thần kinh hoặc tái tạo thần kinh) trong điều trị và/hoặc tái lập thói quen của đối tượng mắc bệnh đa xơ cứng, bệnh xơ cứng đồng tâm Balo, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh đa xơ cứng Marburg, bệnh Schilder, bệnh đa xơ cứng gây u và bệnh viêm não tủy rải rác cấp tính (ADM).

Ví dụ 21

Nghiên cứu dược lực học với mAb MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu ở khỉ đuôi dài.

Bối cảnh/cơ sở lý luận: Như được thể hiện trong các nghiên cứu ở loài gặm nhấm (Fig.44), kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao có khả năng ức chế sự thuần thục của tiền yếu tố D trạng thái ổn định (trạng thái không sinh trưởng) *in vivo*. Ví dụ này mô tả một nghiên cứu được tiến hành ở khỉ đuôi dài để xác định xem mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu có khả năng ức chế hoạt tính APC ở động vật linh trưởng không phải người hay không.

Phương pháp: Để xác nhận rằng MASP-3 hoạt động trong APC ở động vật linh trưởng không phải người, và rằng kháng thể MASP-3 có ái lực cao có khả năng ức chế APC ở động vật linh trưởng không phải người, 9 con khỉ đuôi dài (3 con cho mỗi điều kiện mAb) được cho dùng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg với một trong ba kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu: h4D5X, h10D12X, hoặc h13B1X. ("h" dùng để chỉ việc được làm giống như của người, "X" dùng để chỉ vùng bản lề hằng định của IgG4 (SEQ ID NO:312) chứa cải biến thay thế axit amin S228P ổn định và vùng hằng định IgG4 của người đột biến có đột biến S228P và cũng như đột biến thúc đẩy các tương tác FcRn ở độ pH thấp). Các mẫu huyết tương (EDTA) và các mẫu huyết thanh được thu gom ở các khoảng cách đều nhau trong giai đoạn ba tuần hoặc lâu hơn.

Hai thử nghiệm được sử dụng để đo hoạt tính APC trong huyết thanh từ các khỉ được điều trị. Thử nghiệm thứ nhất đánh giá các mức của yếu tố Bb bổ thể được kết lắng trên các hạt zymosan được bổ sung vào huyết thanh pha loãng. Thử nghiệm thứ hai đo các sản phẩm pha lỏng của APC được hoạt hóa bởi zymosan, các yếu tố bổ thể Ba và Bb, cũng như C3a.

Phương pháp đếm tế bào theo dòng sử dụng kháng thể yếu tố Bb A252 (Quidel) được sử dụng để phát hiện yếu tố Bb được kết lắng trên zymosan. Về phương tiện xác định tín hiệu nền trong thử nghiệm này sau khi ức chế hoàn toàn APC, phần phân ước huyết thanh (nồng độ cuối 5%, được pha loãng trong GVB + Mg/EGTA) điều chế được từ khỉ đuôi dài được điều trị bằng mAb MASP-3 được pha với 300 nM kháng thể yếu tố D ức chế. Để xác định mức độ ức chế APC bởi mAb MASP-3 được phân phối qua đường trong tĩnh mạch cho khỉ, thì một phần phân ước khác của huyết thanh pha loãng được pha với 300 nM kháng thể đối chứng isotyp trung hòa (không có hoạt tính ức chế APC) trước khi kiểm tra sự kết lắng yếu tố Bb trên zymosan. Hỗn hợp pha kháng thể-huyết thanh được ủ trong 30 phút trên băng trước khi bổ sung zymosan (nồng độ cuối 0,1 mg/mL) vào. Hỗn hợp thu được được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 65 phút, và hoạt tính APC được đo bằng cách dò đếm tế bào theo dòng chảy của yếu tố Bb bổ thể (Quidel antibody A252) trên bề mặt của các hạt zymosan.

Để xác định sự tạo ra các chỉ thị pha lỏng Ba, Bb, và C3a, APC được cảm ứng trong các thử nghiệm *ex vivo* bằng cách ủ zymosan (nồng độ cuối 1 mg/mL) trong huyết thanh (nồng độ cuối 5%, được pha loãng trong GVB + Mg/EGTA) điều chế được từ khỉ đuôi dài được điều trị bằng mAb kháng MASP-3. Các hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 40 phút, và hoạt tính APC được đo bằng cách phát hiện các điểm cuối bổ thể trên cơ sở ELISA. Ba, Bb, và C3a được phát hiện ra trong phần dịch nổi trên bề mặt phản ứng bằng cách sử dụng các kit ELISA có bán trên thị trường (Quidel). Các giá trị độ hấp thụ của tất cả các thử nghiệm được chuẩn hóa bằng cách đặt các giá trị trước điều trị là 100% hoạt tính, và mẫu trước điều trị được ủ, nhưng không được tiếp xúc với zymosan, là 0%.

Để liên hệ mức độ ức chế APC với tỷ lệ kháng thể so với đích ở các con khỉ được điều trị bằng mAb MASP-3, các mức MASP-3 huyết thanh và mAb MASP-3 ức chế được định lượng. MASP-3 huyết thanh được đo bằng thử nghiệm ELISA kẹp. Protein MASP-3 được thu giữ trên đĩa có αM3-259 (được mô tả trong Ví dụ 16). Các mẫu huyết thanh (pha loãng theo tỷ lệ 1:40) trước hết được ủ với mAb MASP-3 không được đánh dấu (không được biotin hóa), tương ứng với mAb điều trị, ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, sau đó pha loãng tiếp theo tỷ lệ 1:250 (độ pha loãng cuối 1:10.000) và được bổ sung vào đĩa và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ nữa. Đĩa được rửa và phiên bản được biotin hóa của mAb 10D12 được sử dụng làm kháng thể phát hiện. Phần pha loãng lớn của huyết thanh trước bước phát hiện được sử dụng để tách đích và mAb điều trị, và để ngăn chặn sự cạnh tranh giữa kháng thể điều trị và kháng thể phát hiện. Sau khi đĩa được rửa nhiều lần, streptavidin-HRP được sử dụng cho bước phát hiện cuối. Các giá trị độ hấp thụ được thu thập ở A450 bằng bộ đọc đĩa. Nồng độ MASP-3 trong huyết thanh được ngoại suy từ đường cong chuẩn được tạo ra bằng cách thử nghiệm protein MASP-3 của khỉ đuôi dài, tái tổ hợp, có chiều dài đầy đủ. Lượng kháng thể kháng MASP-3 có mặt trong huyết thanh được phát hiện ra bằng cách sử dụng kit ELISA IgG4 trị liệu ở người (Human Therapeutic IgG4 ELISA Kit) (Cayman Chemicals), theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Phân tích thẩm tách Tây được sử dụng để phân tích mức tiền yếu tố D và yếu tố D trong huyết thanh từ khỉ đuôi dài theo thời gian (giờ) sau khi điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg mAb h13B1X. Mô tả một cách vắn tắt, phân tích thẩm tách Tây được tiến hành bằng cách trộn 20 µL huyết tương của khỉ đuôi dài thu được ở các thời điểm khác nhau trước khi điều trị (-120 giờ, -24 giờ) và sau khi điều trị (72 giờ, 168 giờ, 336 giờ, 504 giờ, 672 giờ và 840 giờ) bằng PBS và 11,2 µL kháng thể kháng CFD (0,5 µg/µL) trên tổng thể tích bằng 400µL ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ. 12 µL Protein A/G cộng Agaroza (Santa Cruz Biotech) được bổ sung vào và hỗn hợp được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Chất kết tủa miễn dịch được thu gom bằng cách ly tâm ở 1000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Các viên kết được rửa năm lần bằng PBS. Sau lần rửa cuối, các viên kết này được tạo huyền phù lại trong 30 µL dung

dịch đệm làm biến tính glycoprotein có nồng độ 1x và glycoprotein được biến tính bằng cách gia nhiệt hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Dung dịch đệm phản ứng G2 có nồng độ 10X, NP-40 10% và 2,5 µL Peptit-N-Glycosidaza (New England Biolabs, P0704L) được bổ sung vào mỗi ống và hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ. Các hạt agaroza được tạo viên kết bằng cách ly tâm ở 1000 x g trong 5 phút và 20 µL phần dịch nổi trên bề mặt được thu gom vào các ống mới. Các protein đã được thu giữ và loại glycosyl được phân giải bằng SDS-PAGE (NuPAGE Bis-Tris Mini Gel 12%) và các gel được điện di-thẩm tách cho phân tích thẩm tách Tây bằng kháng CFD được biotin hóa (R&D Systems BAF1824) và Pierce ™ High Sensitivity Streptavidin-HRP (Thermo Fischer Scientific 21130).

Kết quả

Fig.69 minh họa bằng đồ thị hoạt tính APC trong các mẫu huyết thanh thu được từ nhóm gồm ba con khỉ đuôi dài theo thời gian sau một lần điều trị ở thời điểm =0 với mAb MASP-3 có ái lực cao h13B1X. Hình vẽ này thể hiện giá trị MFI trung bình trong thử nghiệm đếm tế bào theo dòng chảy bằng cách phát hiện yếu tố Bb bổ thể trên bề mặt của các hạt zymosan trong huyết thanh 5% pha với mAb yếu tố D ức chế APC hoặc mAb đối chứng isotyp trung hòa. Như được thể hiện trên Fig.69, các động vật thể hiện hoạt tính APC giảm ngay ở 4 giờ. Nếu việc điều trị bằng kháng thể MASP-3 ngăn chặn APC hữu hiệu như ức chế yếu tố D, thì hai điều kiện kháng thể pha thể hiện cùng một mức ức chế kết lắng Bb trong các mẫu sau định liều, nhưng không ức chế trong điều kiện trước định liều (hoặc thời điểm = 0; Fig.69). Như được thể hiện trên Fig.69, ở 72 giờ sau điều trị, hoạt tính APC giảm đến xấp xỉ mức đạt được bằng cách bổ sung mAb yếu tố D vào các mẫu huyết thanh. Sự ức chế gần như hoàn toàn do điều trị bằng h13B1X, như được xác định bằng thực nghiệm thông qua so sánh với kháng thể yếu tố D đã pha, kéo dài cho đến 336 giờ (14 ngày) sau định liều. Vì thế, các kết quả này cho thấy rằng việc điều trị bằng mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao dẫn đến ức chế APC hoàn toàn và duy trì ở động vật linh trưởng không phải người.

Fig.70 minh họa bằng đồ thị hoạt tính APC, như được xác định bằng kết lắng

Bb trên zymosan, trong các mẫu huyết thanh thu được từ nhóm gồm các con khỉ đuôi dài (3 con mỗi nhóm) được điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao h4D5X, h10D12X hoặc h13B1X. Số liệu kết lắng Bb được thu thập như được mô tả trên đây. Hoạt tính APC đối với các thời điểm điều trị được chuẩn hóa bằng cách đặt các MFI trước điều trị của các mẫu được pha với kháng thể đối chứng isotyp, không ức chế, là 100% hoạt tính, và mẫu trước điều trị được ủ với EDTA 50 mM (để ức chế toàn bộ hoạt tính bổ thể) là 0%. Số liệu điều trị bằng h13BX được sử dụng cho Fig.70 cũng được phản ánh trên Fig.69. Như được thể hiện trên Fig.70, việc điều trị bằng tất cả ba kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao dẫn đến ức chế APC lớn hơn 95%. Các động vật được điều trị bằng h4D5X, h10D12X và h13B1X duy trì sự ức chế APC ít nhất 90% lần lượt trong 6,7, 11,7, và 16 ngày. Vì thế, các kết quả này cho thấy rằng việc điều trị bằng các mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu này đem đến sự ức chế duy trì APC ở động vật linh trưởng không phải người với liều đơn 5 mg/kg.

Fig.71A-Fig.71C minh họa bằng đồ thị các phép đo bổ sung hoạt tính APC. Pha lỏng Ba (Fig.71A), Bb (Fig.71B) và C3a (Fig.71C) được đo trong các mẫu huyết thanh pha loãng, xử lý bằng zymosan, thu được từ nhóm gồm các con khỉ đuôi dài (3 con mỗi nhóm) trong thời gian sau khi điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg h4D5X, h10D12X, và h13B1X như được mô tả ở trên.

Như được thể hiện trên Fig.71A-Fig.71C, việc dùng liều đơn tất cả ba kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao dẫn đến sự ức chế APC, như được xác định bởi ba điểm cuối pha lỏng khác nhau. Dữ liệu này là nhất quán với mức ức chế APC được thể hiện trong nghiên cứu kết lắng Bb trên Fig.70, và minh họa thêm cho hiệu quả của các mAb này trong việc ức chế con đường này trong nhiều tuần.

Fig.72A-Fig.72C minh họa bằng đồ thị mối quan hệ của hoạt tính APC, như được xác định bằng cách sản xuất Ba pha lỏng, so với tỷ lệ mol của kháng thể mAb monome MASP-3 và kháng thể mAb MASP-3 phát hiện được trong huyết thanh từ các con khỉ được điều trị bằng h4D5X (Fig.72A), h10D12X (Fig.72B) hoặc h13B1X (Fig.72C). Mỗi ô trên Fig.72A-Fig.72C đại diện cho dữ liệu từ một con khỉ. Các con

khỉ được sử dụng và huyết thanh (hoặc huyết tương) thu được trong nghiên cứu này là giống như được mô tả ở trên (Fig.69, Fig.70, và Fig.71). Fig.72A-Fig.72C minh họa bằng đồ thị tỷ lệ mol của đích (MASP-3) so với kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao h4D5X (Fig.72A), h10D12X (Fig.72B) và h13B1X (Fig.72C) ở các thời điểm ức chế APC hoàn toàn, như được đo bằng pha lỏng Ba. Nhằm mục đích tham chiếu, tỷ lệ mol 1:1 giữa đích và kháng thể được thể hiện dưới dạng đường chấm chấm trên mỗi đồ thị. Như được thể hiện trên Fig.72A-Fig.72C, đích (MASP-3) so với mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao h4D5X, h10D12X và h13B1X ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 2:1 đến khoảng 2,5:1 (đích so với kháng thể) là đủ để ức chế hoàn toàn APC. Dữ liệu này cho thấy rằng ba mAb ức chế MASP-3 tiêu biểu này là các kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao có hoạt lực mà có khả năng ức chế APC khi có mặt ở nồng độ mol thấp hơn nồng độ của đích. Các mức hoạt lực này chỉ ra rằng các mAb này có khả năng được sử dụng trong lâm sàng để điều trị các bệnh hoặc các dấu hiệu gây ra bởi APC.

Fig.73 thể hiện thẩm tách Tây phân tích mức tiền yếu tố D và yếu tố D trong huyết thanh từ khỉ đuôi dài theo thời gian (giờ) trước và sau khi điều trị bằng liều đơn trong tĩnh mạch 5 mg/kg mAb h13B1X. Như được thể hiện trên Fig.73, yếu tố D có mặt trong huyết tương dưới dạng tiền yếu tố D trong ít nhất 336 giờ (14 ngày) sau một liều của mAb h13B1X. Tóm tắt các kết quả

Như được mô tả trong Ví dụ 11, việc dùng liều đơn kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao, mAb 13B1, cho chuột nhắt dẫn đến sự loại bỏ gần như hoàn toàn hoạt tính của bổ thể con đường nhánh toàn thân trong ít nhất 14 ngày. Cũng được mô tả trong Ví dụ 12, trong nghiên cứu được thực hiện ở mô hình động vật được thiết lập tốt liên quan đến PNH, đã chứng minh được rằng mAb 13B1 cải thiện đáng kể sự sống sót của tế bào hồng cầu giống PNH và bảo vệ tế bào hồng cầu giống PNH tốt hơn đáng kể so với mức mà việc ức chế C5 làm được. Như được mô tả trong Ví dụ 13, cũng cho thấy rằng mAb 13B1 làm giảm tỷ lệ mắc và độ nghiêm trọng của bệnh ở mô hình chuột nhắt mắc viêm khớp. Các kết quả trong ví dụ này cho thấy rằng các mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao tiêu biểu 13B1, 10D12 và 4D5 có hiệu

quả cao trong việc phong bế con đường nhánh ở động vật linh trưởng. Việc dùng liều đơn mAb 13B1, 10D12 hoặc 4D5 cho khỉ đuôi dài dẫn đến việc loại bỏ duy trì hoạt tính con đường nhánh toàn thân kéo dài trong khoảng 16 ngày. Phạm vi loại bỏ con đường nhánh ở khỉ đuôi dài được điều trị bằng kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao là tương đương với phạm vi đạt được bởi việc phong bế yếu tố D *in vitro*, chỉ ra sự ngăn chặn hoàn toàn quá trình chuyển hóa yếu tố D bởi kháng thể ức chế MASP-3. Do đó, mAb ức chế MASP-3 có ái lực cao có tính hữu ích trị liệu cho các bệnh nhân mắc các bệnh liên quan đến sự tăng hoạt tính của con đường nhánh, như, ví dụ, hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD, bao gồm AMD ướt và khô), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS), ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) hoặc TMA liên quan đến cấy ghép), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép kháng lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ.

VII. Các phương án khác

Tất cả các công bố, các đơn sáng chế, và các patent nêu trong bản mô tả này đều được đưa vào theo cách viện dẫn.

Các cải biến và biến đổi của các phương pháp, các hợp phần, và các hợp chất, được mô tả theo sáng chế sẽ là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà không vượt ra khỏi phạm vi và ý tưởng của sáng chế. Mặc dù sáng chế được mô tả liên quan đến các phương án mong muốn cụ thể, cần phải hiểu rằng sáng

chế như được yêu cầu bảo hộ không nên bị giới hạn quá mức ở các phương án cụ thể như vậy. Thực tế thì, các cải biến đa dạng của các cách thức được mô tả để thực hiện sáng chế mà hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y tế, miễn dịch học, dược lý học, ung thư học, hoặc các lĩnh vực liên quan đều được dự tính là nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo như trên đây, sáng chế bao gồm các phương án sau.

Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao mà liên kết một hoặc nhiều epitop trong miền SP

1A. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với miền serin proteaza của MASP-3 của người (các gốc axit amin từ 450 đến 728 của SEQ ID NO:2) với ái lực cao (có K_D thấp hơn 500 pM), trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh.

2A. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được đặc trưng bởi ít nhất một hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính sau:

(a) ức chế sự thuần thục của tiền yếu tố D;

(b) không liên kết với MASP-1 của người (SEQ ID NO:8);

(c) ức chế con đường nhánh ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb) ở đối tượng là động vật có vú;

(d) không ức chế con đường cổ điển.

(e) ức chế sự tan máu và/hoặc sự opsonin hóa;

(f) ức chế sự phân cắt đặc hiệu cơ chất MASP-3 serin proteaza;

(g) giảm sự tan máu hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b;

(h) giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa;

(i) giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D;

(j) giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa;

(k) giảm tạo ra các mức không sinh trưởng và/hoặc được cảm ứng bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng và/hoặc

(l) giảm sự kết lắng yếu tố P.

3A. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong miền serin proteaza của MASP-3 của người, trong đó epitop này nằm trong ít nhất một hoặc nhiều: VLRSQRRDTTVI (SEQ ID NO:9), TAAHVLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:10), DFNIQNYNHDIALVQ (SEQ ID NO:11), PHAECKTSCÓRS (SEQ ID NO:12), GNYSVTENMFC (SEQ ID NO:13), VSNYVDWVWE (SEQ ID NO:14) và/hoặc VLRSQRRDTTV (SEQ ID NO:15). [Nhóm I]

4A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop trong SEQ ID NO:15. [bao gồm tất cả các kháng thể nhóm I]

5A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop trong SEQ ID NO:9. [10D12]

6A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop trong SEQ ID NO:10. [13B1]

7A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 6, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong SEQ ID NO:12. [13B1]

8A. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo đoạn 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong SEQ ID NO:10 và/hoặc SEQ ID NO:12. [13B1]

9A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop trong SEQ ID NO:9. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10]

10A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 7, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong ít nhất một trong số SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13 và/hoặc SEQ ID NO:14. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10]

11A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 7, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong ít nhất một trong số SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 và/hoặc SEQ ID NO:14. [1F3, 4B6, 4D5, 1A10]

12A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này liên kết với epitop trong ít nhất một trong số: ECGQPSRSLPSLV (SEQ ID NO:16), RNAEPGLFPWQ (SEQ ID NO:17); KWFGSGALLSASWIL(SEQ ID NO:18); EHVTVYLGLH (SEQ ID NO:19); PVPLGPHVMP (SEQ ID NO:20); APHMLGL (SEQ ID NO:21); SDVLQYVKLP (SEQ ID NO:22); và/hoặc AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO:23). [nhóm II và III]

13A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 12, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với epitop trong SEQ ID NO:17. [tất cả các kháng thể nhóm II và III]

14A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 13, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong EHVTVYLGLH (SEQ ID NO:19) và/hoặc AFVIFDDLSQRW (SEQ ID NO:23). [1G4, 1E7, 2D7 15D9]

15A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 14, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong SEQ ID NO:23. [1G4, 1E7, 2D7, 15D9, 2F5]

16A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 14, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong SEQ ID NO:19 và/hoặc SEQ ID NO:23. [Ig4, 1E7, 2D7]

17A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 14, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 và/hoặc SEQ ID NO:23. [15D9, 2F5]

18A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 14, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong ít nhất một trong số SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 và/hoặc SEQ ID NO:23 [15D9, 2F5].

19A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 14, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong ít nhất một trong số SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 21 và/hoặc SEQ ID NO:22. [1B11]

20A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 14, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên còn liên kết với epitop trong ít nhất một trong số SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 21 và/hoặc SEQ ID NO:22 [1B11].

21A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 20, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể chuột, và mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn bất kỳ ở trên.

22A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 21, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

23A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 22, còn bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch.

24A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 23, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này được làm giống như của người.

25A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 24, trong đó kháng thể này liên kết với miền serin proteaza của MASP-3 của người với ái lực thấp hơn 500 pM.

26A. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 25, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh trong máu của động vật có vú.

27A. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1A đến 26A và tá dược dược dụng.

A. Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao nhóm IA mà liên kết một hoặc nhiều epitop trong miền SP (4D5, 4B6, 1A10 + các biến thể của 4D5)

1B. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:209 (XXDIN, trong đó X ở vị trí 1 là S hoặc T và trong đó X ở vị trí 2 là N hoặc D); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:210 (WIYPRDXXXKYNXXFXD, trong đó X ở vị trí 7 là G hoặc D; X ở vị trí 8 là S, T hoặc R; X ở vị trí 9 là I hoặc T; X ở vị trí 13 là E hoặc D; X ở vị trí 14 là K hoặc E; và X ở vị trí 16 là T hoặc K); và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:211 (XEDXY, trong đó X ở vị trí 1 là L hoặc V, và trong đó X ở vị trí 4 là T hoặc S); và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:212 (KSSQSLLXXRTRKNYLX, trong đó X ở vị trí 8 là N, I, Q hoặc A; trong

đó X ở vị trí 9 là S hoặc T; và trong đó X ở vị trí 17 là A hoặc S); LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:144 (WASTRES) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:146 (KQSYNLYT).

2B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:56 (TDDIN). [4D5 và các biến thể]

3B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:62 (SNDIN). [1F3, 4B6 và 1A10]

4B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:58 (WIYPRDDRTKYNDKFKD) [4D5 và các biến thể].

5B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:63 (WIYPRDGSIKYNEKFTD). [1F3]

6B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:67 (WIYPRDGTTKYNEEFTD). [4B6]

7B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:69 (WIYPRDGTTKYNEKFTD). [1A10]

8B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:60 (LEDTY) [4D5 và các biến thể]

9B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:65 (VEDSY). [1F3, 4B6 và 1A10]

10B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó LC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo (b) chứa SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA); SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA), SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); hoặc SEQ ID NO:259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA). [4D5 và các biến thể]

11B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 10, trong đó LC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo (b) chứa SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA). [thể đột biến 4D5 NA]

12B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó LC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo (b) chứa SEQ ID NO:149 (KSSQSLLISRTRKNYLS). [1F3 và 4B6]

13B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:56, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:58, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:60 và trong đó LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258 hoặc SEQ ID NO:259; trong đó LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:144 và trong đó LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:146. [tất cả 6 CDR của 4D5 với các biến thể ở LC-CDR1].

14B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:62, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:67 hoặc SEQ ID NO:69, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:65 và trong đó LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:149, LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:144 và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:146. [tất cả 6 CDR của 1F3, 4B6 và 1A10]

15B. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể chuột, và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ ở trên.

16B. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 15, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

17B. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 16, còn bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch.

18B. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 17, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được làm giống như của người.

19B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:248 hoặc SEQ ID NO:249 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:250 hoặc SEQ ID NO:278 [các phiên bản 4D5 ban đầu, được làm giống như của người và cải biến].

20B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:25 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:41 [1F3].

21B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:26 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:42 [4B6].

22B. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi

nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:27 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:42 [1A10].

23B. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 22 trong đó kháng thể này liên kết với MASP-3 của người với ái lực thấp hơn 500 pM.

24B. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 23, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh trong máu của động vật có vú.

25B. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1B đến 24B và tá dược dược dụng.

B. Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao nhóm IB mà liên kết một hoặc nhiều epitop trong miền SP (10D12, 35C1 và các biến thể của 10D12)

1C. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:213 (SYGXX, trong đó X ở vị trí 4 là M hoặc I và trong đó X ở vị trí 5 là S hoặc T); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:74; và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:214 (GGXAXDY, trong đó X ở vị trí 3 là E hoặc D và trong đó X ở vị trí 5 là M hoặc L); và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:215 (KSSQSLLDSXXKTYLX, trong đó X ở vị trí 10 là D, E hoặc A; trong đó X ở vị trí 11 là G hoặc A; và trong đó X ở vị trí 16 là N hoặc S); LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:155; và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:216 (WQGTHFPXT, trong đó X ở vị trí 8 là W hoặc Y).

2C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:72 (SYGMS). [10D12 và các biến thể]

3C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:79 (SYGIT). [35C1]

4C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:76 (GGEAMDY). [10D12 và các biến thể].

5C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng theo (a) chứa SEQ ID NO:82 (GGDALDY). [35C1]

6C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó LC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo (b) chứa SEQ ID NO:153 (KSSQSLLDSDGKTYLN); SEQ ID NO:261 (KSSQSLLDSEGKTYLN), SEQ ID NO:262 (KSSQSLLDSAGKTYLN) hoặc SEQ ID NO:263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). [10D12 và các biến thể]

7C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 6, trong đó LC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:263 (KSSQSLLDSDAKTYLN). [10D12 GA biến thể]

8C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó LC-CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:152. [35C1]

9C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó LC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo (b) chứa SEQ ID NO:159 (KSSQSLLDSDGKTYLS). [10D12]

10C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó LC-CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo (b) chứa SEQ ID NO:160 (WQGTHFPYT). [35C1]

11C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:72, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:74, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:76, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:261, SEQ ID NO:262 hoặc SEQ ID NO:263; LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:155 và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:157. [tất cả 6 CDR của 10D12 với các biến thể ở LC-CDR1]

12C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó HC-CDR1 chứa SEQ ID NO:79, HC-CDR2 chứa SEQ ID NO:74, HC-CDR3 chứa SEQ ID NO:82, LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:159, LC-CDR2 chứa SEQ ID NO:155 và LC-CDR3 chứa SEQ ID NO:160. [tất cả 6 CDR của 35C1]

13C. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 12, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể chuột, và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ ở trên.

14C. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 13, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

15C. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 14, còn bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch.

16C. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 15, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được làm giống như của người.

17C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:251 hoặc SEQ ID NO:252 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:253 hoặc SEQ ID NO:279 [10D12 ban đầu, được làm giống như của người và các biến thể].

18C. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:29 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:44 [35C1].

19C. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 18 trong đó kháng thể này liên kết với MASP-3 của người với ái lực thấp hơn 500 pM.

20C. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 19, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh trong máu của động vật có vú.

21C. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1C đến 20C và tá dược dược dụng.

C. Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao nhóm IC mà liên kết một hoặc nhiều epitop trong miền SP (13B1 và các biến thể)

1D. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:84 (GKWIE); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) hoặc SEQ ID NO:275

(EILPGTGSTNYAQKFQG); và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:88 (SEDV); và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); hoặc SEQ ID NO:259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:144 (WASTRES); và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:161 (KQSYNIPT). [tất cả 6 CDR của 13B1 và các biến thể trong LC-CDR1]

2D. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó LC-CDR1 chứa SEQ ID NO:258. [13B1 LC-CDR1 NA biến thể]

3D. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể chuột, và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ ở trên.

4D. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

5D. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 4, còn bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch.

6D. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này được làm giống như của người.

7D. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa

ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:254 hoặc SEQ ID NO:255 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:256 hoặc SEQ ID NO:280 [13B1 ban đầu, được làm giống như của người và các biến thể].

8D. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 7 trong đó kháng thể này liên kết với MASP-3 của người với ái lực thấp hơn 500 pM.

9D. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh trong máu của động vật có vú.

10D. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1D đến 9D và tá dược dược dụng.

D. Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao nhóm II mà liên kết một hoặc nhiều epitop trong miền SP (1G4)

1E. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:91 (GYWIE); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:93 (EMLPGSGSTHYNEKFKG), và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:95 (SIDY); và

(b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:163 (RSSQSLVQSNGNTYLH), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:165 (KVSNRFS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:167 (SQSTHVPPT).

2E. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể người,

kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể chuột, và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ ở trên.

3E. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

4E. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 3, còn bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch.

5E. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được làm giống như của người.

6E. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:31 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:46 [1G4].

7E. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 6 trong đó kháng thể này liên kết với MASP-3 của người với ái lực thấp hơn 500 pM.

8E. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh trong máu của động vật có vú.

9E. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1E đến 8E và tá dược dược dụng.

F. Kháng thể ức chế MASP-3 có ái lực cao nhóm III mà liên kết một hoặc nhiều epitop trong miền SP (1E7, 2D7, 15D9, 2F5, 1B11, 2F2, 11B6)

1F. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm:

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:109 (RVHFAIRDTNYWMQ), HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:110 (AIYPGNGDTSYNQKFKG), HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:112 (GSHYFDY); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:182 (RASQSIGTSIH), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:184 (YASESIS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:186 (QQSNSWPYT) [1E7]; hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:125 (DYYMN), HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:127 (DVNPNNDGTTYNQKFKG), HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:129 (CPFYYLGKGTHFDY); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:196 (RASQDISNFLN), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:198 (YTSRLHS) và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:200 (QQGFTLPWT) [2D7]; hoặc

(c) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:132, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:133, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:135; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:203, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:165 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:204 [49C11]; hoặc

(d) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:137, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:138, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:140; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:206, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:207 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:208 [15D9]; hoặc

(e) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:98, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:99, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:101; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:169, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:171 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:173. [2F5]; hoặc

(f) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:103, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:105, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:107; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:176, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:193 [1B11]; hoặc

(g) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:114, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:116, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:118; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:188, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:190 [2F2]; hoặc

(h) vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:114, HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:121, HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:123; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:191, LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:178 và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:193. [11B6]

2F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1(a)-1(g), trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể chuột, và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ ở trên.

3F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 2, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

4F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 3, còn bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch.

5F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này được làm giống như của người.

6F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:32 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:47 [1E7].

7F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:33 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:48 [2D7].

8F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:34 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:49 [49C11].

9F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:35 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:50 [15D9]

10F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:36 và chuỗi nhẹ

chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:51 [2F5].

11F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:37 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:52 [1B11].

12F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:38 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:53 [2F2].

13F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:39 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% hoặc 100% đồng nhất với SEQ ID NO:54 [11B6].

14F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 13 trong đó kháng thể này liên kết với MASP-3 của người với ái lực thấp hơn 500 pM.

15F. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 14, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh trong máu của động vật có vú.

16F. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1F đến 15F và tá dược dược dụng.

E. Sử dụng kháng thể ức chế MASP-3 để điều trị các bệnh AP

1. Phương pháp ức chế sự hoạt hóa bổ thể theo con đường nhánh ở động vật có vú, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng động vật có vú cần điều trị dùng một lượng chế phẩm chứa kháng thể ức chế MASP-3 với ái lực cao hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó đủ để ức chế sự hoạt hóa con đường bổ thể theo con đường nhánh ở động vật có vú đó.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với MASP-3 với ái lực thấp hơn 500 pM.

3. Phương pháp theo đoạn 1, trong đó do sử dụng chế phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, một hoặc nhiều tính chất sau có mặt ở đối tượng là động vật có vú:

(a) ức chế sự thuần thục của yếu tố D;

(b) ức chế con đường nhánh khi được sử dụng cho đối tượng ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb)

(c) con đường cổ điển không được ức chế.

(d) ức chế sự tan máu và/hoặc sự opsonin hóa;

(e) giảm sự tan máu hoặc giảm sự phân cắt C3 và sự kết lắng bề mặt của C3b;

(f) giảm sự kết lắng yếu tố B và Bb trên bề mặt hoạt hóa;

(g) giảm mức độ nghỉ (trong tuần hoàn, và không thử nghiệm thêm về bề mặt hoạt hóa) của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D;

(h) giảm mức của yếu tố D có hoạt tính so với tiền yếu tố D đáp ứng với bề mặt hoạt hóa; và/hoặc

(i) giảm sự phát sinh mức độ nghỉ và được kích thích bề mặt của Ba, Bb, C3b, hoặc C3a pha lỏng.

4. Phương pháp theo đoạn 1, trong đó kháng thể ức chế con đường nhánh ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 2,5:1 (MASP-3 hướng đích mAb)

5. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 3 trong đó kháng thể MASP-3 có ái lực cao được đặc trưng theo điểm bất kỳ trong số các điểm 27A, 25B, 21C, 10D, 9E hoặc 16F.

6. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó ức chế có chọn lọc con đường nhánh mà không ảnh hưởng đến con đường hoạt hóa cổ điển.

7. Phương pháp theo đoạn bất kỳ trong số các đoạn từ 1 đến 6 trong đó đối tượng động vật có vú mắc, hoặc có nguy cơ phát triển bệnh hoặc rối loạn của con đường nhánh được chọn từ nhóm bao gồm hemoglobin niệu kịch phát ban đêm (PNH), bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD, bao gồm AMD ướt và khô), tổn thương do thiếu máu cục bộ-tái tưới máu, viêm khớp, đông máu rải rác trong lòng mạch, bệnh mao mạch huyết khối (bao gồm hội chứng tan huyết tăng urê huyết (HUS), hội chứng tan huyết tăng urê huyết không điển hình (aHUS), ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP) hoặc TMA liên quan đến cấy ghép), hen suyễn, viêm cầu thận màng-tăng sinh, viêm cầu thận liềm thể hoại tử nghèo miễn dịch, chấn thương sọ não, viêm phổi sặc, viêm nội nhãn, viêm tủy-thị thần kinh, bệnh Behcet, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Guillain Barre, bệnh Alzheimer, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), viêm thận do luput, luput ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh võng mạc tiểu đường, viêm màng bồ đào, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh tiểu cầu thận C3, thải loại mảnh ghép, bệnh mảnh ghép kháng lại ký chủ (GVHD), thẩm phân máu, nhiễm trùng huyết, hội chứng đáp ứng viêm toàn thân (SIRS), hội chứng suy hô hấp cấp (ARDS), viêm mạch ANCA, hội chứng kháng phospholipit, xơ vữa động mạch, bệnh thận IgA và bệnh nhược cơ.

Mặc dù phương án ưu tiên theo sáng chế đã được minh họa và mô tả, nhưng cần hiểu rằng các thay đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không tách rời khỏi phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với MASP-3 bao gồm:

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa HC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:84 (GKWIE); HC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:86 (EILPGTGSTNYNEKFKG) hoặc SEQ ID NO:275 (EILPGTGSTNYAQKFQG); và HC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:88 (SEDV); và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa LC-CDR1 được nêu trong SEQ ID NO:142 (KSSQSLLNSRTRKNYLA), SEQ ID NO:257 (KSSQSLLQSRTRKNYLA); SEQ ID NO:258 (KSSQSLLASRTRKNYLA); hoặc SEQ ID NO:259 (KSSQSLLNTRTRKNYLA), LC-CDR2 được nêu trong SEQ ID NO:144 (WASTRES); và LC-CDR3 được nêu trong SEQ ID NO:161 (KQSYNIPT).

2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó LC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO:258.

3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể khảm, kháng thể chuột, và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên.

4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn bao gồm vùng hằng định globulin miễn dịch.

6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này được làm giống như của người.

7. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này liên kết với miền serin proteaza của MASP-3 của người với ái lực thấp hơn 500 pM.

8. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này ức chế sự hoạt hóa con đường nhánh trong máu của động vật có vú.

9. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1 hoặc 5 và tá dược dược dụng.

10. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó HC-CDR2 bao gồm SEQ ID NO:86.

11. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó HC-CDR2 bao gồm SEQ ID NO:275.

12. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó HC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO:142.

13. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó HC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO:257.

14. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó HC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO:259.

15. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó HC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO: 84, HC-CDR2 bao gồm SEQ ID NO: 86, HC-CDR3 bao gồm SEQ ID NO: 88, LC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO: 258, LC-CDR2 bao gồm SEQ ID NO: 144 và LC-CDR3 bao gồm SEQ ID NO: 161.

16. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó HC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO: 84, HC-CDR2 bao gồm SEQ ID NO: 275, HC-CDR3 bao gồm SEQ ID NO: 88, LC-CDR1 bao gồm SEQ ID NO: 258, LC-CDR2 bao gồm SEQ ID NO: 144 và LC-CDR3 bao gồm SEQ ID NO: 161.

17. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30.

18. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45.

19. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45.

20. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 254.

21. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 255.

22. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 256.

23. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 280.

24. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với MASP-3 của người, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:254 hoặc SEQ ID NO:255 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:256 hoặc SEQ ID NO:280.

25. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 24, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:254 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:256.

26. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 24, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:255 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:256.

27. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 24, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:254 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:280.

28. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 24, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO:255 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:280.

29. Kháng thể được phân lập theo điểm 24, trong đó kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể chuỗi đơn, ScFv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')2, kháng thể đơn giá thiếu vùng bản lề và kháng thể nguyên vẹn.

30. Kháng thể được phân lập theo điểm 24, trong đó kháng thể này còn chứa vùng hằng định globulin miễn dịch.

31. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 24 và tá dược dược dụng.

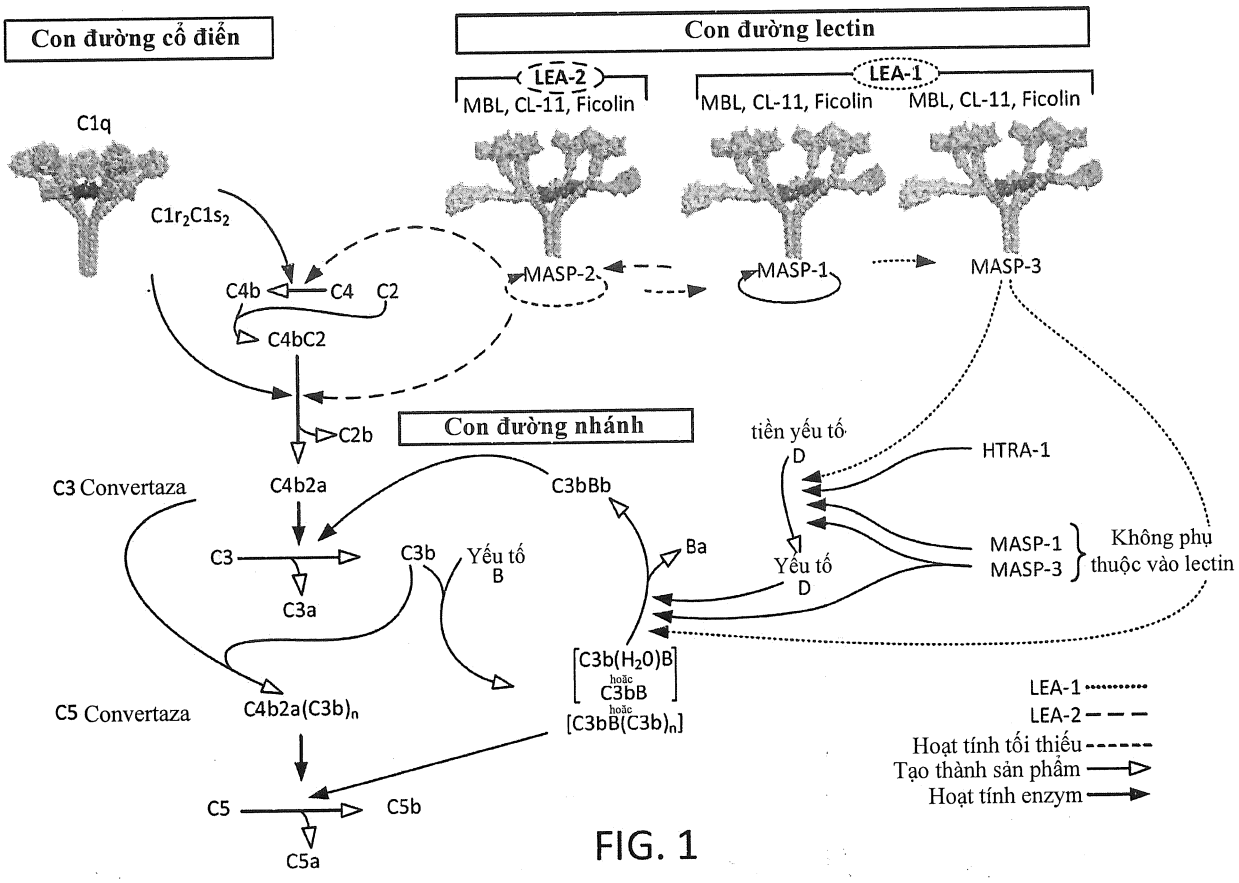

Con đường cổ điển
Con đường lectin
LEA-2
MBL, CL-11, Ficolin
LEA-1
MBL, CL-11, Ficolin
MBL, CL-11, Ficolin
C1q
C1r2C1s2
MASP-2
MASP-1
MASP-3
C4b
C4
C2
C4bC2
C2b
Con đường nhánh
tiền yếu tố D
HTRA-1
C3 Convertaza
C4b2a
C3bBb
C3
C3b
Yếu tố B
Ba
C3a
Yếu tố D
MASP-1
MASP-3
Không phụ thuộc vào lectin
[C3b(H2O)B hoặc C3bB hoặc [C3bB(C3b)n]
C5 Convertaza
C4b2a(C3b)n
C5
C5b
C5a
LEA-1
LEA-2
Hoạt tính tối thiểu
Tạo thành sản phẩm
Hoạt tính enzym

FIG. 1

1/93

FIG. 2

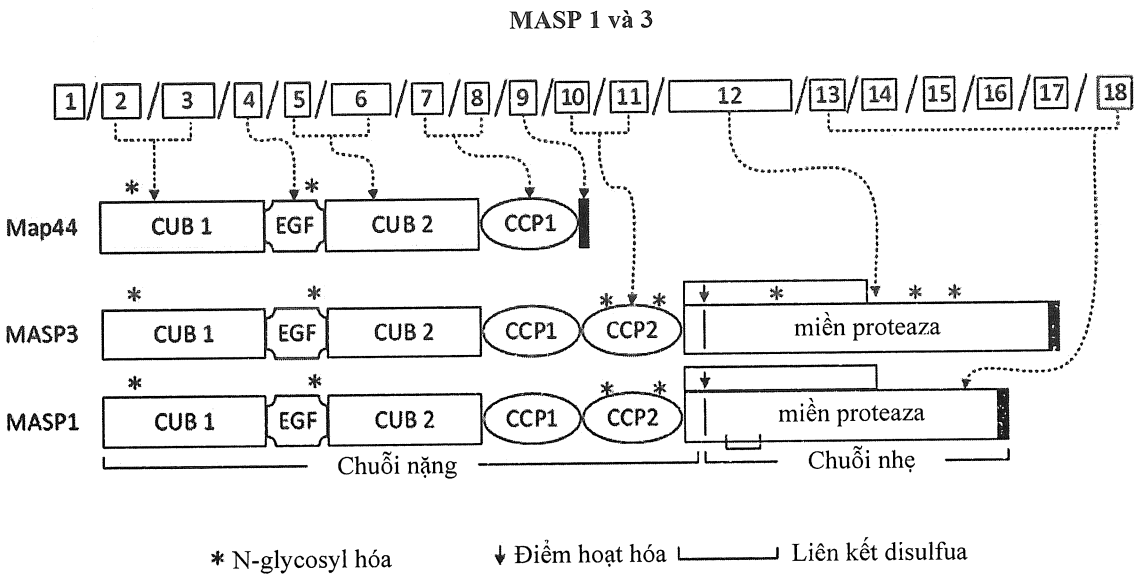

MASP 1 và 3
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
Map44
CUB 1
EGF
CUB 2
CCP1
MASP3
CUB 1
EGF
CUB 2
CCP1
CCP2
miền proteaza
MASP1
CUB 1
EGF
CUB 2
CCP1
CCP2
miền proteaza
Chuỗi nặng
Chuỗi nhẹ
* N-glycosyl hóa
Điểm hoạt hóa
Liên kết disulfua

FIG. 3

MASP-3 của người (SEQ ID NO:2)

MRWLLLYYALCFSLSKASAHTVELNNMFGQIQSPGYPDSYPSDSEVTWNITVPDGFRIKLYFMHFNLESSYLCEYD
YVKVETEDQVLATFCGRETTDTEQTPGQEVVLSPGSFMSITFRSDFSNEERFTGFDAHYMAVDVDECKEREDEELS
CDHYCHNYIGGYYCSCRFGYILHTDNRTCRVECSDNLFTQRTGVITSPDFPNPYPKSSECLYTIELEEGFMVNLQF
EDIFDIEDHPEVPCPYDYIKIKVGPKVLGPFCGEKAPEPISTQSHSVLILFHSDNSGENRGWRLSYRAAG
NECPELQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELE
HGLITFSTRNNLTTYKSEIKYSCQEPYYKMLNNNTGIYTCSAQGVWMNKVLGRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRI
IGGRNAEPGLFPWQALIVVEDTSRVPNDKWFGSGALLSASWILTAAHVLRSQRRDTTVIPVSKEHVTVYLGLHDVR
DKSGAVNSSAARVVLHPDFNIQNYNHDIALVQLQEPVPLGPHVMPVCLPRLEPEGPAPHMLGLVAGWGISNPNVTV
DEIISSGTRTLSDVLQYVKLPVVPHAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYYEGGKDTCLGDSGGAFVIFDDLSQRW
VVQGLVSWGGPEECGSKQVYGVYTKVSNYVDWVWEQMGLPQSVVEPQVER

CUB1-EGF-CUB2

CCP1-CCP2-SP

3/93

FIG. 4

MASP-3 protein: sắp xếp thẳng hàng nhiều loài

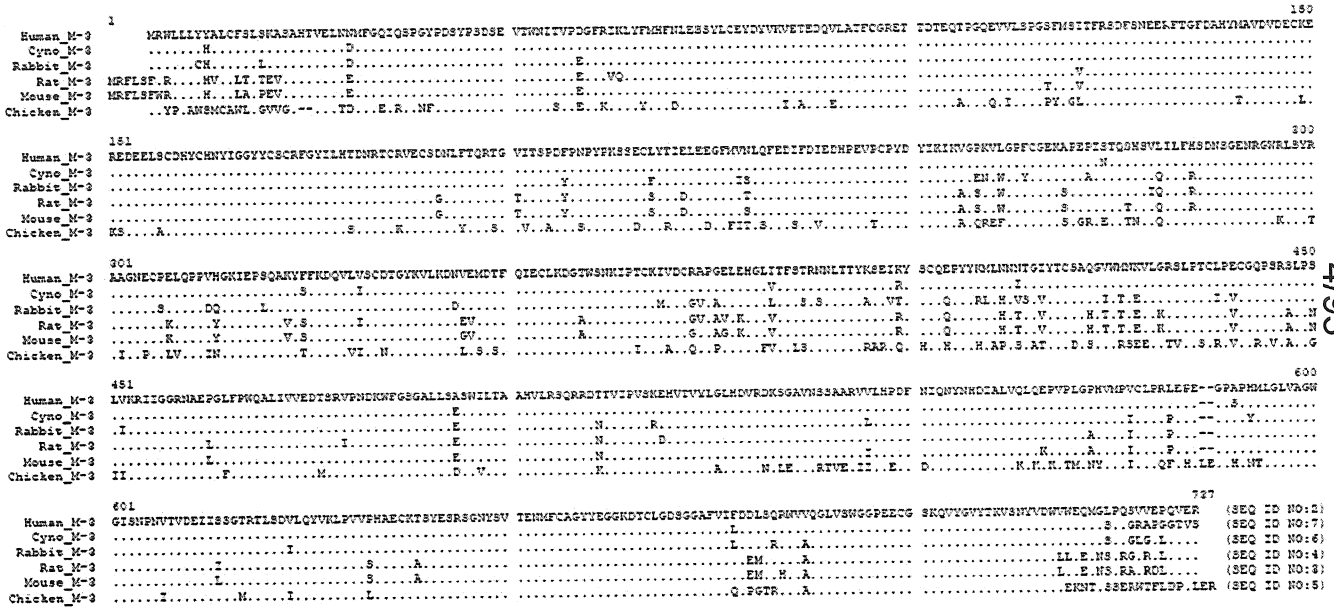


FIG. 5

Miền MASP-3 SP sắp xếp thẳng hàng nhiều loài

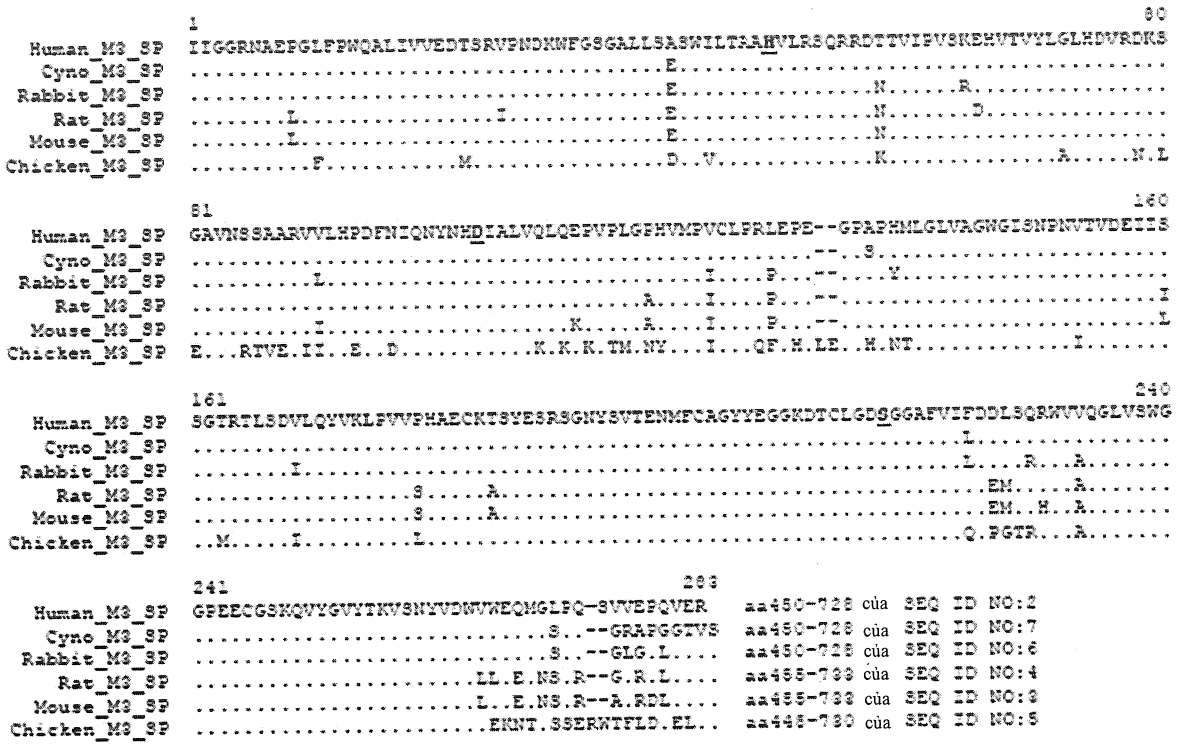


FIG. 6

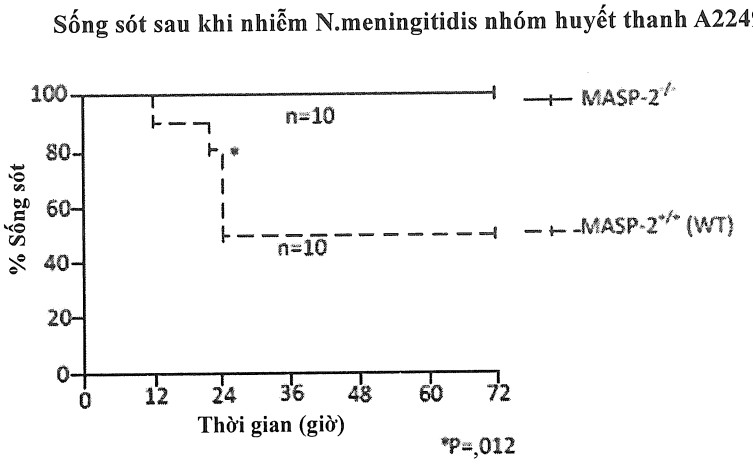

Sống sót sau khi nhiễm N.meningitidis nhóm huyết thanh A22491
100
80
60
40
20
0
% Sống sót
0
12
24
36
48
60
72
Thời gian (giờ)
n=10
n=10
*
MASP-2-/-
MASP-2+/+ (WT)
*P=,012

FIG. 7

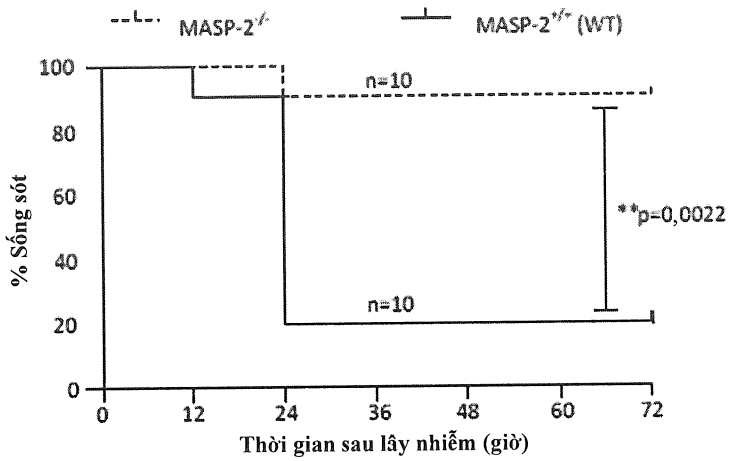

MASP-2-/-
MASP-2+/+ (WT)
100
80
60
40
20
0
% Sống sót
n=10
**p=0,0022
n=10
0
12
24
36
48
60
72
Thời gian sau lây nhiễm (giờ)

FIG. 8

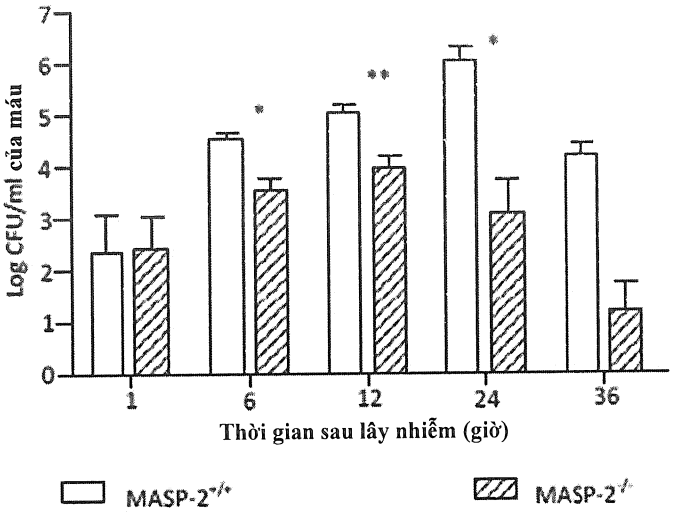

Log CFU/ml của máu
0
1
2
3
4
5
6
7
1
6
12
24
36
Thời gian sau lây nhiễm (giờ)
*
**
*
MASP-2+/+
MASP-2-/-

FIG. 9

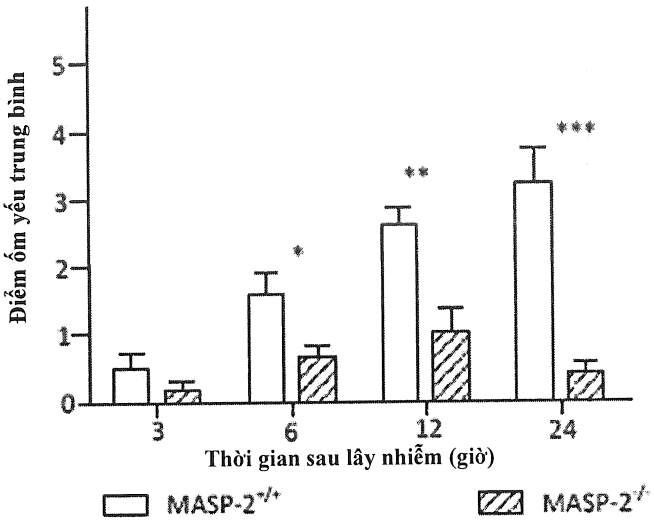

Điểm ốm yếu trung bình
0
1
2
3
4
5
*
**
***
3
6
12
24
Thời gian sau lây nhiễm (giờ)
MASP-2+/+
MASP-2-/-

FIG. 10

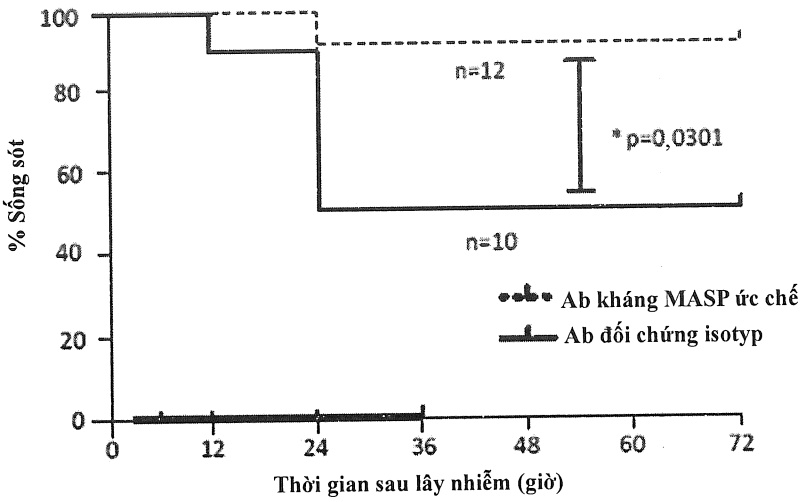

100
80
60
40
20
0
% Sống sót
n=12
* p=0,0301
n=10
Ab kháng MASP ức chế
Ab đối chứng isotyp
0
12
24
36
48
60
72
Thời gian sau lây nhiễm (giờ)

FIG. 11

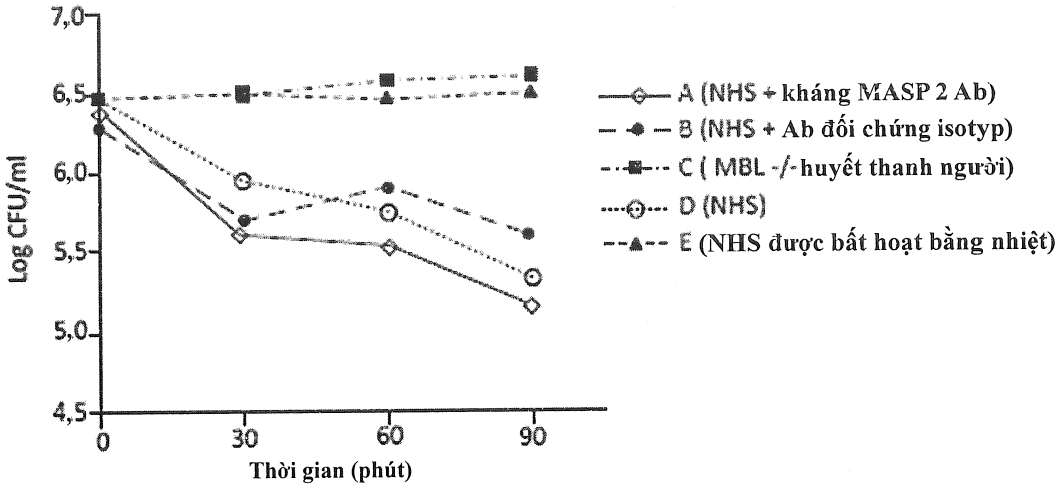

7,0
6,5
6,0
5,5
5,0
4,5
Log CFU/ml
0
30
60
90
Thời gian (phút)
A (NHS + kháng MASP 2 Ab)
B (NHS + Ab đối chứng isotyp)
C (MBL -/- huyết thanh người)
D (NHS)
E (NHS được bất hoạt bằng nhiệt)

FIG. 12

Tiêu diệt phụ thuộc vào bổ thể của *Neisseria meningitidis* trong huyết thanh người 20% thể tích/thể tích

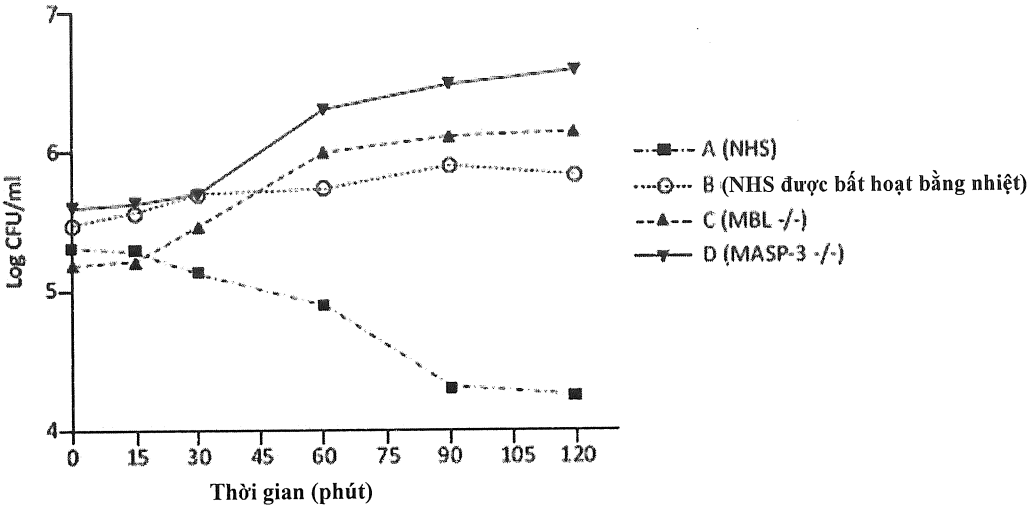


FIG. 13

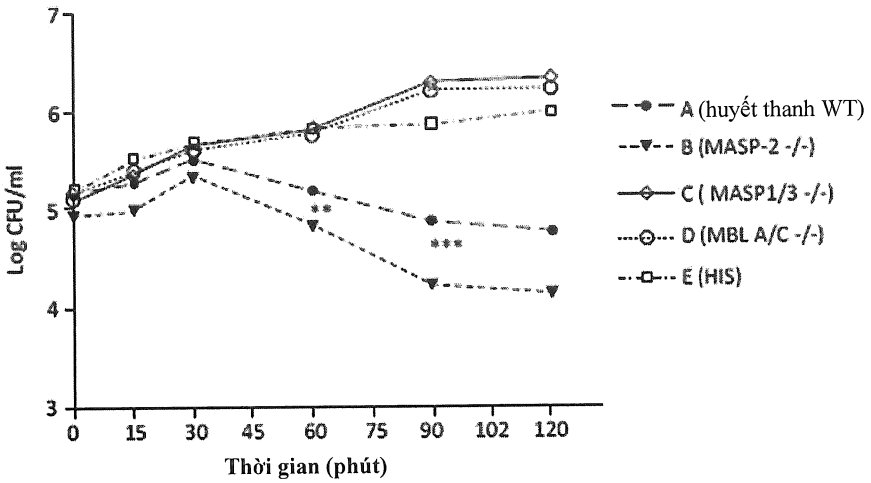

Log CFU/ml
7
6
5
4
3
0
15
30
45
60
75
90
102
120
Thời gian (phút)
**
***
A (huyết thanh WT)
B (MASP-2 -/-)
C (MASP1/3 -/-)
D (MBL A/C -/-)
E (HIS)

FIG. 14

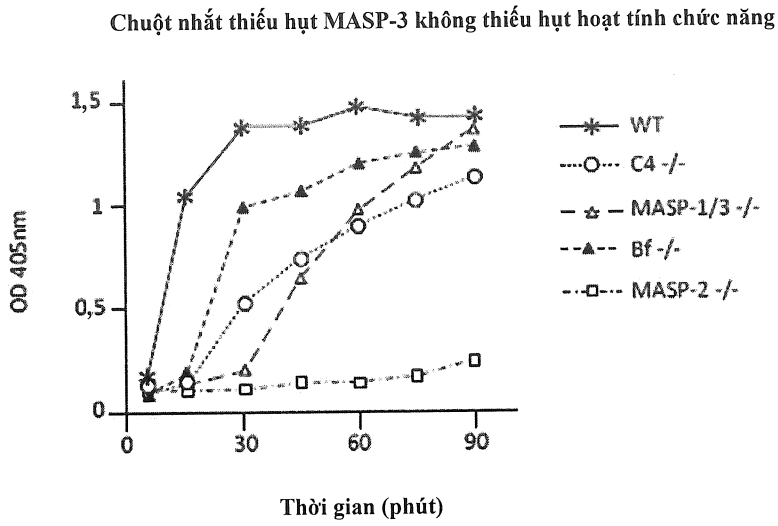

Chuột nhắt thiếu hụt MASP-3 không thiếu hụt hoạt tính chức năng LP
OD 405nm
1,5
1
0,5
0
0
30
60
90
Thời gian (phút)
WT
C4 -/-
MASP-1/3 -/-
Bf -/-
MASP-2 -/-

FIG. 15

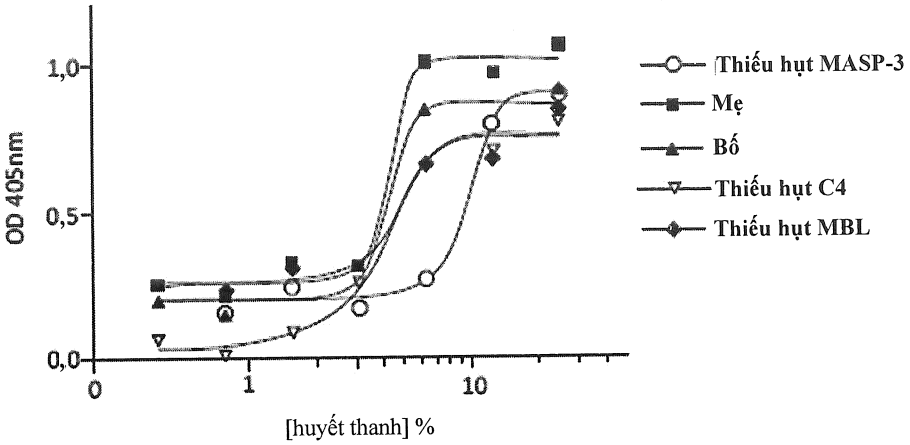

OD 405nm
1,0
0,5
0,0
0
1
10
[huyết thanh] %
Thiếu hụt MASP-3
Mẹ
Bố
Thiếu hụt C4
Thiếu hụt MBL

FIG. 16

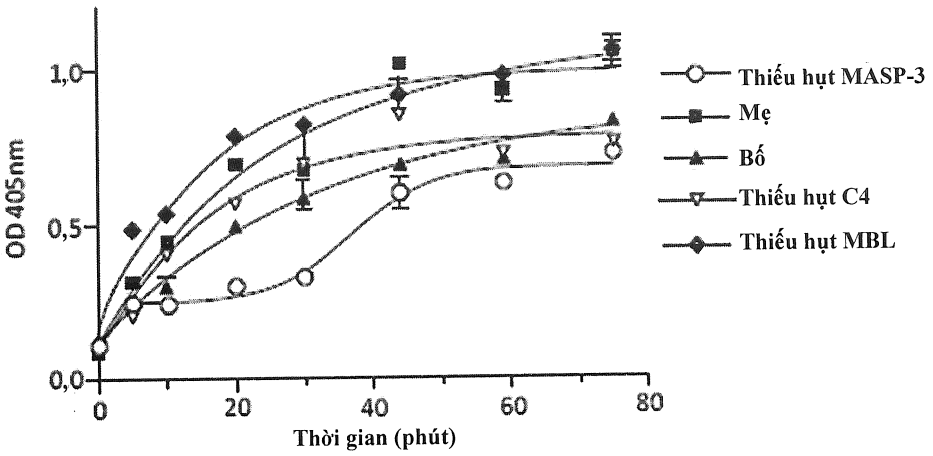

OD 405nm
1,0
0,5
0,0
0
20
40
60
80
Thời gian (phút)
Thiếu hụt MASP-3
Mẹ
Bố
Thiếu hụt C4
Thiếu hụt MBL

FIG. 17A

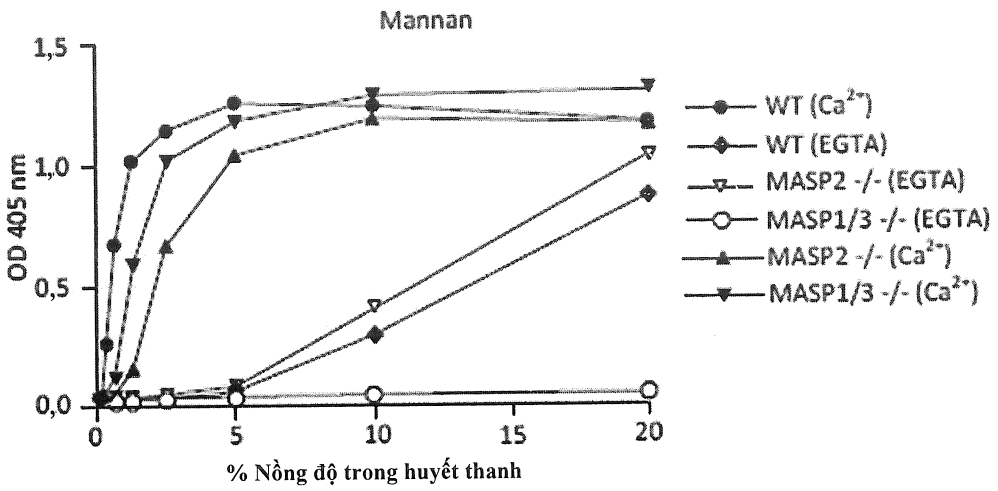

Mannan
OD 405 nm
1,5
1,0
0,5
0,0
0
5
10
15
20
% Nồng độ trong huyết thanh
WT (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)
MASP2 -/- (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)

FIG. 17B

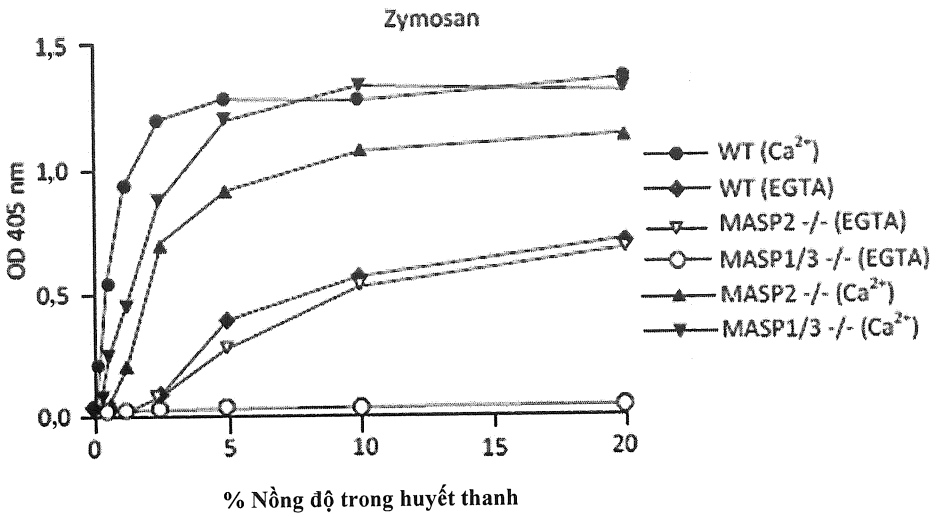

Zymosan
1,5
1,0
0,5
0,0
OD 405 nm
0
5
10
15
20
% Nồng độ trong huyết thanh
WT (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)
MASP2 -/- (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)

FIG. 17C

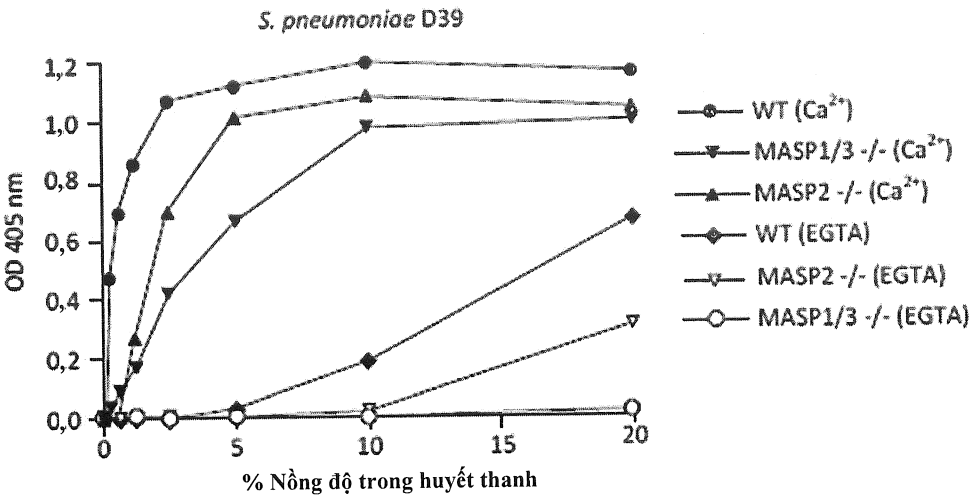

S. pneumoniae D39
OD 405 nm
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
5
10
15
20
% Nồng độ trong huyết thanh
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

FIG. 18A

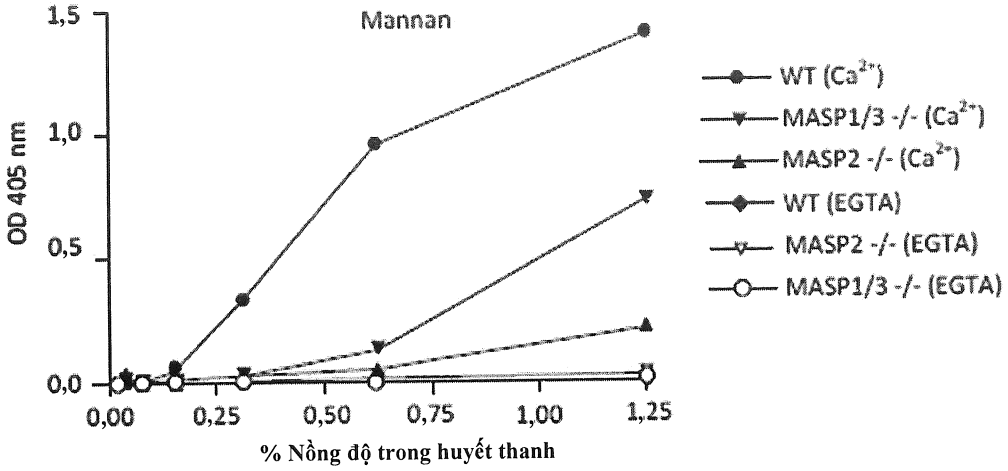

Mannan
OD 405 nm
1,5
1,0
0,5
0,0
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
1,25
% Nồng độ trong huyết thanh
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

FIG. 18B

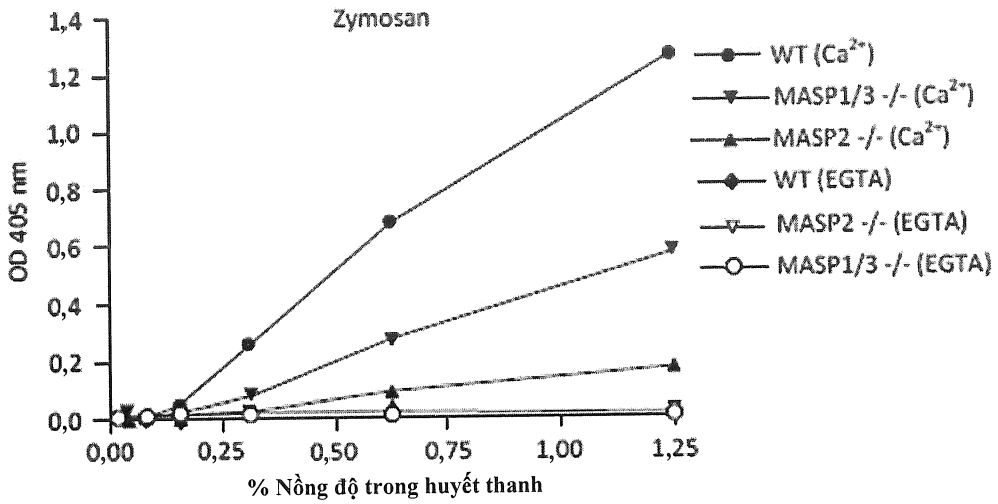

Zymosan
OD 405 nm
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
1,25
% Nồng độ trong huyết thanh
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

FIG. 18C

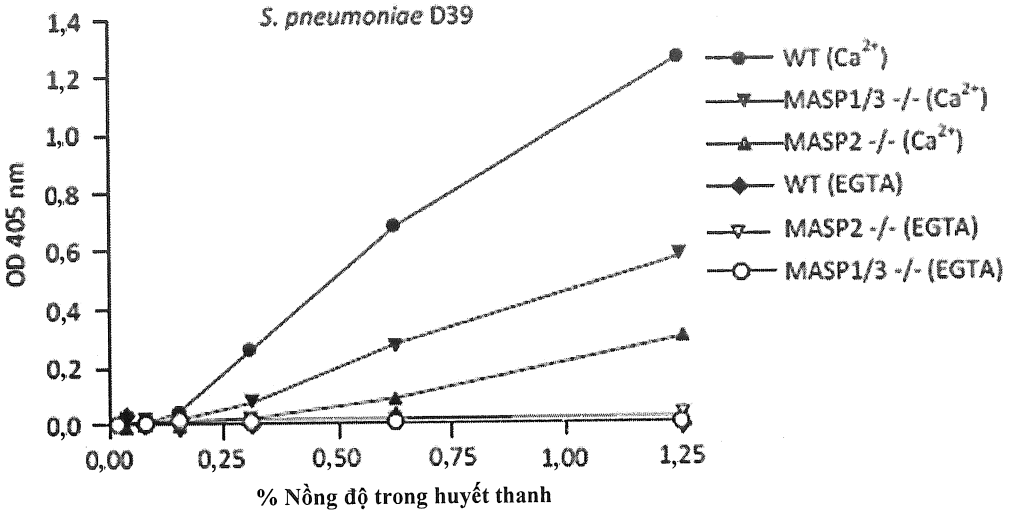

S. pneumoniae D39
OD 405 nm
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,00
0,25
0,50
0,75
1,00
1,25
% Nồng độ trong huyết thanh
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

FIG. 19

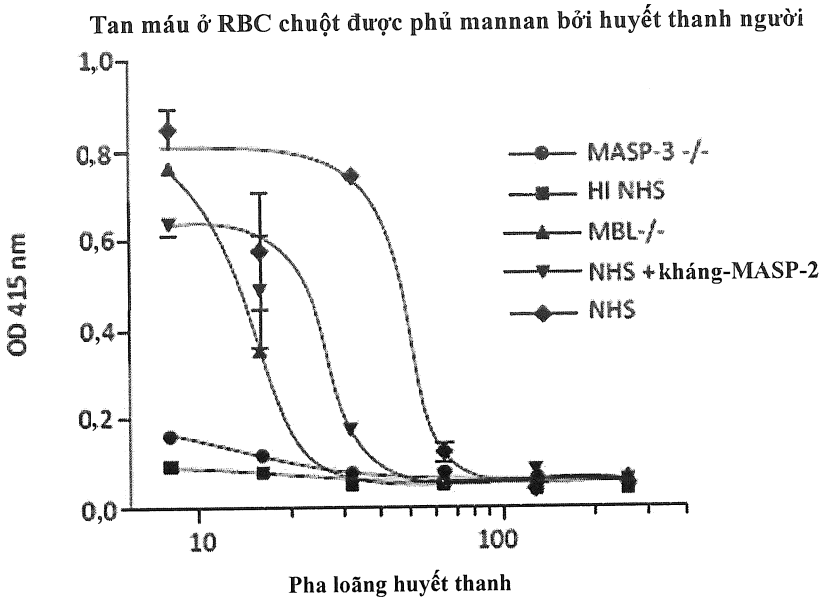

Tan máu ở RBC chuột được phủ mannan bởi huyết thanh người
OD 415 nm
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
10
100
Pha loãng huyết thanh
MASP-3 -/-
HI NHS
MBL-/-
NHS +kháng-MASP-2
NHS

FIG. 20

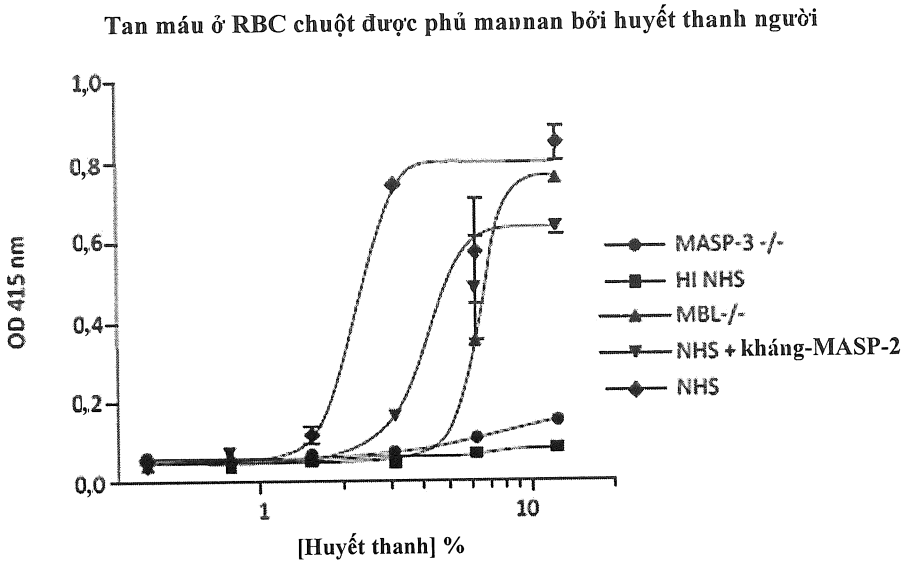

Tan máu ở RBC chuột được phủ mannan bởi huyết thanh người
OD 415 nm
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
1
10
[Huyết thanh] %
MASP-3 -/-
HI NHS
MBL-/-
NHS + kháng-MASP-2
NHS

FIG. 21

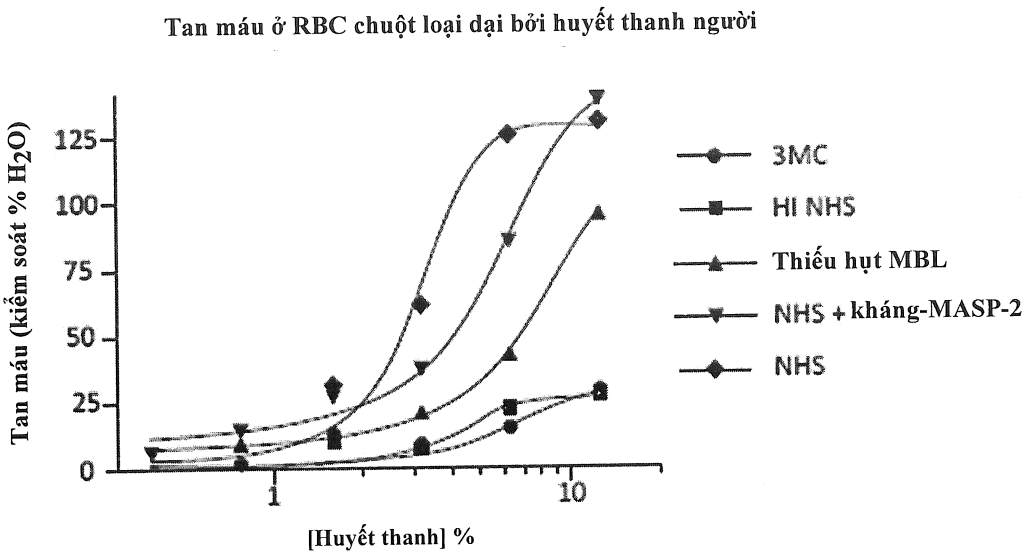

Tan máu ở RBC chuột loại dại bởi huyết thanh người
Tan máu (kiểm soát % H_2O)
125
100
75
50
25
0
1
10
[Huyết thanh] %
3MC
HI NHS
Thiếu hụt MBL
NHS + kháng-MASP-2
NHS

FIG. 22

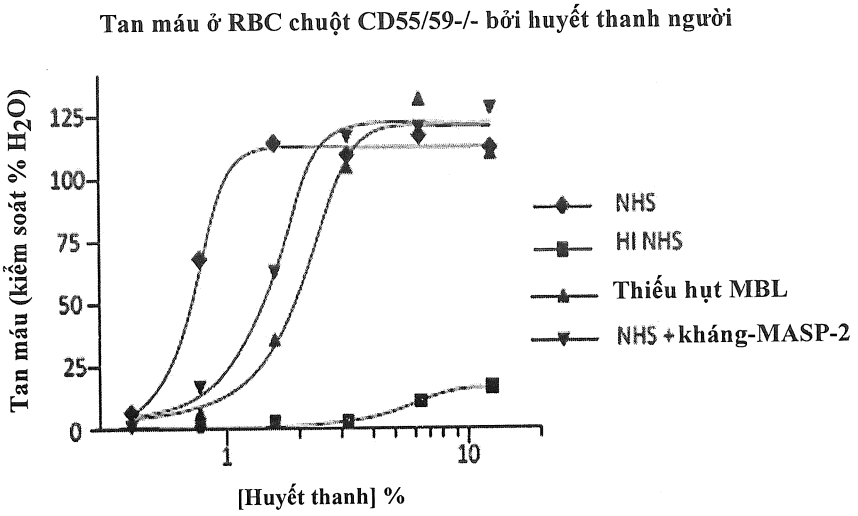

Tan máu ở RBC chuột CD55/59-/- bởi huyết thanh người
Tan máu (kiểm soát % H2O)
125
100
75
50
25
0
1
10
[Huyết thanh] %
NHS
HI NHS
Thiếu hụt MBL
NHS + kháng-MASP-2

FIG. 23

Thử nghiệm tan máu sử dụng RBC thỏ với huyết thanh chuột nhắt WT và MASP-1/3$^{-/-}$

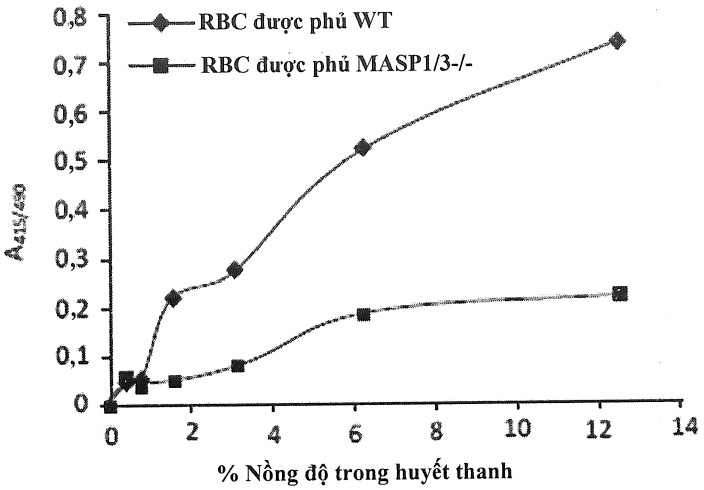


FIG. 24A

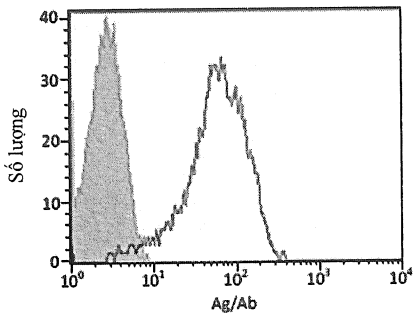


FIG. 24B

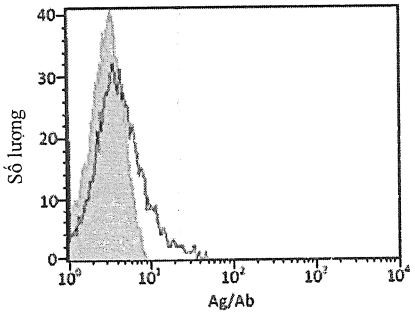


FIG. 25

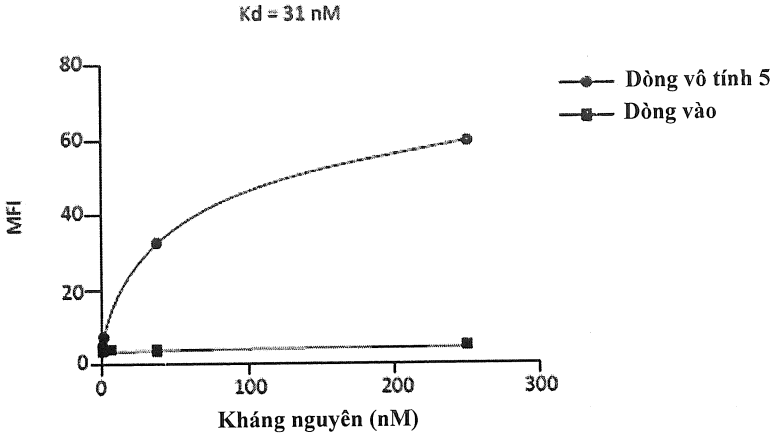

Kd = 31 nM
80
60
40
20
0
MFI
0
100
200
300
Kháng nguyên (nM)
Dòng vô tính 5
Dòng vào

FIG. 26A

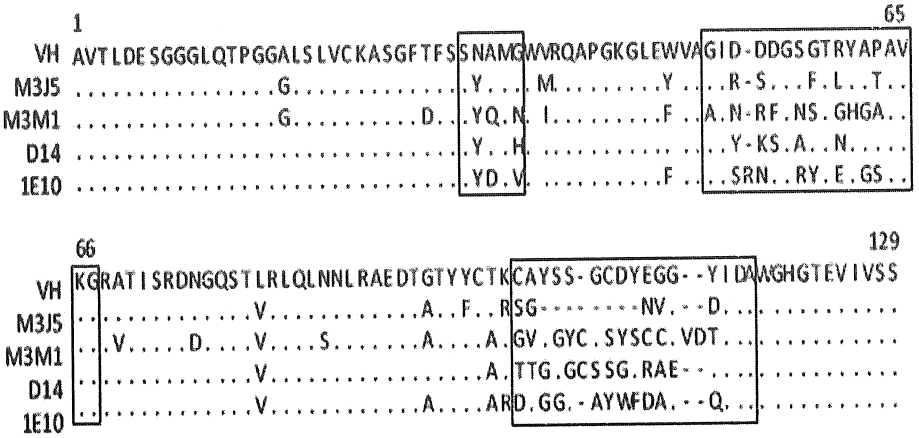

1
65
VH AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNAMGWVRQAPGKGLEWVAGID-DDGSGTRYAPAV
M3J5 .....G.....Y...M.....Y...R-S...F.L..T..
M3M1 .....G.....D..YQ.N.I.....F..A.N-RF.NS.GHGA..
D14 .....Y..H.....Y-KS.A..N.....
1E10 .....YD.V.....F...SRN..RY.E.GS..
66
129
VH KGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYYCTKCAYSS-GCDYEGG--YIDAWGHGTEVIVSS
M3J5 .....V.....A..F..RSG--------NV.--D.....
M3M1 ...V.....D....V....S.....A....A.GV.GYC.SYSCC.VDT.....
D14 .....V.....A.TTG.GCSSG.RAE-.....
1E10 .....V.....A....ARD.GG.-AYWFDA.--Q.....

FIG. 26B

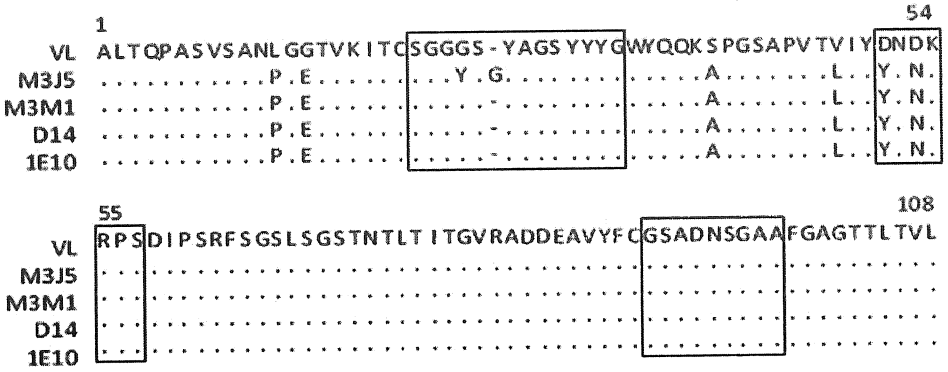

1
54
VL ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGS-YAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDK
M3J5 ..........P.E.....Y.G.....A.....L..Y.N.
M3M1 ..........P.E.....-.....A.....L..Y.N.
D14 ..........P.E.....-.....A.....L..Y.N.
1E10 ..........P.E.....-.....A.....L..Y.N.
55
108
VL RPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL
M3J5 .....
M3M1 .....
D14 .....
1E10 .....

FIG. 27

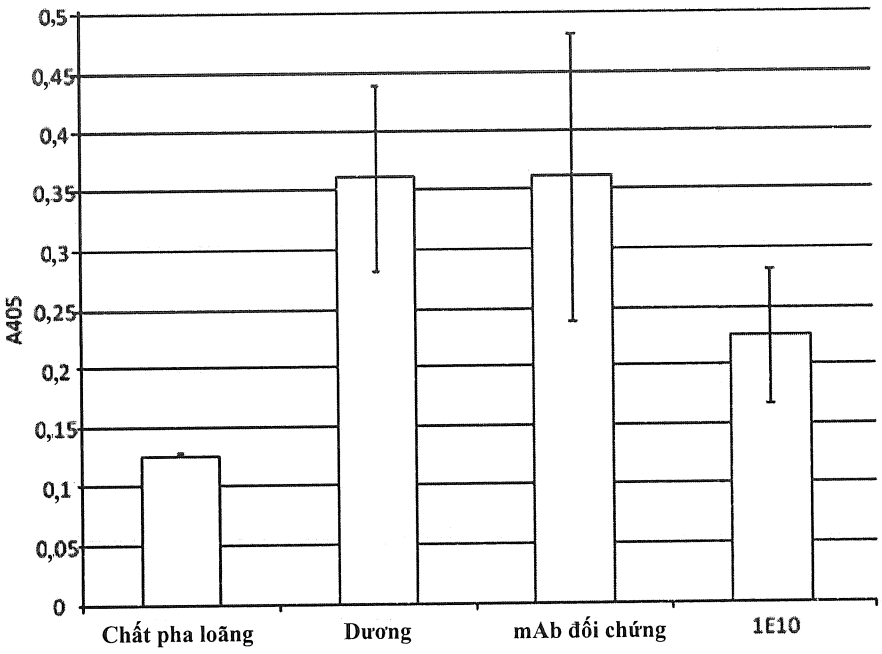

A405
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
Chất pha loãng
Dương
mAb đối chứng
1E10

FIG. 28A

kết lắng C3b trên *S.Aureus*

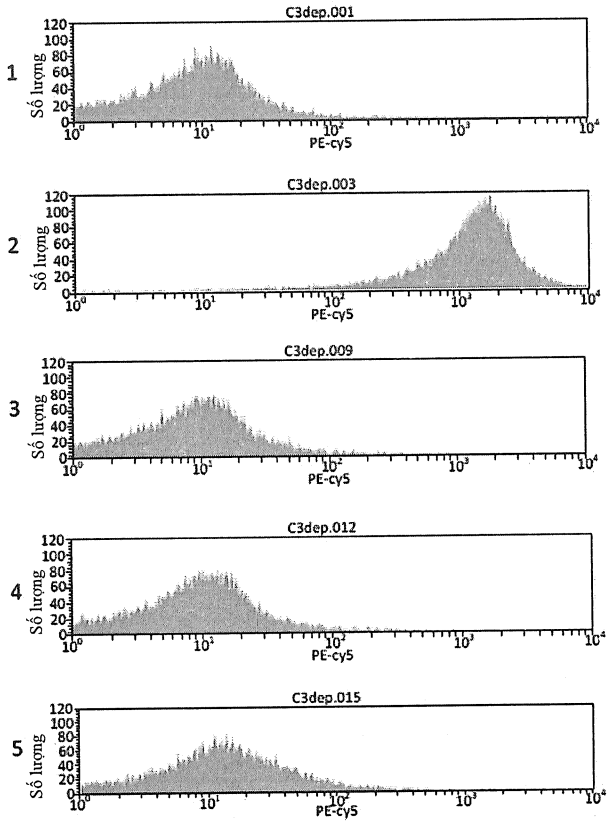


FIG. 28B

kết lắng C3b trên *S.Aureus*

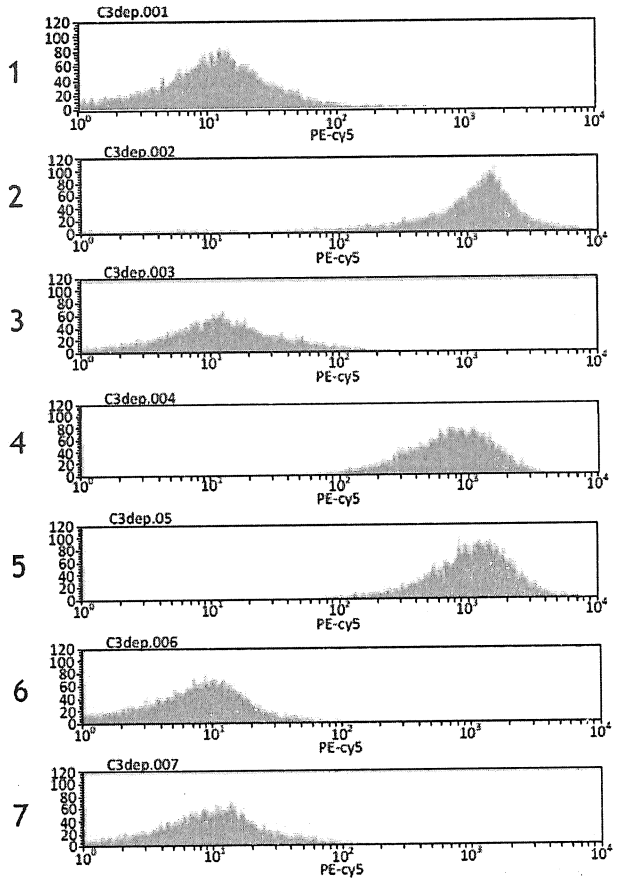
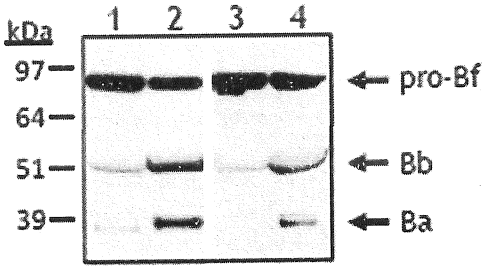


FIG. 29

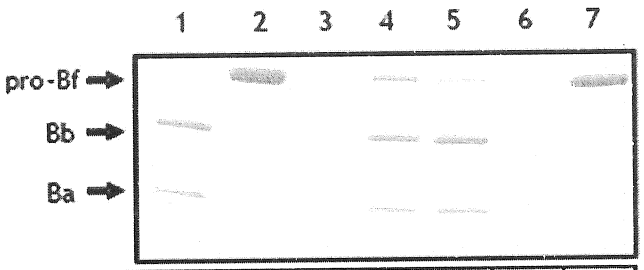
Phân cắt yếu tố B trong đáp ứng với *S.aureus*



Bổ sung huyết thanh 3MC với MASP-3 tái tổ hợp làm tăng sự phân cắt yếu tố B.

FIG. 30

MASP-3 phân cắt trực tiếp pro-Bf



C3	+	-	+	+	+	+	-
pro-Bf	+	+	-	+	+	-	+
MASP-3	+	+	+	+	-	-	-
pro-Df	+	+	+	-	+	-	-

FIG. 31

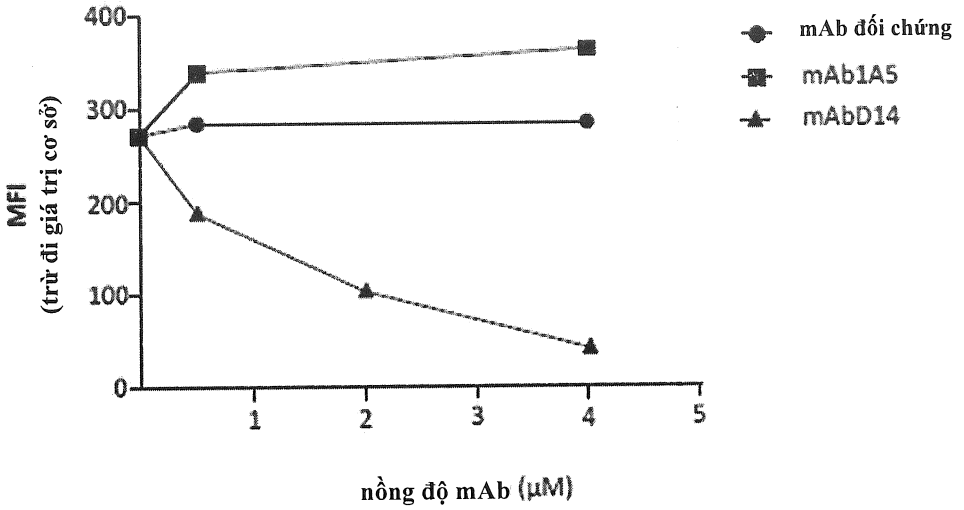

400
300
200
100
0
MFI
(trừ đi giá trị cơ sở)
1
2
3
4
5
nồng độ mAb (μM)
mAb đối chứng
mAb1A5
mAbD14

FIG. 32

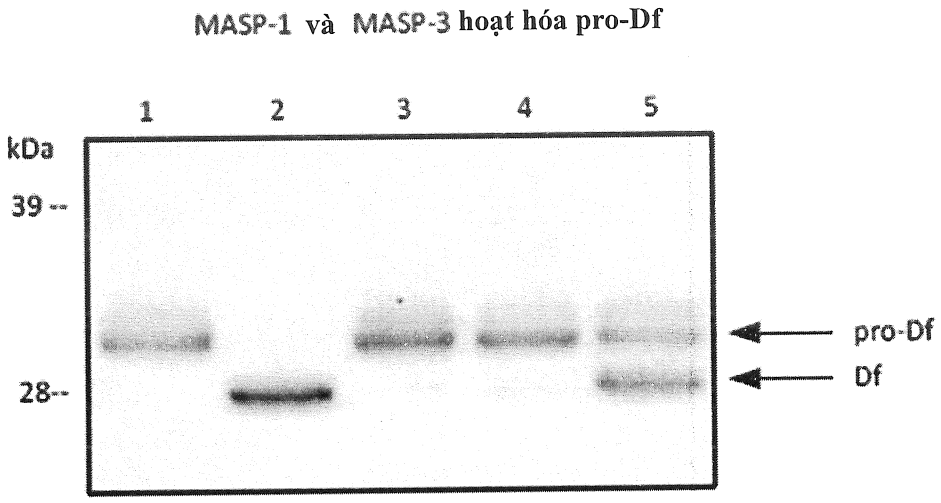


FIG. 33

Ức chế một phần sự phân cắt phụ thuộc vào MASP-3 của Pro-Df bằng kháng thể MASP-3

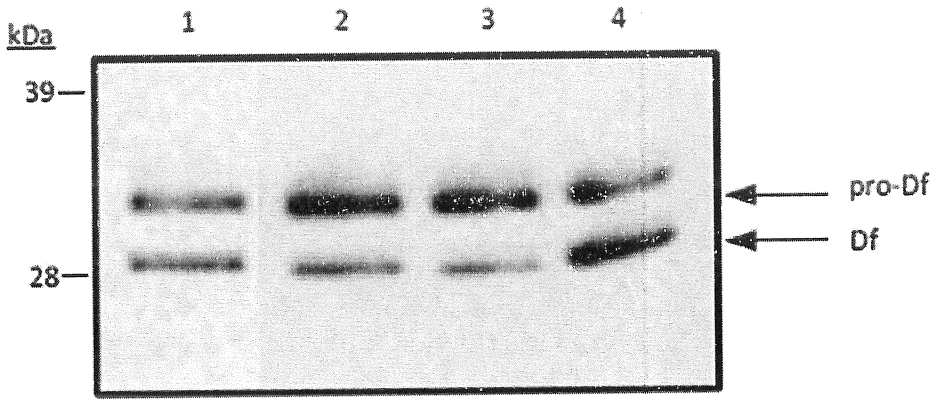


FIG. 34

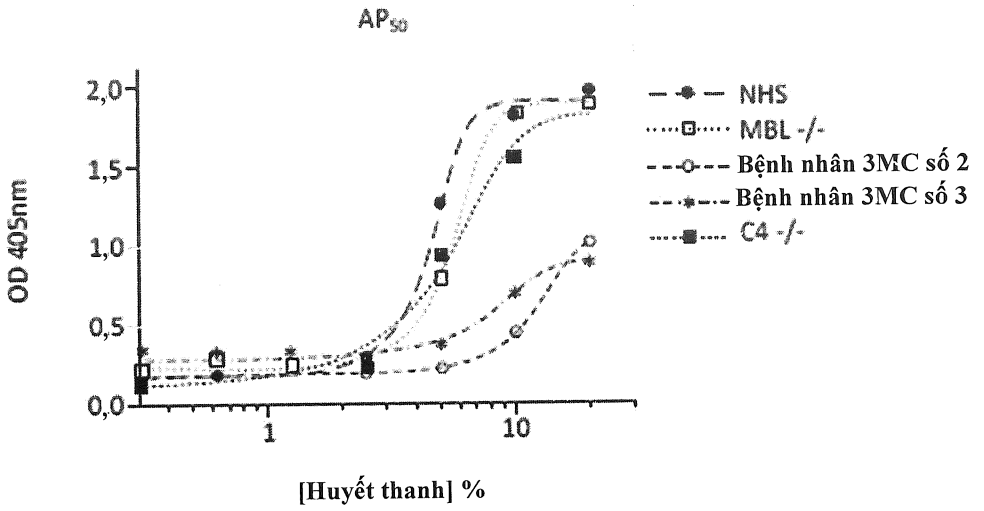

AP50
OD 405nm
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1
10
[Huyết thanh] %
NHS
MBL -/-
Bệnh nhân 3MC số 2
Bệnh nhân 3MC số 3
C4 -/-

FIG. 35A

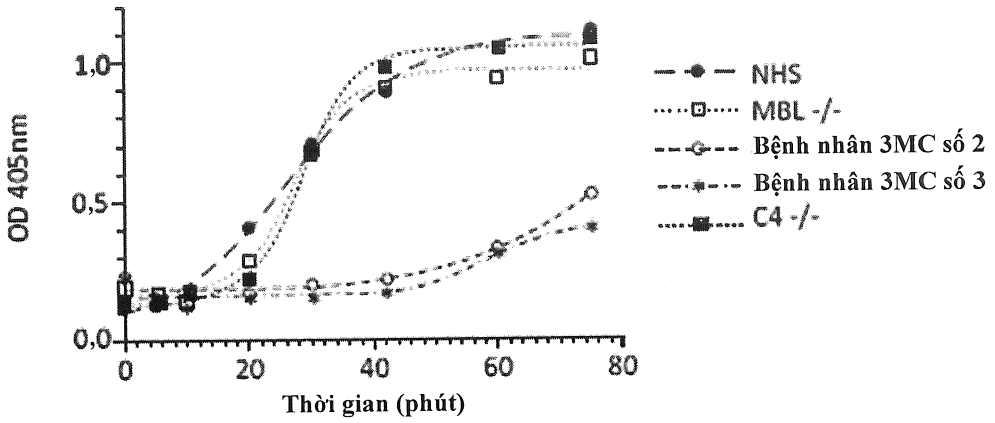

OD 405nm
1,0
0,5
0,0
0
20
40
60
80
Thời gian (phút)
NHS
MBL -/-
Bệnh nhân 3MC số 2
Bệnh nhân 3MC số 3
C4 -/-

FIG. 35B

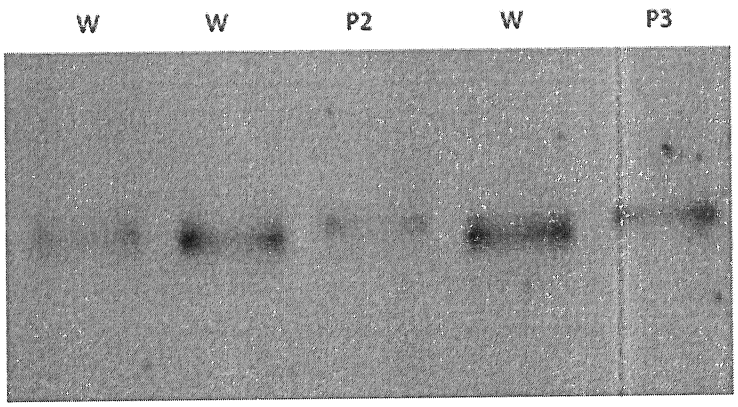


FIG. 35C

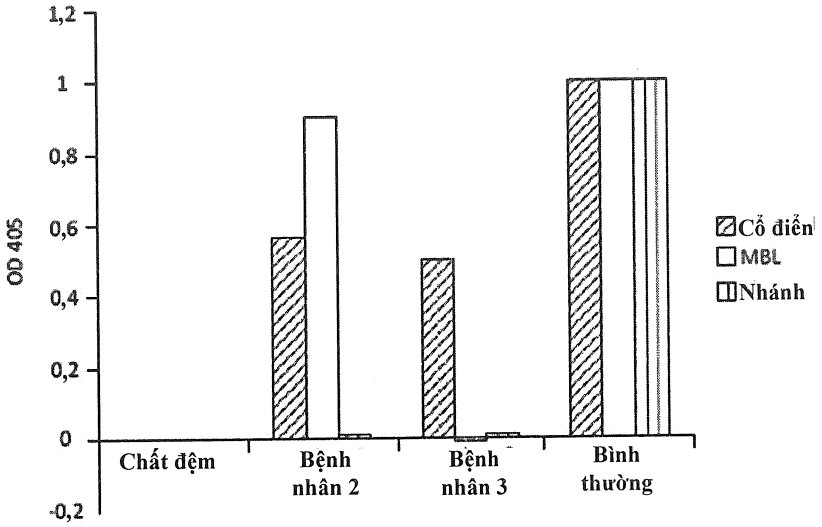

1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-0,2
OD 405
Chất đệm
Bệnh nhân 2
Bệnh nhân 3
Bình thường
Cổ điển
MBL
Nhánh

FIG. 36

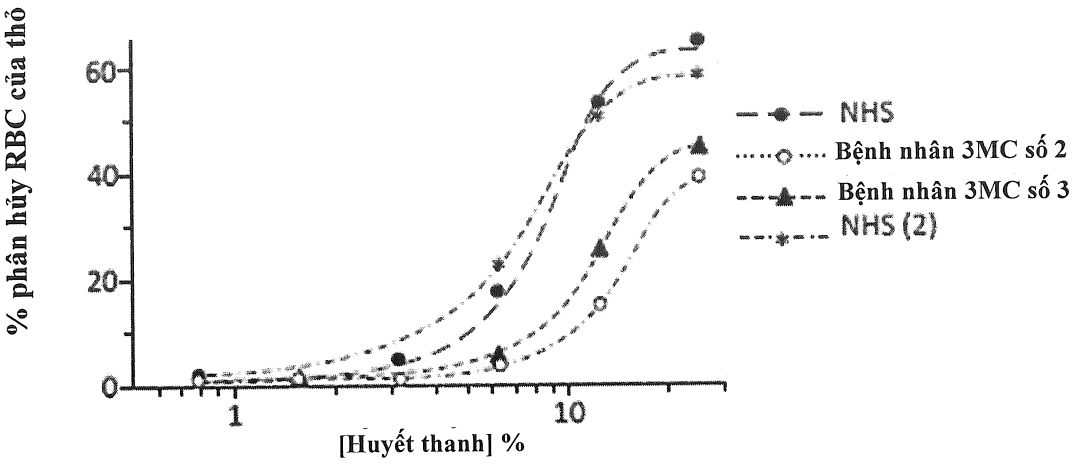

% phân hủy RBC của thỏ
60
40
20
0
1
10
[Huyết thanh] %
NHS
Bệnh nhân 3MC số 2
Bệnh nhân 3MC số 3
NHS (2)

FIG. 37

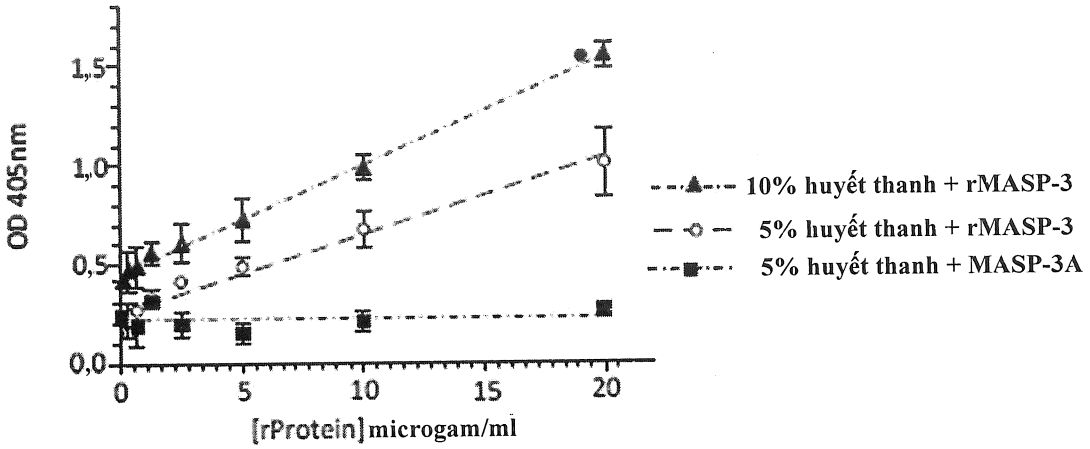

OD 405nm
1,5
1,0
0,5
0,0
0
5
10
15
20
[rProtein] microgam/ml
10% huyết thanh + rMASP-3
5% huyết thanh + rMASP-3
5% huyết thanh + MASP-3A

FIG. 38

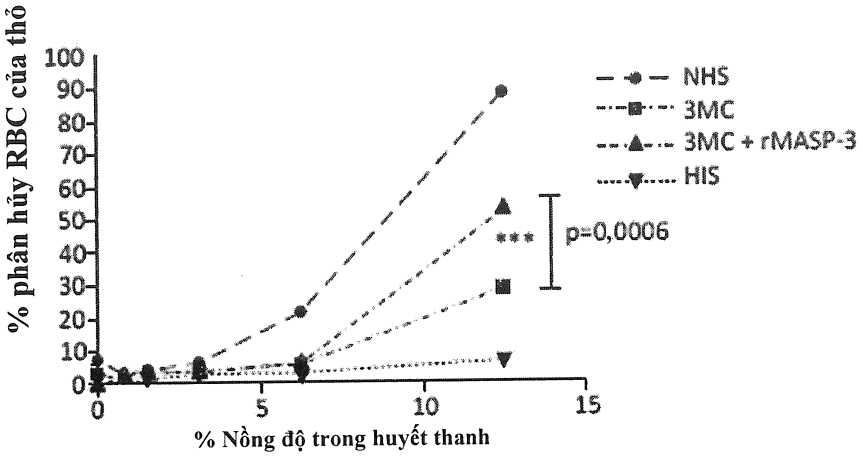

% phân hủy RBC của thỏ
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
% Nồng độ trong huyết thanh
NHS
3MC
3MC + rMASP-3
HIS
***
p=0,0006

FIG. 39

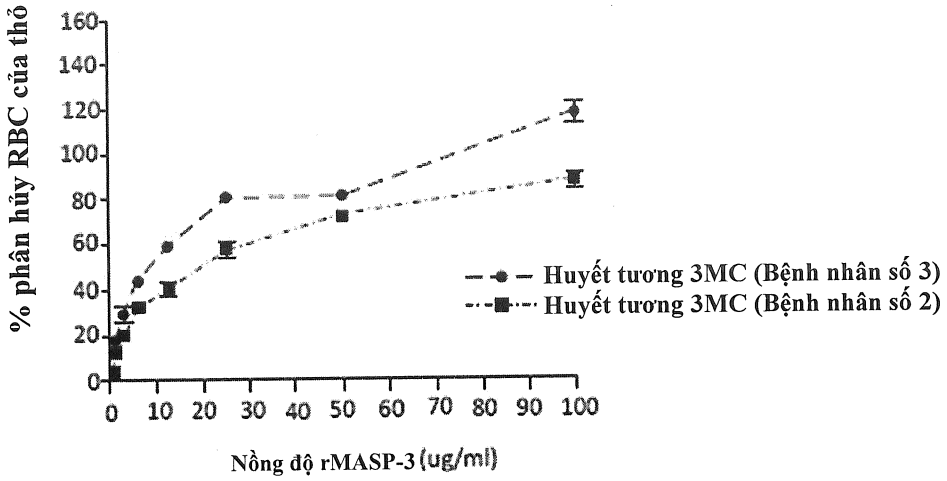

% phân hủy RBC của thỏ
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Nồng độ rMASP-3 (ug/ml)
Huyết tương 3MC (Bệnh nhân số 3)
Huyết tương 3MC (Bệnh nhân số 2)

FIG. 40

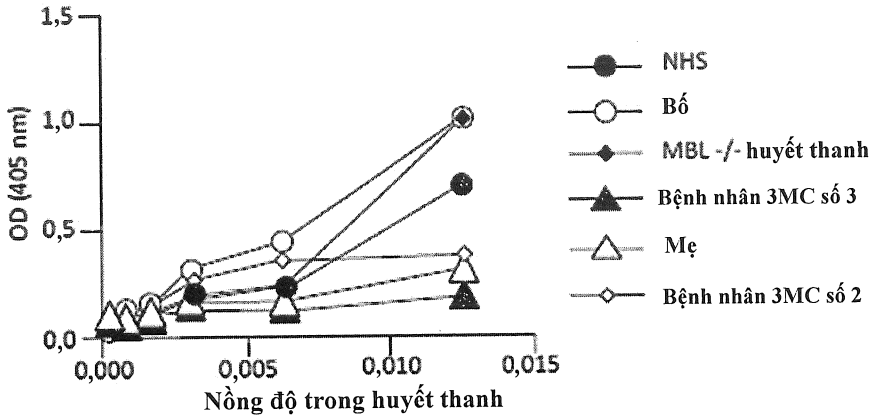

1,5
1,0
0,5
0,0
OD (405 nm)
0,000
0,005
0,010
0,015
Nồng độ trong huyết thanh
NHS
Bố
MBL -/- huyết thanh
Bệnh nhân 3MC số 3
Mẹ
Bệnh nhân 3MC số 2

FIG. 41

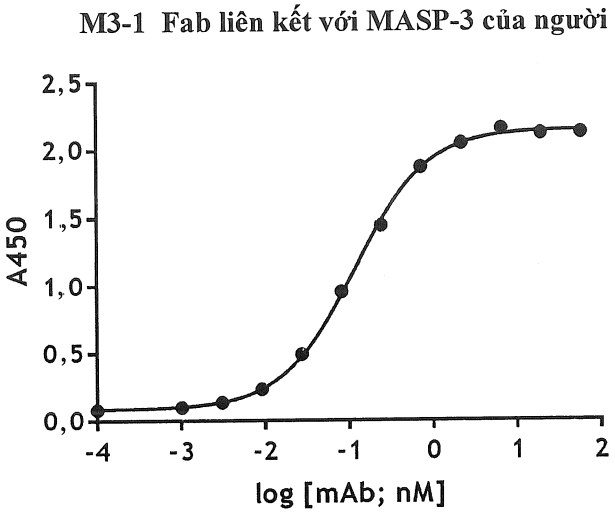

M3-1 Fab liên kết với MASP-3 của người
A450
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
log [mAb; nM]

FIG. 42

M3-1 Fab liên kết với MASP-3 của chuột nhắt

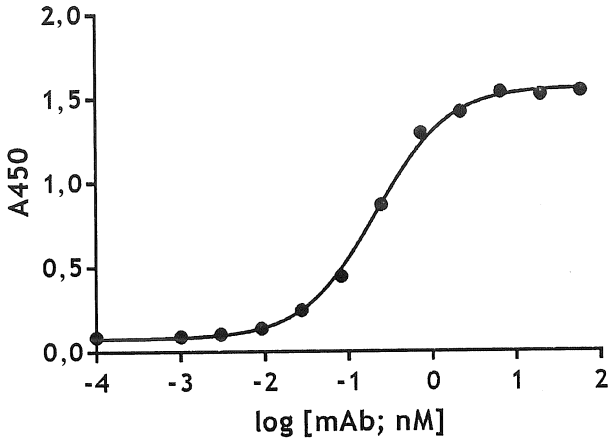


FIG. 43

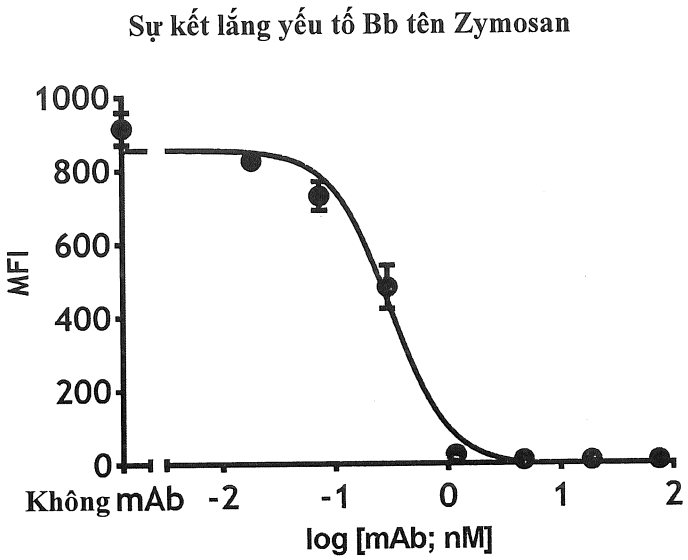

Sự kết lắng yếu tố Bb tên Zymosan
1000
800
600
400
200
0
MFI
Không mAb
-2
-1
0
1
2
log [mAb; nM]

FIG. 44

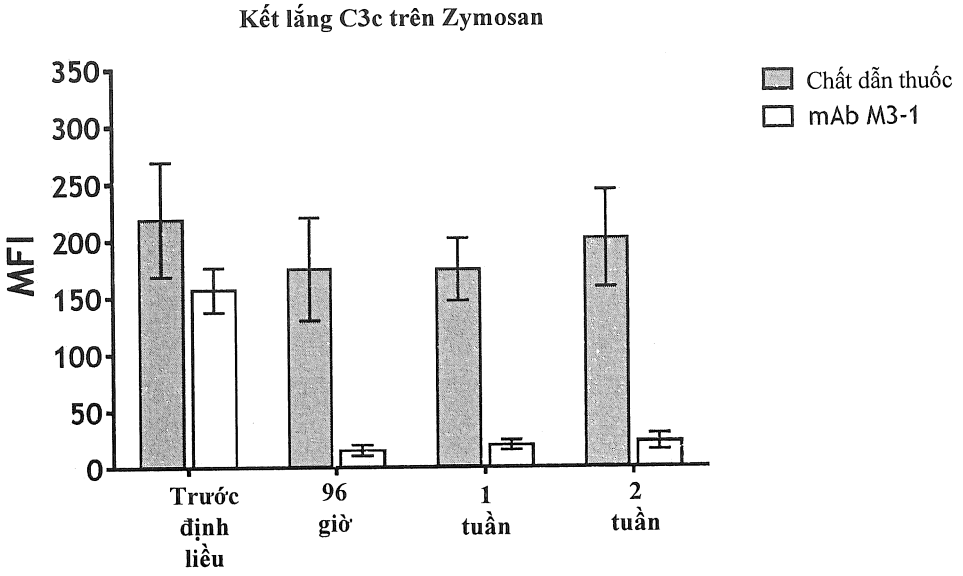
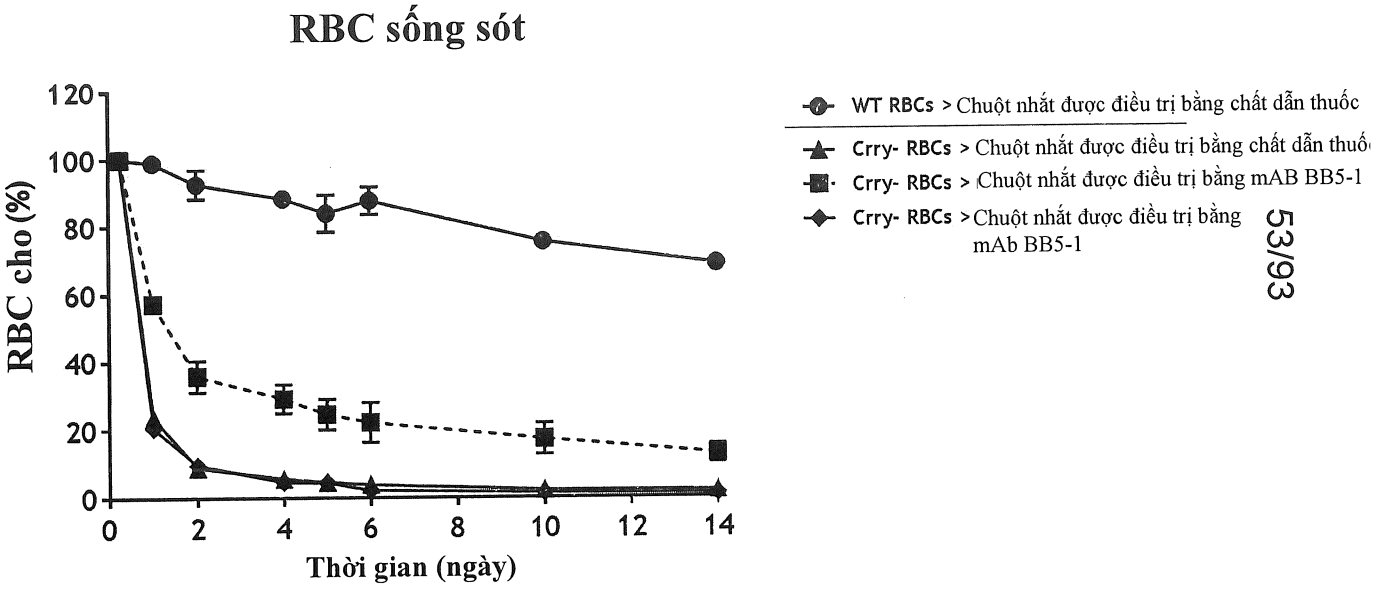

Kết lắng C3c trên Zymosan
MFI
350
300
250
200
150
100
50
0
Trước định liều
96 giờ
1 tuần
2 tuần
Chất dẫn thuốc
mAb M3-1

FIG. 45

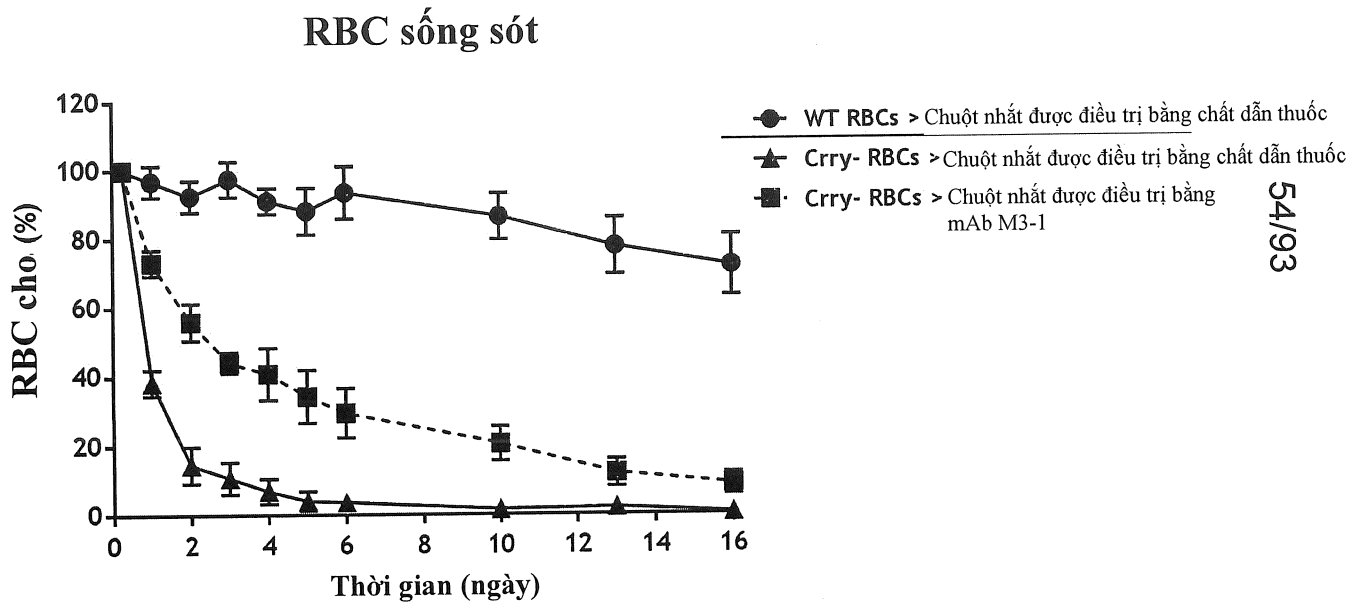
Tiếp tục nghiên cứu PNH



53/93

FIG. 46

RBC sống sót ở chuột nhắt được điều trị



54/93

FIG. 47

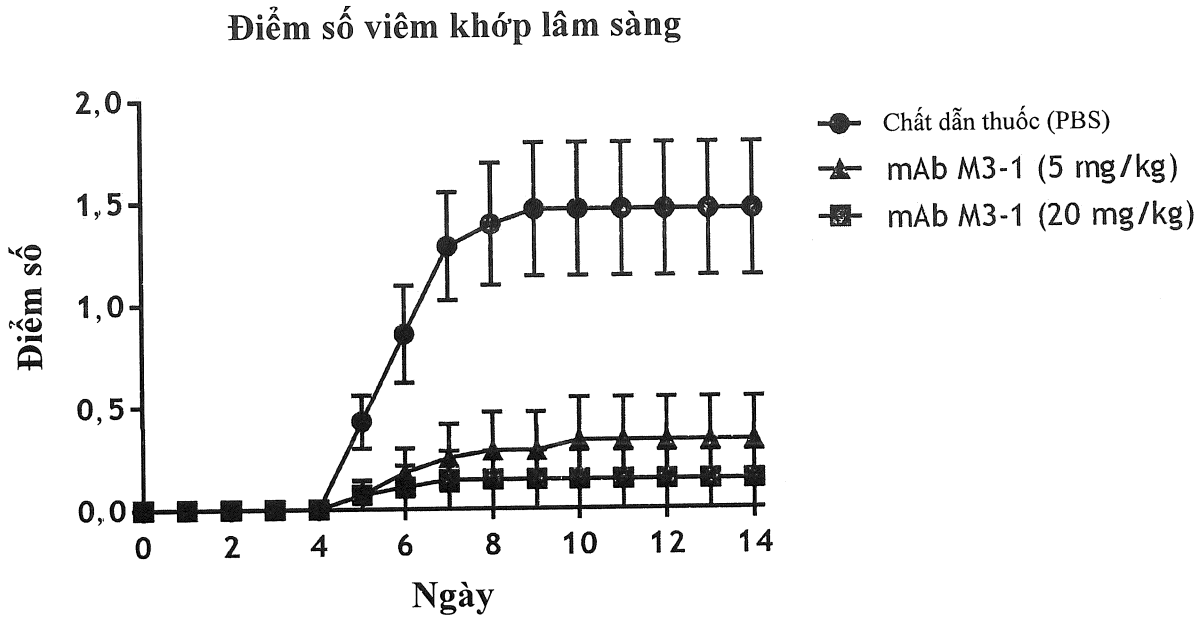

Điểm số viêm khớp lâm sàng
Điểm số
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày
Chất dẫn thuốc (PBS)
mAb M3-1 (5 mg/kg)
mAb M3-1 (20 mg/kg)

FIG. 48

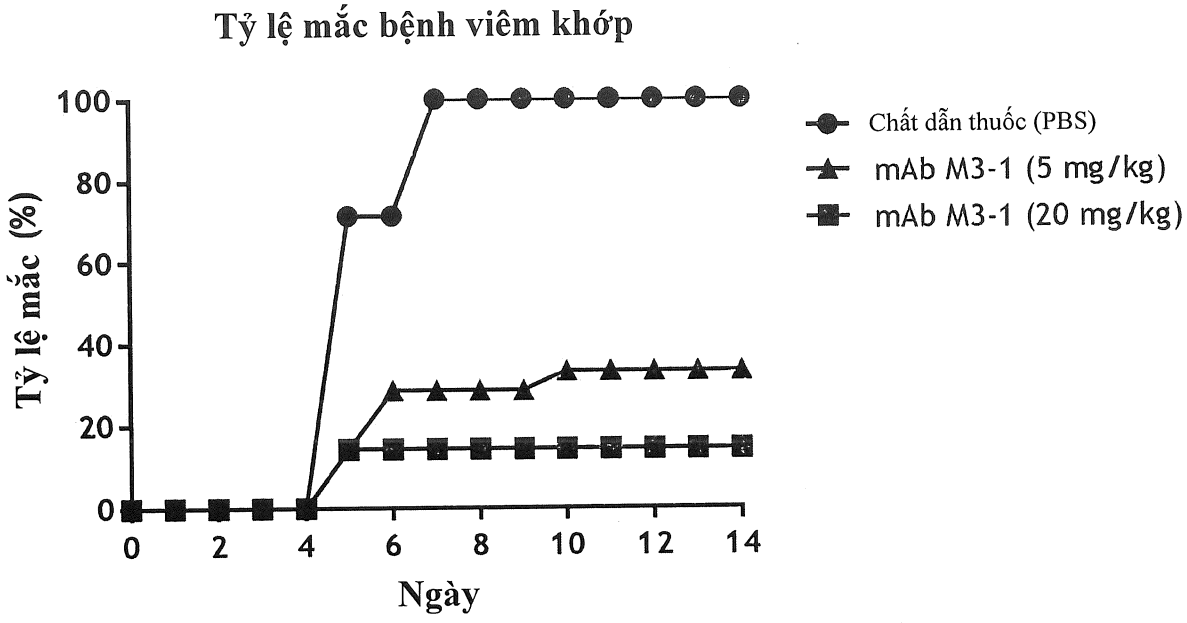
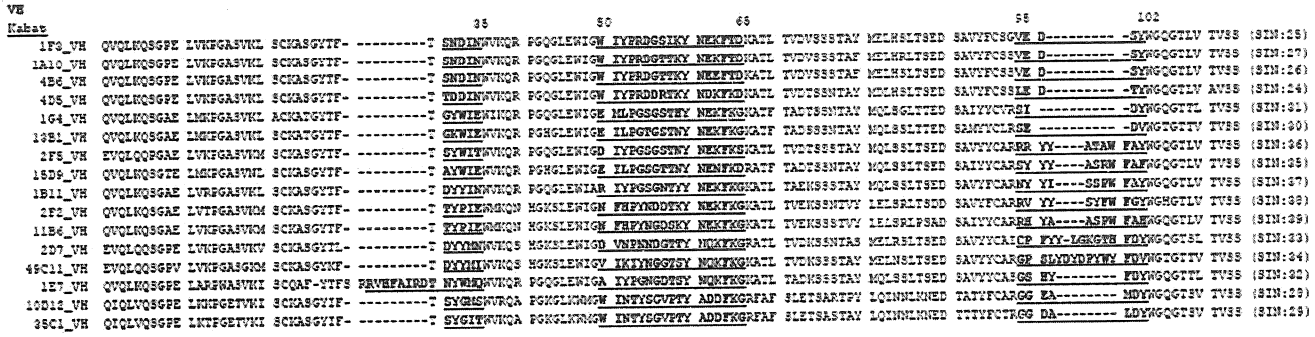

Tỷ lệ mắc bệnh viêm khớp
Tỷ lệ mắc (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Ngày
Chất dẫn thuốc (PBS)
mAb M3-1 (5 mg/kg)
mAb M3-1 (20 mg/kg)

FIG. 49A

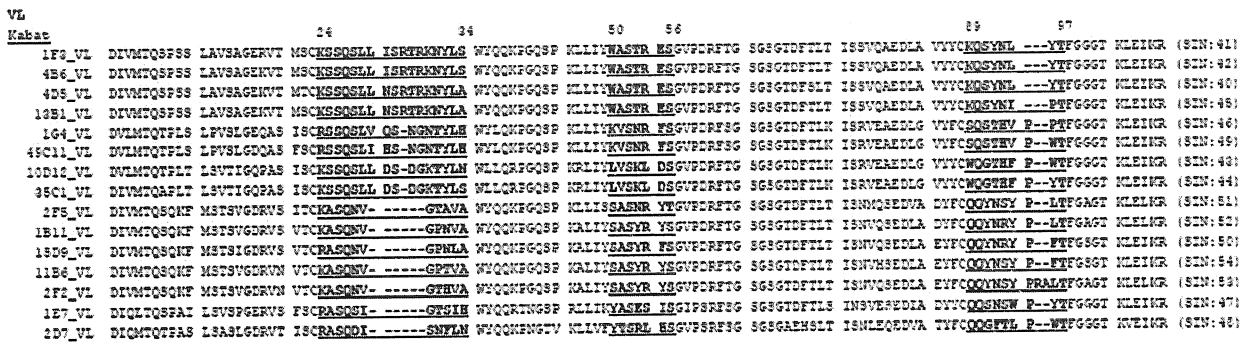
mAb MASP-3 ái lực cao: vùng biến đổi chuỗi nặng



57/93

FIG. 49B

mAb MASP-3 ái lực cao: vùng biến đổi chuỗi nhẹ



58/93

FIG. 50A

Thụ đồ thể hiện các vùng VH của mAb MASP-3 ái lực cao

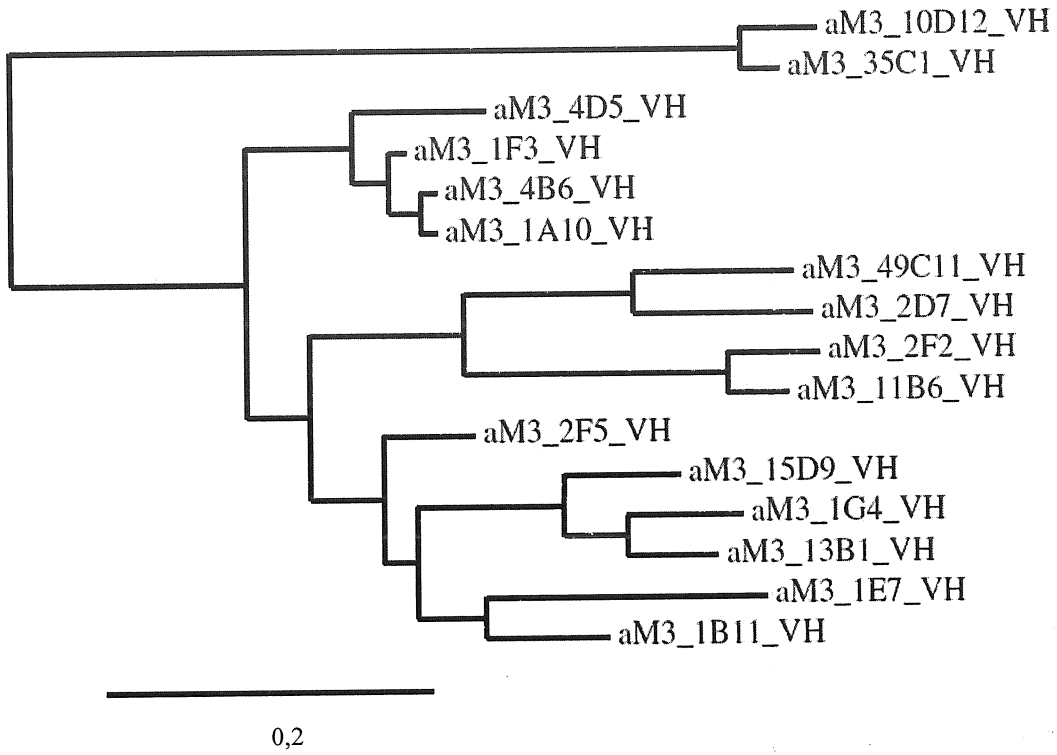


FIG. 50B

Thụ đồ thể hiện các vùng VL của mAb MASP-3 ái lực cao

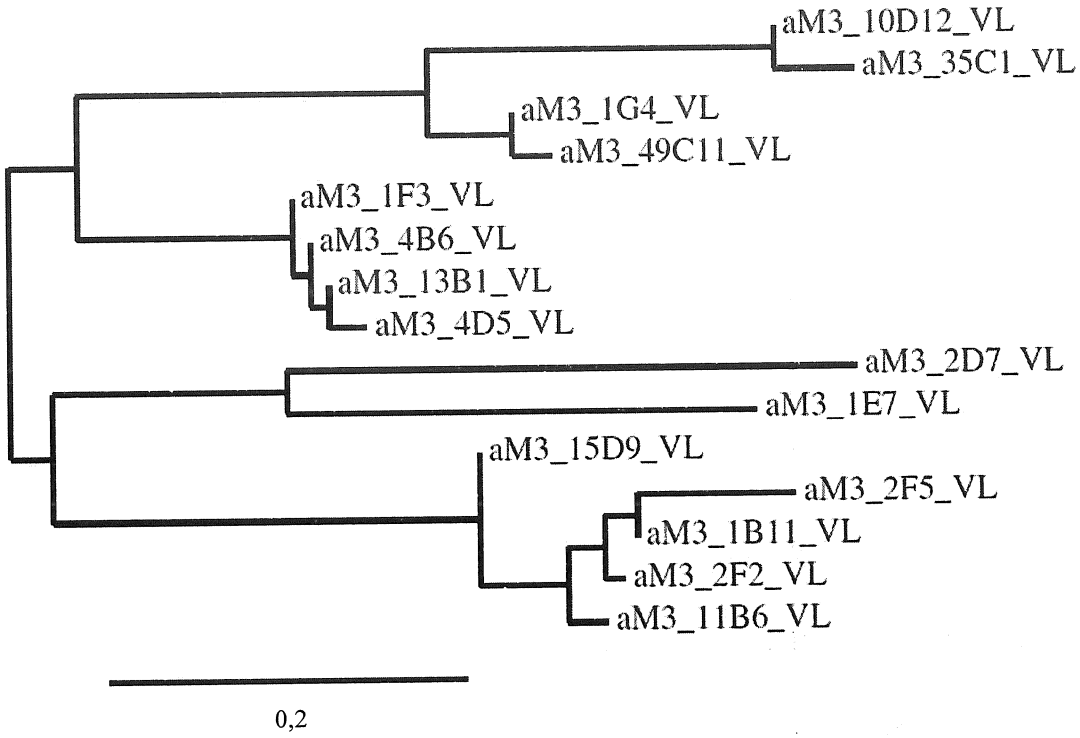


FIG. 51A

Liên kết MASP-3 tái tổ hợp đã tinh chế với MASP-3 người

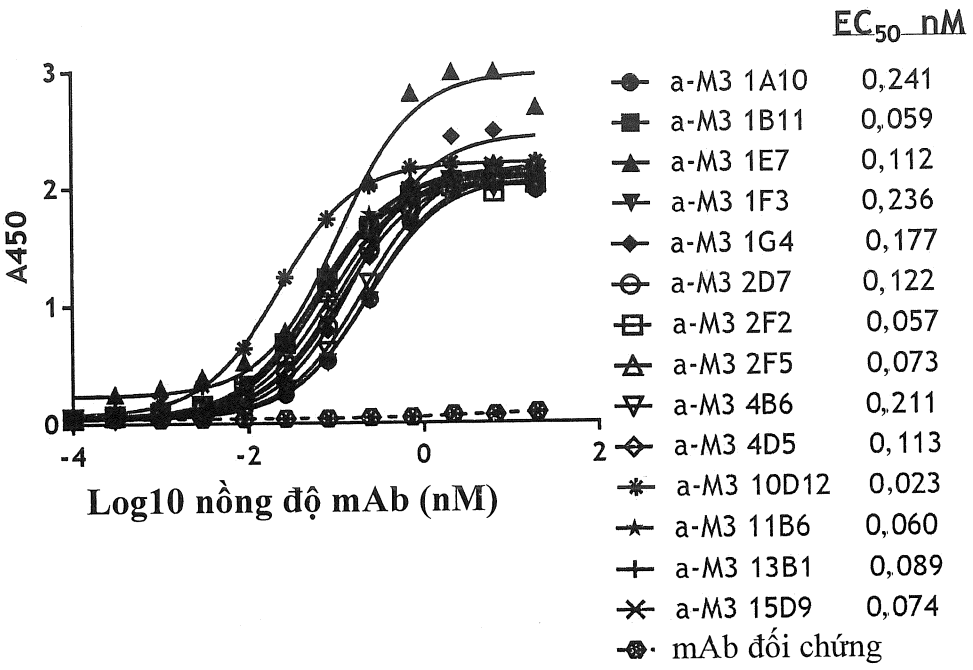


FIG. 51B

Liên kết MASP-3 tái tổ hợp đã tinh chế với MASP-3 người

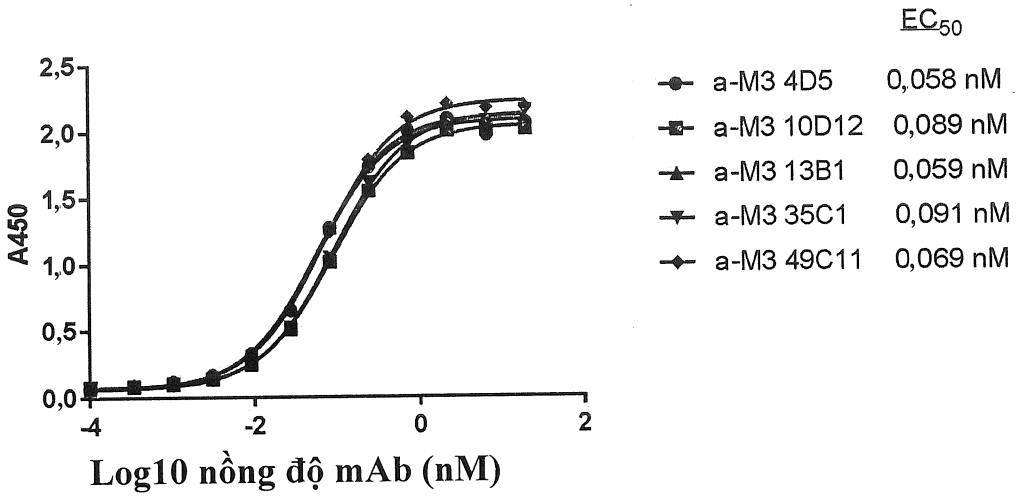


FIG. 51C

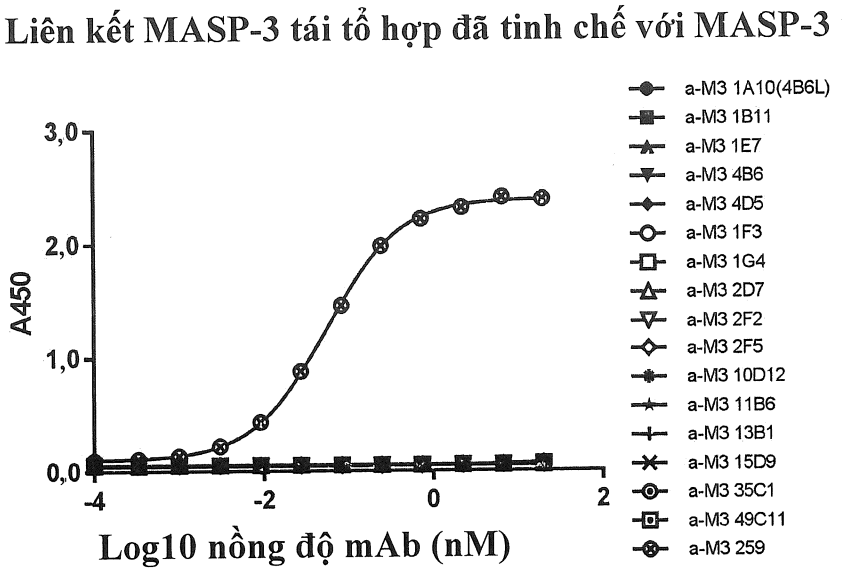

Liên kết MASP-3 tái tổ hợp đã tinh chế với MASP-3 người
A450
3,0
2,0
1,0
0,0
-4
-2
0
2
Log10 nồng độ mAb (nM)
a-M3 1A10(4B6L)
a-M3 1B11
a-M3 1E7
a-M3 4B6
a-M3 4D5
a-M3 1F3
a-M3 1G4
a-M3 2D7
a-M3 2F2
a-M3 2F5
a-M3 10D12
a-M3 11B6
a-M3 13B1
a-M3 15D9
a-M3 35C1
a-M3 49C11
a-M3 259

FIG. 51D

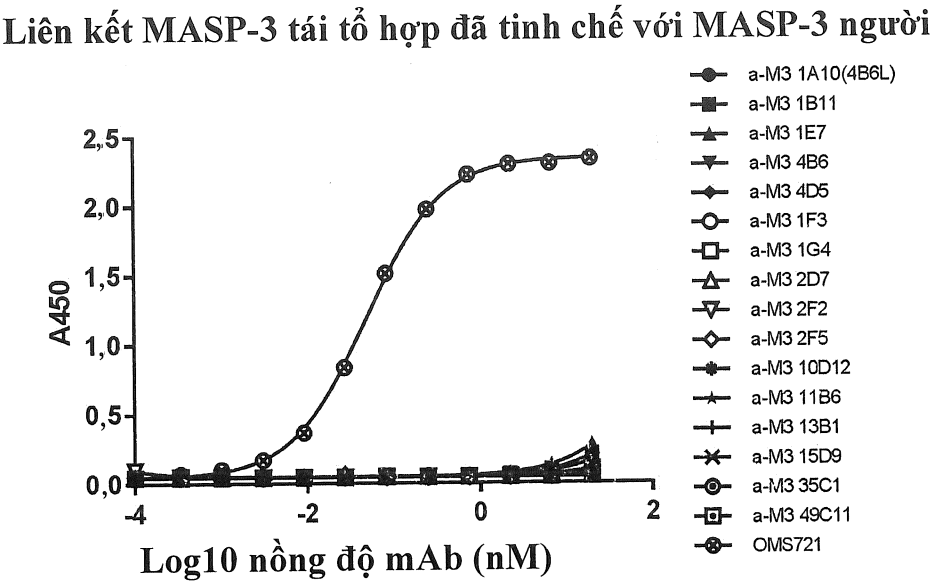

Liên kết MASP-3 tái tổ hợp đã tinh chế với MASP-3 người
A450
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-4
-2
0
2
Log10 nồng độ mAb (nM)
a-M3 1A10(4B6L)
a-M3 1B11
a-M3 1E7
a-M3 4B6
a-M3 4D5
a-M3 1F3
a-M3 1G4
a-M3 2D7
a-M3 2F2
a-M3 2F5
a-M3 10D12
a-M3 11B6
a-M3 13B1
a-M3 15D9
a-M3 35C1
a-M3 49C11
OMS721

FIG. 52

Liên kết mAb MASP-3 với MASP-3 chuột nhắt đầy đủ chiều dài

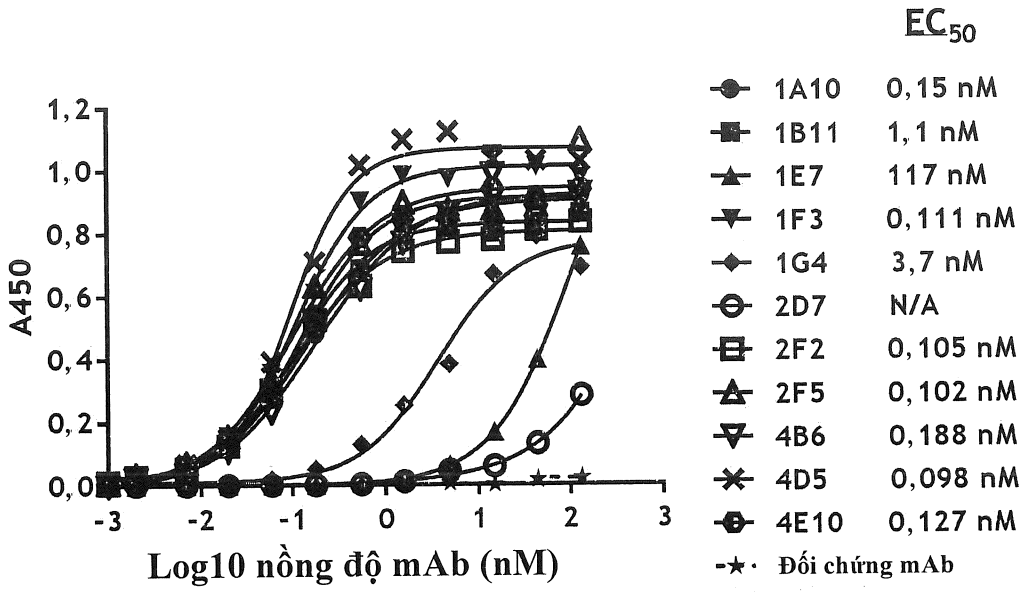


FIG. 53

Ức chế sự phân cắt Tripeptit sinh huỳnh quang bằng mAb MASP-3

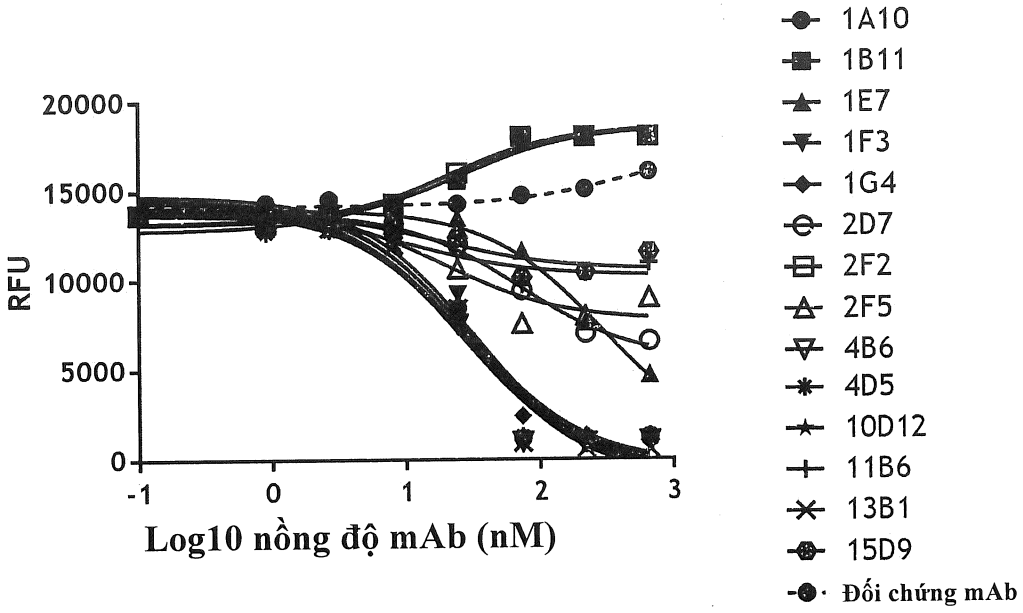


FIG. 54
mAb MASP-3 ái lực cao ức chế sự phân cắt CFD bằng rMASP-3

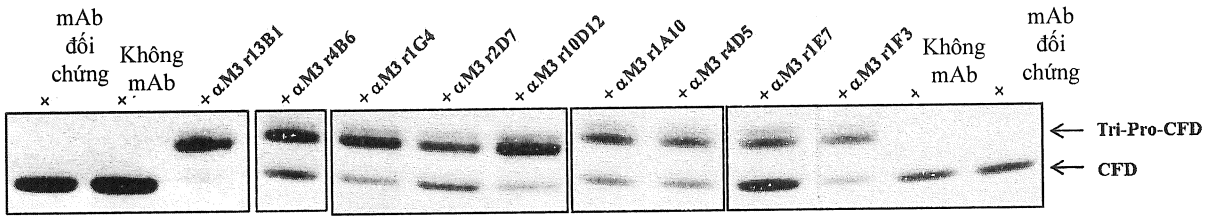
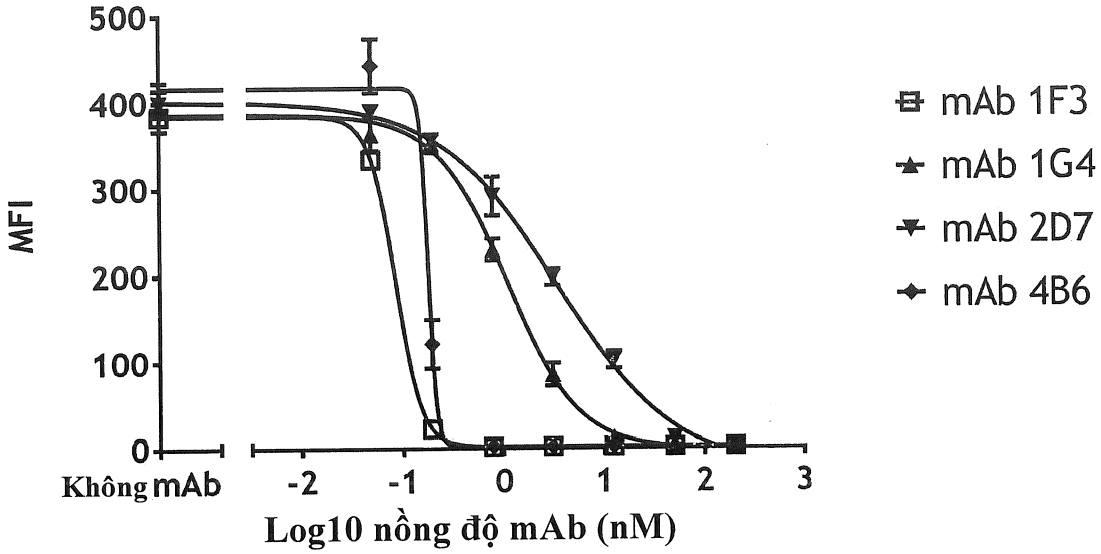


FIG. 55A

Ức chế sự kết lắng yếu tố Bb trên Zymosan bằng mAb MASP-3

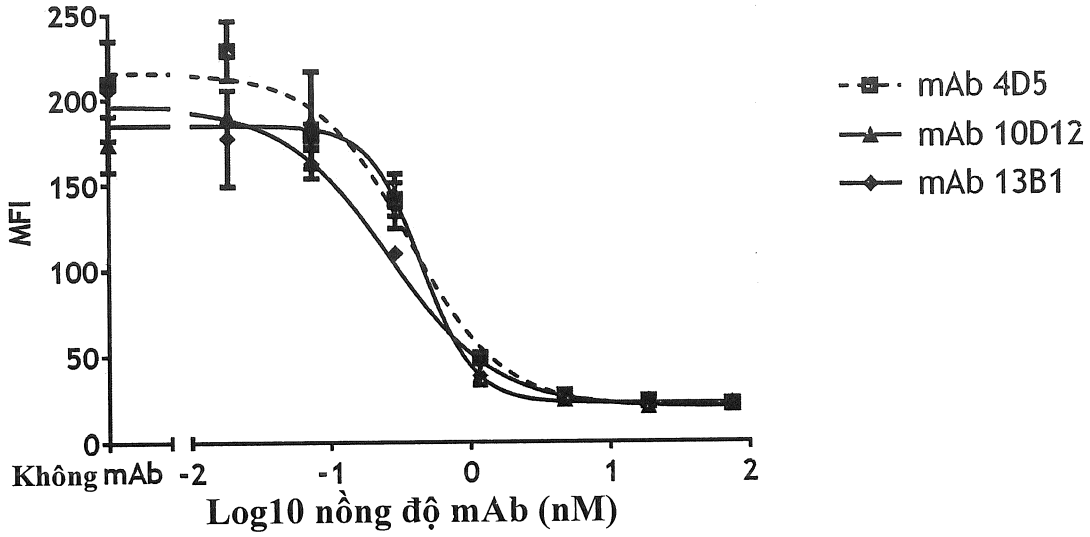


	mAb 1F3	mAb 1G4	mAb 2D7	mAb 4B6
IC50 (nM)	0,1	1,1	3,5	0,2

68/93

FIG. 55B

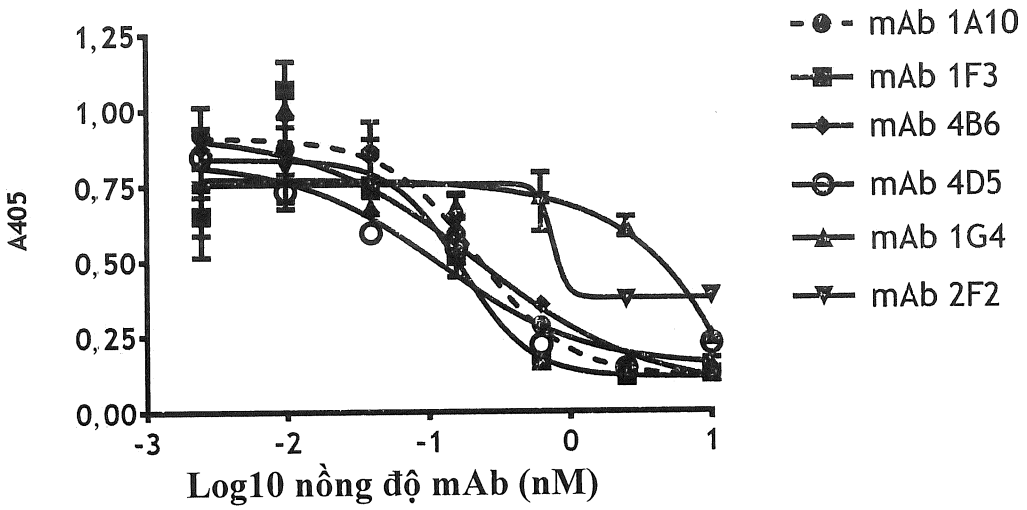
Ức chế sự kết lắng yếu tố Bb trên Zymosan bằng mAb MASP-3



	mAb 4D5	mAb 10D12	mAb 13B1
IC50 (nM)	0,4	0,5	0,3

FIG. 56A

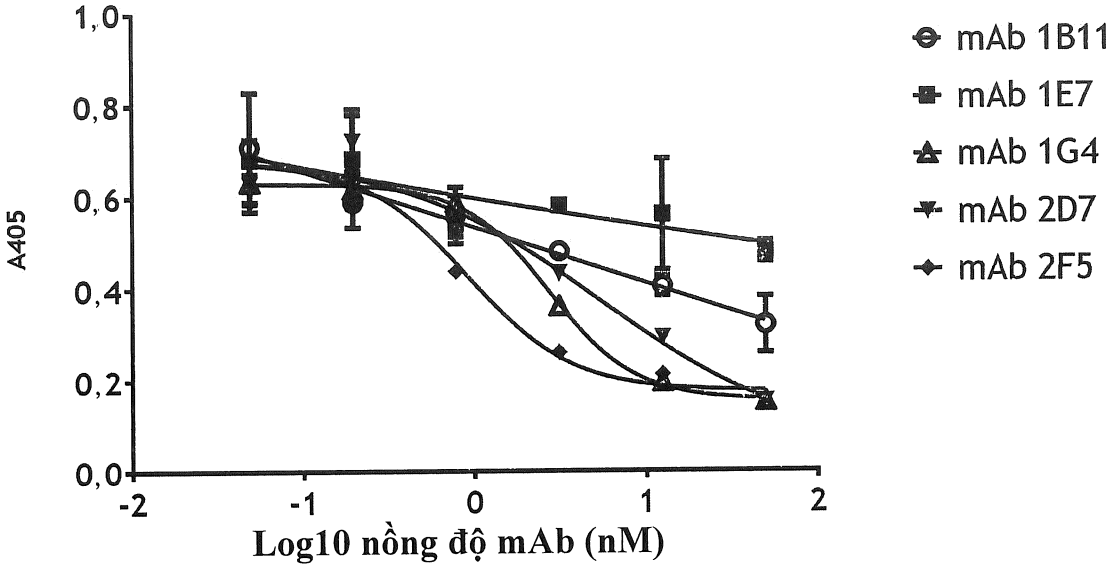
Ức chế sự phân hủy hồng cầu của thỏ bằng mAb MASP-3



	mAb 1A10	mAb 1F3	mAb 1G4	mAb 2F2	mAb 4B6	mAb 4D5
IC50 (nM)	0,2	0,2	-	0,8	0,2	0,1

FIG. 56B

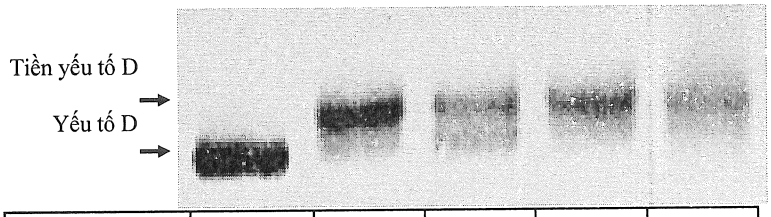
Ức chế sự phân hủy hồng cầu của thỏ bằng mAb MASP-3



	mAb 1B11	mAb 1E7	mAb 1G4	mAb 2D7	mAb 2F5
IC50 (nM)	-	-	2,7	5,4	0,9

FIG. 57

Yếu tố D trong huyết thanh 3MC



Huyết thanh bình thường	+				
Huyết thanh bệnh nhân B		+	+	+	+
rMASP3 (hoạt tính)			+		+
rMASP3 (bất hoạt)				+	
MASP-3 mAb 4D5					+

FIG. 58

mAb MASP-3 ức chế APC *in vivo*

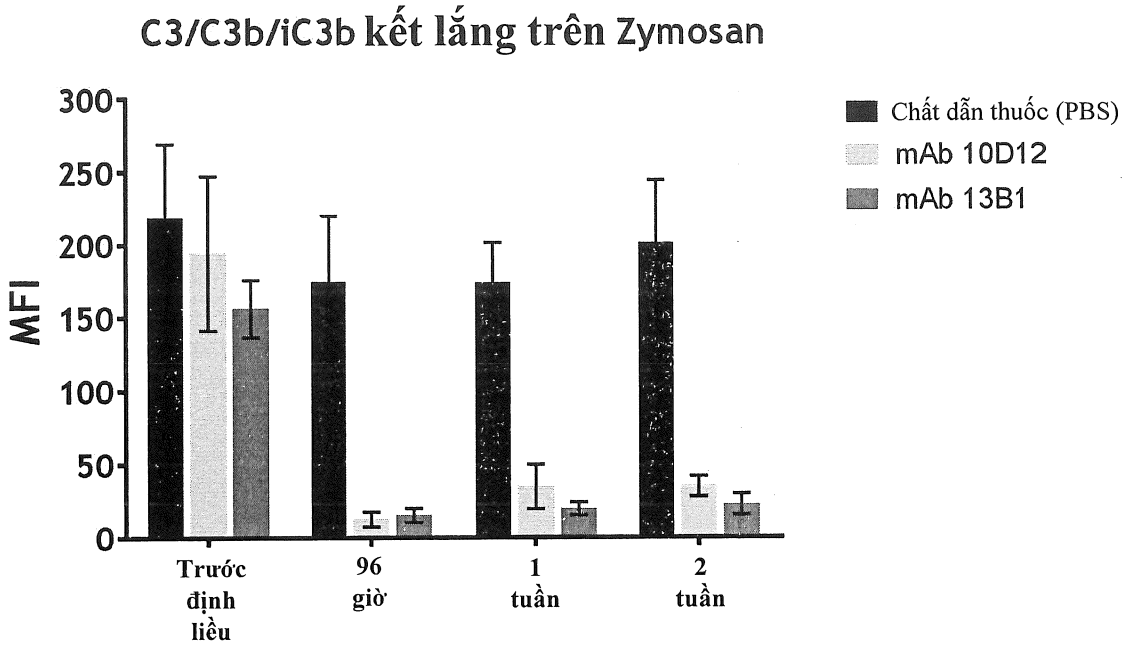


FIG. 59

Trạng thái của mảnh Ba của yếu tố B ở chuột nhắt được điều trị bằng mAb 10D12

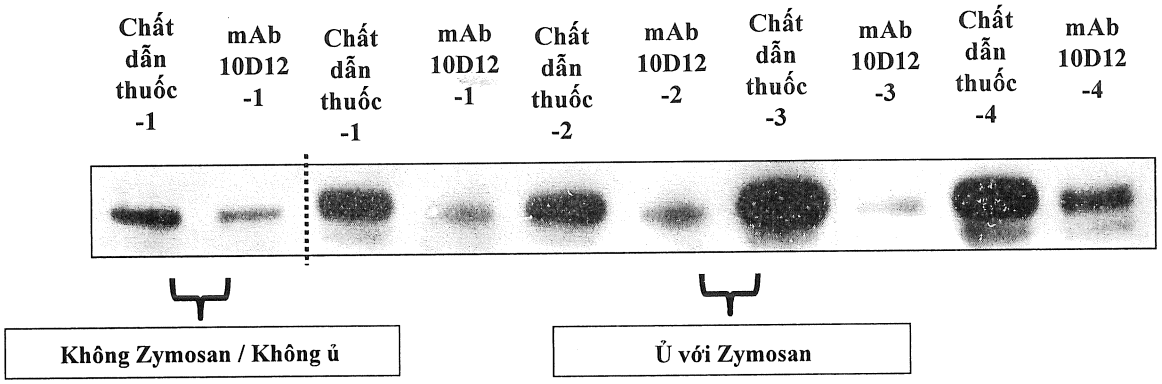


FIG. 60

Huyết thanh từ chuột nhắt được điều trị bằng mAb 10D12
cho thấy sự ức chế tình trạng tan máu

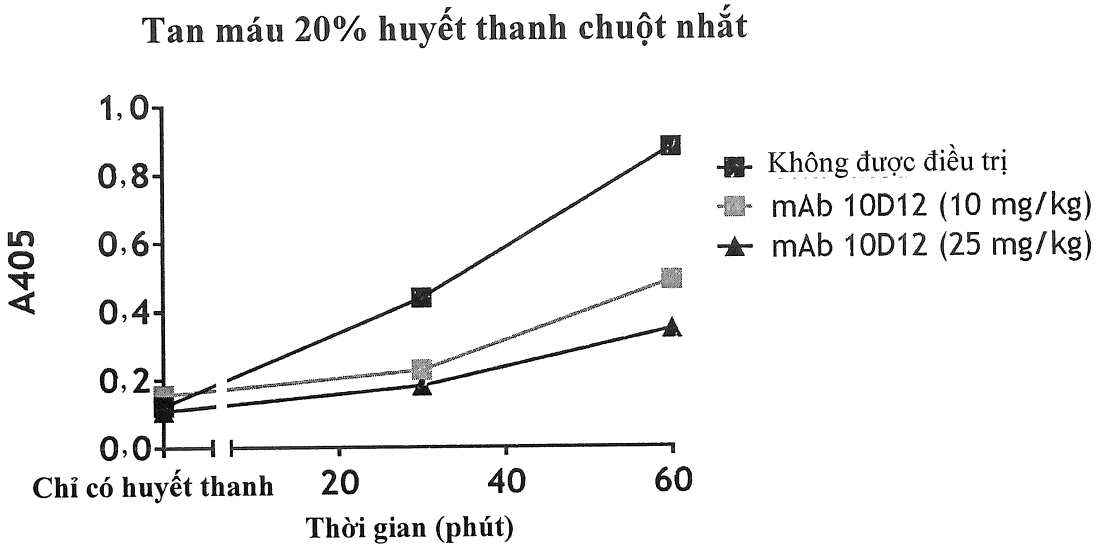


FIG. 61A

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh nhận biết mAb MASP-3 (IgG4) ngăn chặn sự tương tác giữa mAb 4D5 (IgG1) và MASP-3

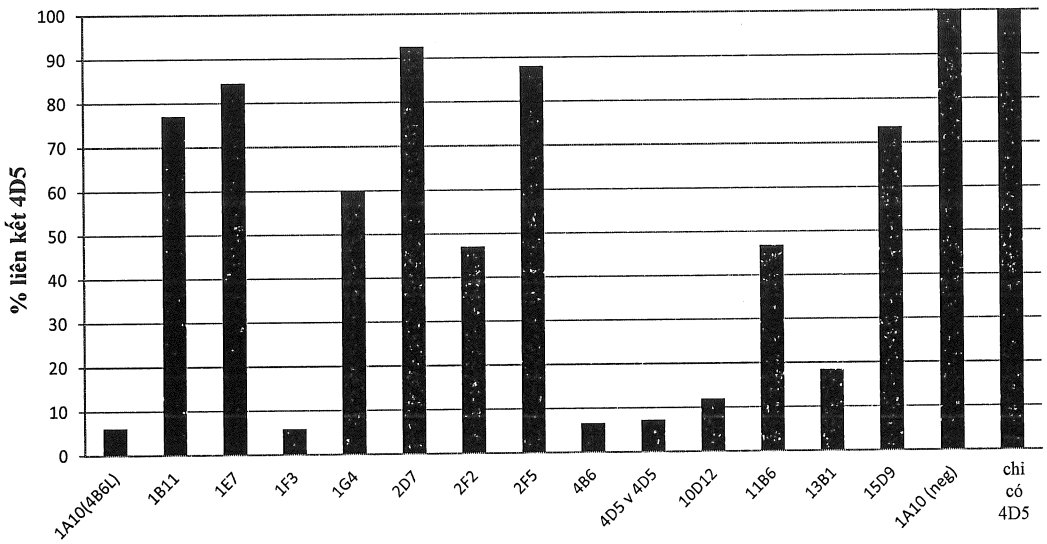


FIG. 61B

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh nhận biết mAb MASP-3 (IgG4) ngăn chặn sự tương tác giữa mAb 10D12 (IgG1) và MASP-3

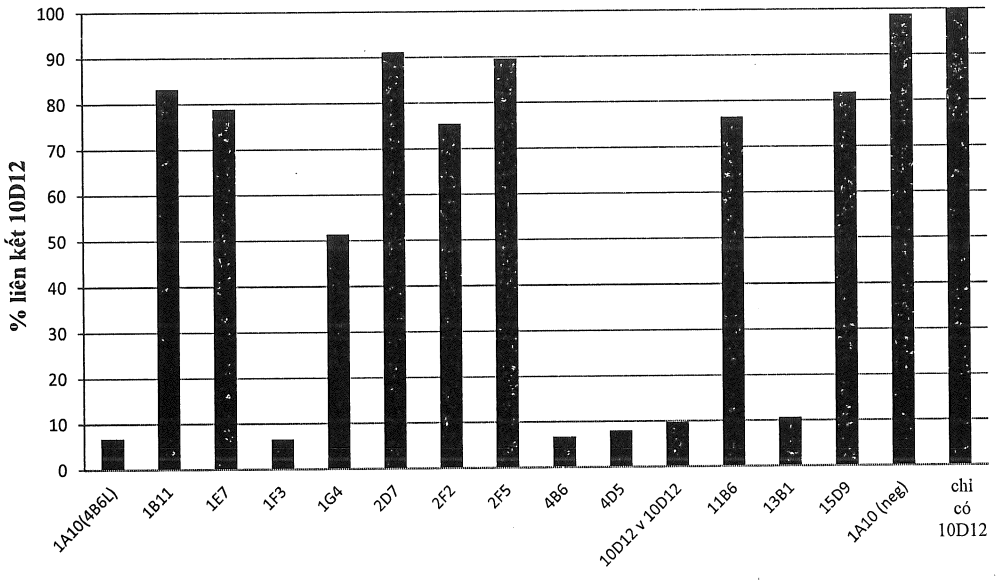


FIG. 61C

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh nhận biết mAb MASP-3 (IgG4) ngăn chặn sự tương tác giữa mAb 13B1 (IgG1) và MASP-3

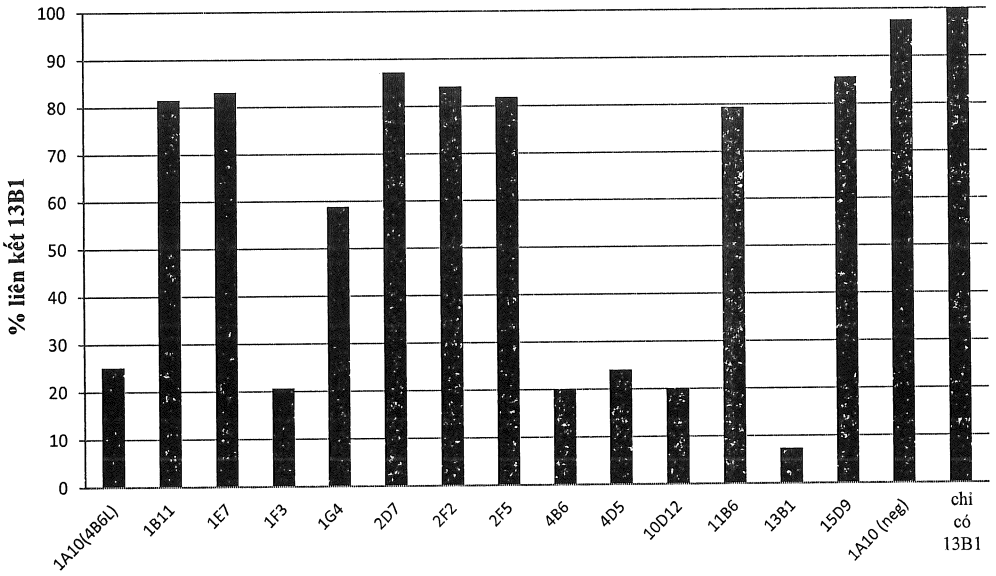


FIG. 61D

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh nhận biết mAb MASP-3 (IgG4) ngăn chặn sự tương tác giữa mAb 1F3 (IgG4) và MASP-3

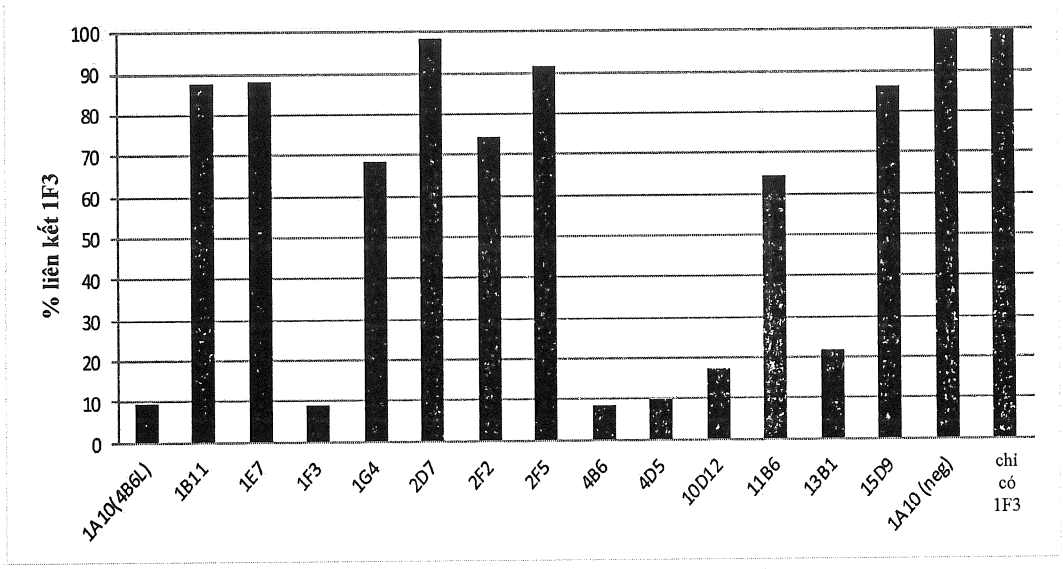


FIG. 61E

Thử nghiệm liên kết cạnh tranh nhận biết mAb MASP-3 (IgG4) ngăn chặn sự tương tác giữa mAb 1G4 (IgG1) và MASP-3

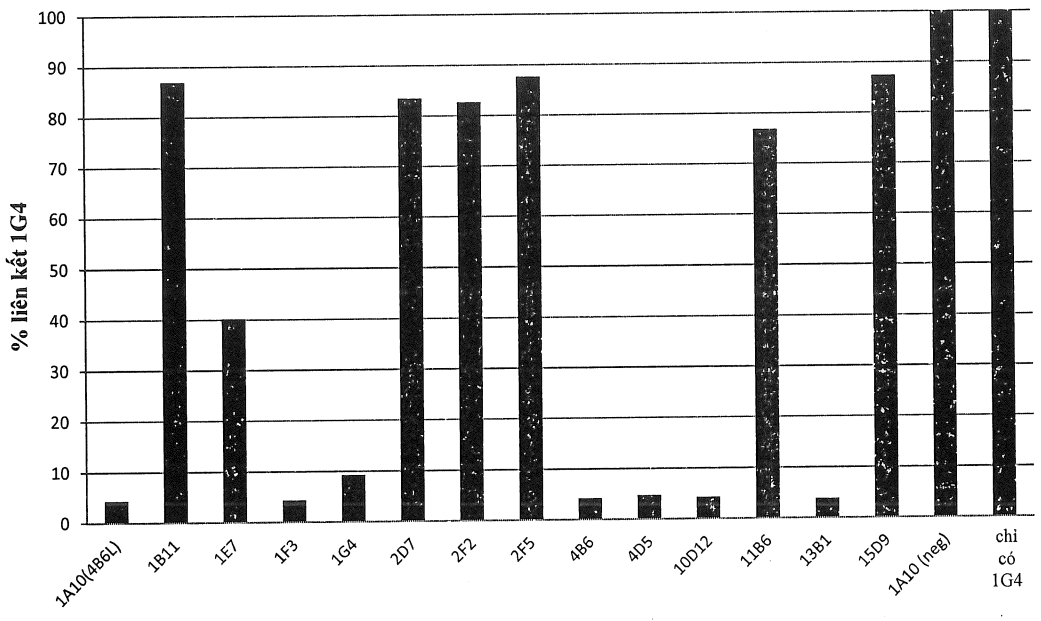
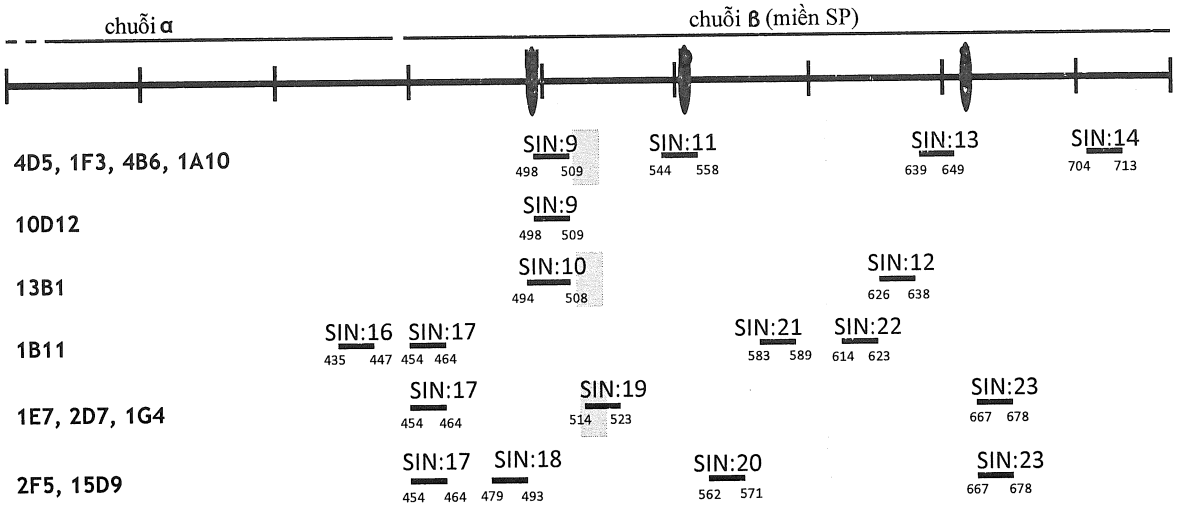


FIG. 62

Các vùng tiếp xúc trên MASP-3 bằng mAb MASP-3

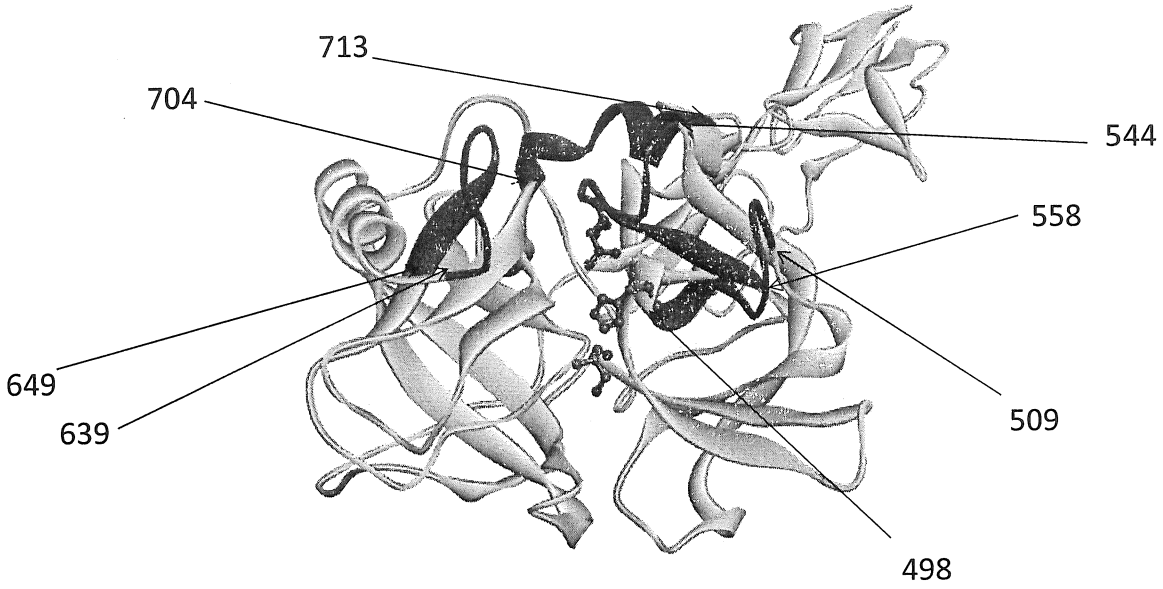


H=497
D=553
S=664

Lưu ý: "SIN" số 9 đến số 23 dùng để chỉ SEQ ID No:

FIG. 63A

Các vùng tiếp xúc trên MASP-3 người đối với mAb 1F3, 4B6, 4D5 và 1A10



SEQ ID NO:9 = aa gốc 498-509 của MASP-3
SEQ ID NO:11= aa gốc 544-558 của MASP-3
SEQ ID NO:13= aa gốc 639-649 của MASP-3
SEQ ID NO:14= aa gốc 704-713 của MASP-3

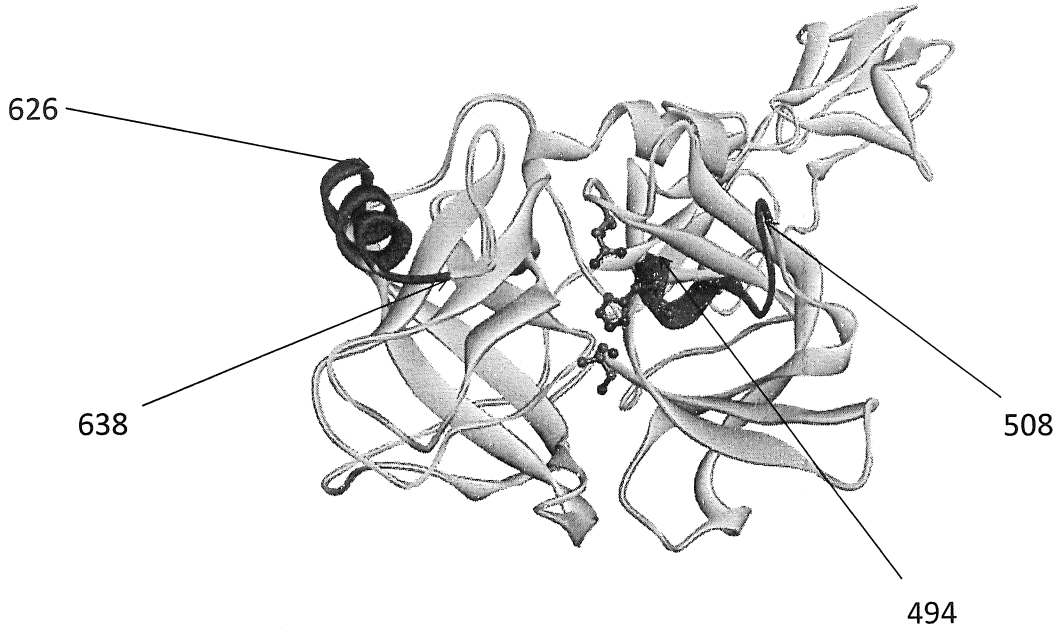
FIG. 63B

Các vùng tiếp xúc trên MASP-3 người đối với mAb 10D12

SEQ ID NO:9 = aa gốc 498-509 của MASP-3

FIG. 64

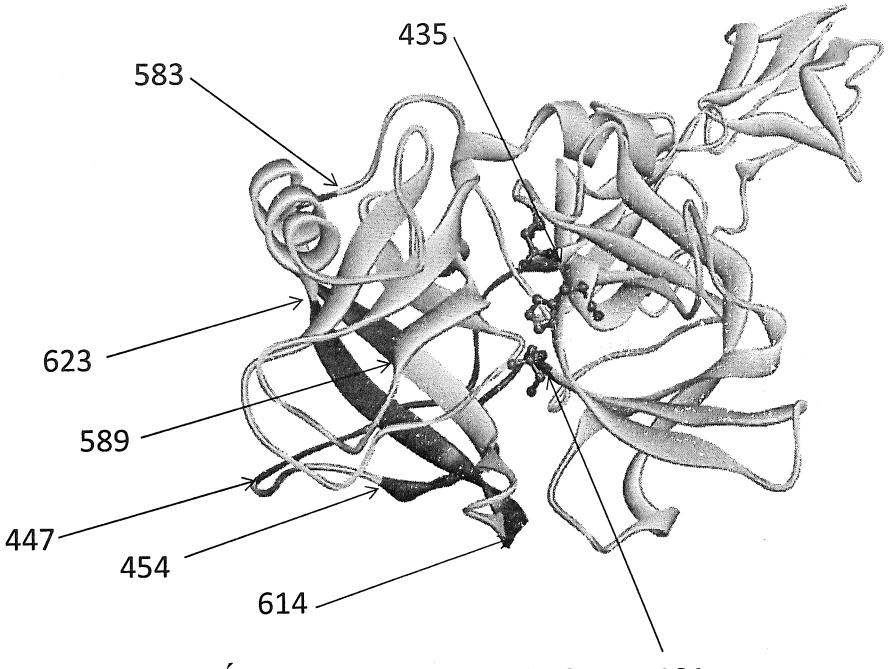
Các vùng tiếp xúc trên MASP-3 người đối với mAb 13B1



SEQ ID NO:10= aa gốc 494 đến 508 của MASP-3
SEQ ID NO:12= aa gốc 626 đến 638 của MASP-3

FIG. 65

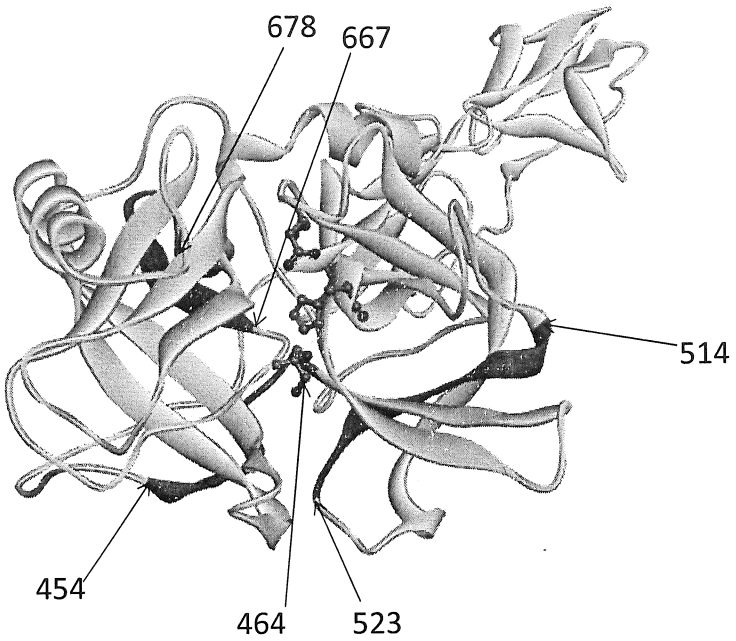
Các vùng tiếp xúc trên MASP-3 người đối với mAb 1B11



SEQ ID NO:16= aa gốc 435-447 của MASP-3
SEQ ID NO:17= aa gốc 454-464 của MASP-3
SEQ ID NO:21= aa gốc 583-589 của MASP-3
SEQ ID NO:22= aa gốc 614-623 của MASP-3

FIG. 66

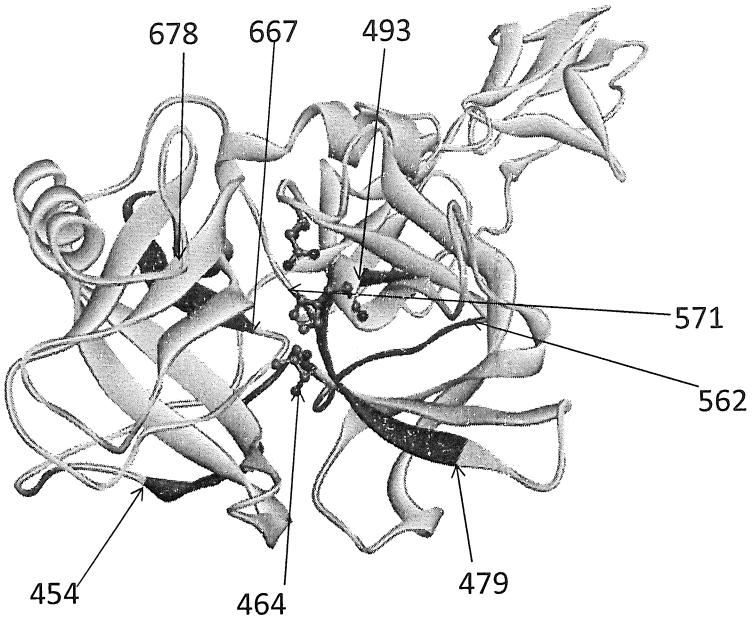
Các vùng tiếp xúc trên MASP-3 người đối với mAb 1E7, 1G4, và 2D7



SEQ ID NO:17= aa gốc 454 đến 464 của MASP-3
SEQ ID NO:19= aa gốc 514 đến 523 của MASP-3
SEQ ID NO:23= aa gốc 667 đến 678 của MASP-3

FIG. 67

Các vùng tiếp xúc trên MASP-3 người đối với mAb 15D9 và 2F5



SEQ ID NO:17= aa gốc 454 đến 464 của MASP-3
SEQ ID NO:18= aa gốc 479 đến 493 của MASP-3
SEQ ID NO:20= aa gốc 562 đến 571 của MASP-3
SEQ ID NO:23= aa gốc 667 đến 678 của MASP-3

FIG. 68

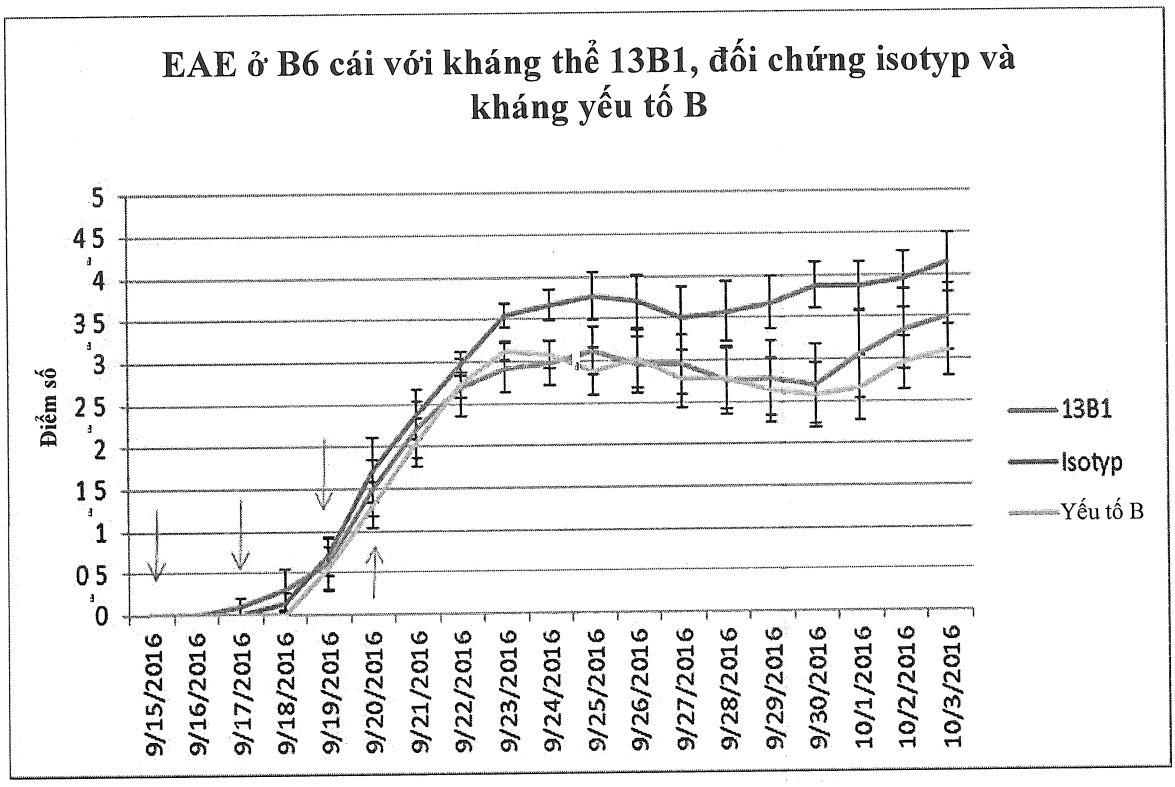

EAE ở B6 cái với kháng thể 13B1, đối chứng isotyp và kháng yếu tố B
Điểm số
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
9/15/2016
9/16/2016
9/17/2016
9/18/2016
9/19/2016
9/20/2016
9/21/2016
9/22/2016
9/23/2016
9/24/2016
9/25/2016
9/26/2016
9/27/2016
9/28/2016
9/29/2016
9/30/2016
10/1/2016
10/2/2016
10/3/2016
13B1
Isotyp
Yếu tố B

FIG. 69

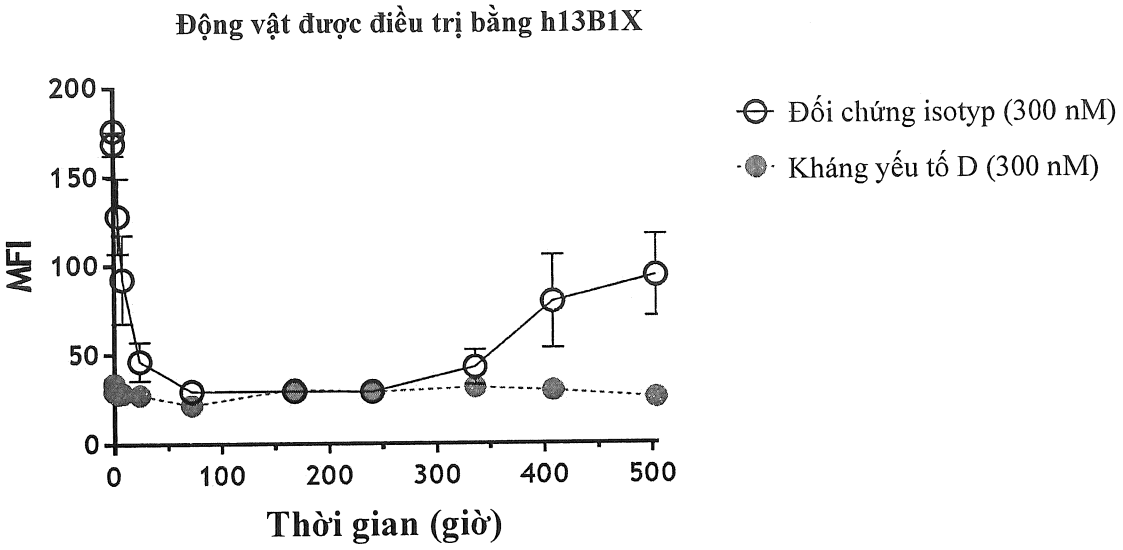

Động vật được điều trị bằng h13B1X
200
150
100
50
0
MFI
0
100
200
300
400
500
Thời gian (giờ)
Đối chứng isotyp (300 nM)
Kháng yếu tố D (300 nM)

FIG. 70

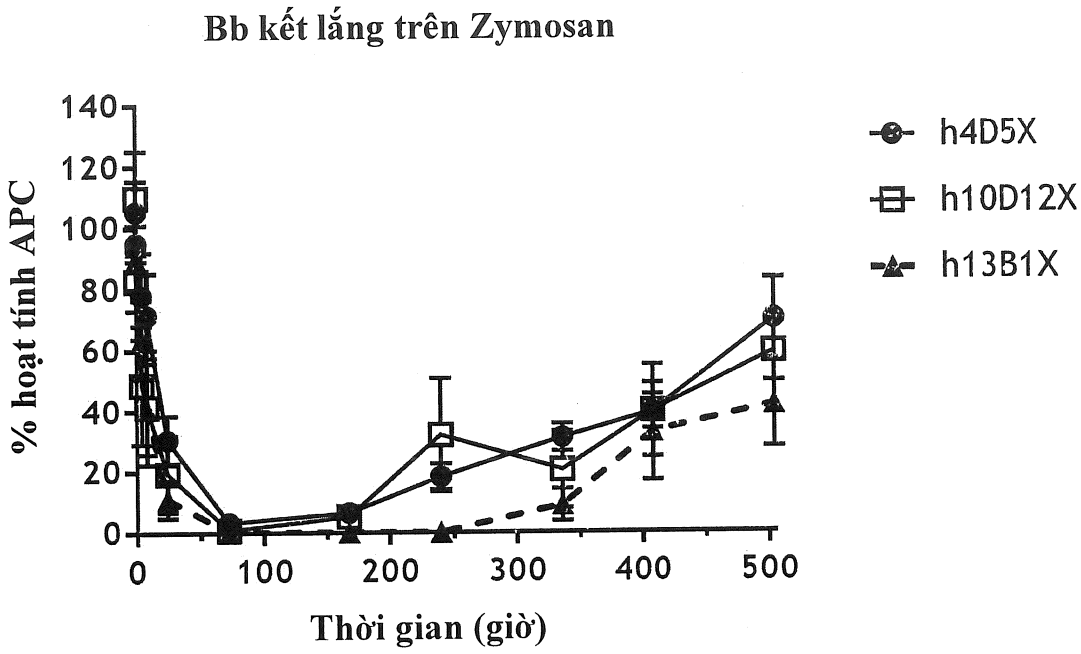

Bb kết lắng trên Zymosan
% hoạt tính APC
140
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
Thời gian (giờ)
h4D5X
h10D12X
h13B1X

FIG. 71A

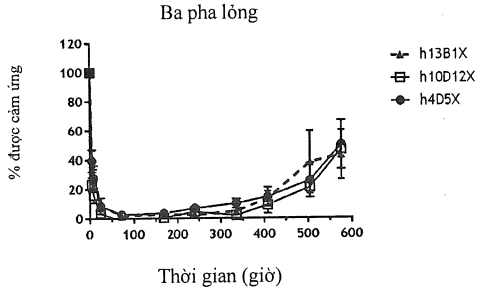


FIG. 71B

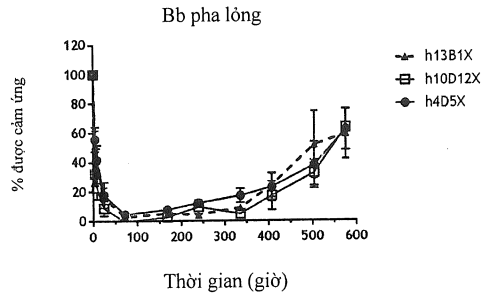


FIG. 71C

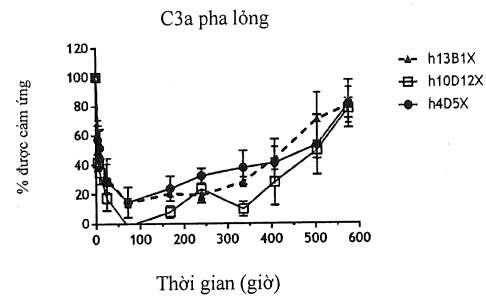


FIG. 72A

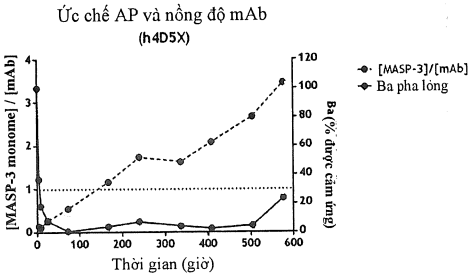


FIG. 72B

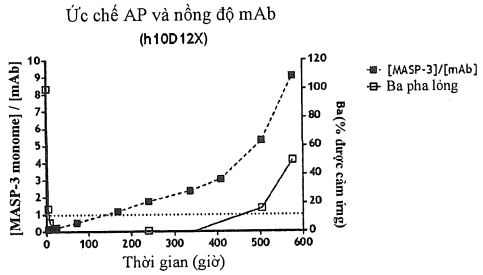


FIG. 72C

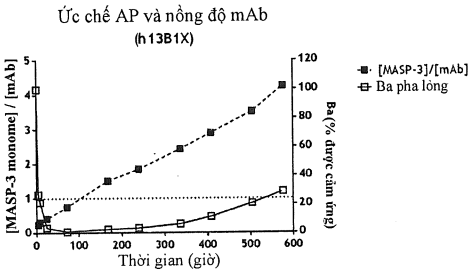
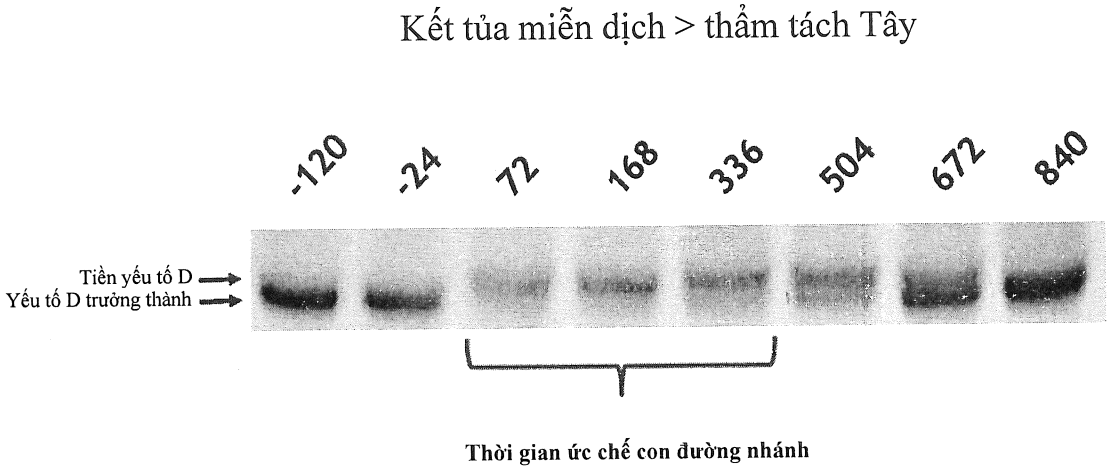


FIG. 73

Phân tích Pro-Df/Df trưởng thành trong huyết thanh từ khỉ được điều trị bằng 13B1X



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Omeros Corporation
University of Leicester
Cummings, W. Jason
Demopulos, Gregory A.
Dudler, Thomas
Schwaeble, Hans-Wilhelm
Tjoelker, Larry W.
Wood, Christi L.
Yabuki, Munehisa

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP HOẶC MẢNH LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ LIÊN KẾT VỚI MASP-3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

<130> MP.1.0254.PCT

<150> US 62/478,336
<151> 2017-03-29

<150> US 62/419,420
<151> 2016-11-08

<150> US 62/369,674
<151> 2016-08-01

<160> 313

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 3895
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<400> 1
attccggcac agggacacaa acaagctcac ccaacaaagc caagctggga ggaccaaggc
60

cgggcagccg ggagcaccca aggcaggaaa atgaggtggc tgcttctcta ttatgctctg
120

tgcttctccc tgtcaaaggc ttcagcccac accgtggagc taaacaatat gtttggccag
180

atccagtcgc ctggttatcc agactcctat cccagtgatt cagaggtgac ttggaatatc
240

actgtcccag atgggtttcg gatcaagctt tacttcatgc acttcaactt ggaatcctcc
300

tacctttgtg aatatgacta tgtgaaggta gaaactgagg accaggtgct ggcaaccttc
360

tgtggcaggg agaccacaga cacagagcag actcccggcc aggaggtggt cctctcccct
420

ggctccttca tgtccatcac tttccggtca gatttctcca atgaggagcg tttcacaggc
480

tttgatgccc actacatggc tgtggatgtg gacgagtgca aggagaggga ggacgaggag
540

ctgtcctgtg accactactg ccacaactac attggcggct actactgctc ctgccgcttc
600

ggctacatcc tccacacaga caacaggacc tgccgagtgg agtgcagtga caacctcttc
660

actcaaagga ctggggtgat caccagccct gacttcccaa acccttaccc caagagctct
720

gaatgcctgt ataccatcga gctggaggag ggtttcatgg tcaacctgca gtttgaggac
780

atatttgaca ttgaggacca tcctgaggtg ccctgcccct atgactacat caagatcaaa
840

gttggtccaa aagttttggg gcctttctgt ggagagaaag ccccagaacc catcagcacc
900

cagagccaca gtgtcctgat cctgttccat agtgacaact cgggagagaa ccggggctgg
960

aggctctcat acagggctgc aggaaatgag tgcccagagc tacagcctcc tgtccatggg
1020

aaaatcgagc cctcccaagc caagtatttc ttcaaagacc aagtgctcgt cagctgtgac
1080

acaggctaca aagtgctgaa ggataatgtg gagatggaca cattccagat tgagtgtctg
1140

aaggatggga cgtggagtaa caagattccc acctgtaaaa ttgtagactg tagagcccca
1200

ggagagctgg aacacgggct gatcaccttc tctacaagga acaacctcac cacatacaag
1260

tctgagatca aatactcctg tcaggagccc tattacaaga tgctcaacaa taacacaggt
1320

atatatacct gttctgccca aggagtctgg atgaataaag tattggggag aagcctaccc
1380

acctgccttc cagagtgtgg tcagccctcc cgctccctgc caagcctggt caagaggatc
1440

attgggggcc gaaatgctga gcctggcctc ttcccgtggc aggccctgat agtggtggag
1500

gacacttcga gagtgccaaa tgacaagtgg tttgggagtg gggccctgct ctctgcgtcc
1560

tggatcctca cagcagctca tgtgctgcgc tcccagcgta gagacaccac ggtgatacca
1620

gtctccaagg agcatgtcac cgtctacctg ggcttgcatg atgtgcgaga caaatcgggg
1680

gcagtcaaca gctcagctgc ccgagtggtg ctccacccag acttcaacat ccaaaactac
1740

aaccacgata tagctctggt gcagctgcag gagcctgtgc ccctgggacc ccacgttatg
1800

cctgtctgcc tgccaaggct tgagcctgaa ggcccggccc cccacatgct gggcctggtg
1860

gccggctggg gcatctccaa tcccaatgtg acagtggatg agatcatcag cagtggcaca
1920

cggaccttgt cagatgtcct gcagtatgtc aagttacccg tggtgcctca cgctgagtgc
1980

aaaactagct atgagtcccg ctcgggcaat tacagcgtca cggagaacat gttctgtgct
2040

ggctactacg agggcggcaa agacacgtgc cttggagata gcggtggggc ctttgtcatc
2100

tttgatgact tgagccagcg ctgggtggtg caaggcctgg tgtcctgggg gggacctgaa
2160

gaatgcggca gcaagcaggt ctatggagtc tacacaaagg tctccaatta cgtggactgg
2220

gtgtgggagc agatgggctt accacaaagt gttgtggagc cccaggtgga acggtgagct
2280

gacttacttc ctcggggcct gcctcccctg agcgaagcta caccgcactt ccgacagcac
2340

actccacatt acttatcaga ccatatggaa tggaacacac tgacctagcg gtggcttctc
2400

ctaccgagac agcccccagg accctgagag gcagagtgtg gtatagggaa aaggctccag
2460

gcaggagacc tgtgttcctg agcttgtcca agtctctttc cctgtctggg cctcactcta
2520

ccgagtaata caatgcagga gctcaaccaa ggcctctgtg ccaatcccag cactcctttc
2580

caggccatgc ttcttacccc agtggccttt attcactcct gaccacttat caaacccatc
2640

ggtcctactg ttggtataac tgagcttgga cctgactatt agaaaatggt ttctaacatt
2700

gaactgaatg ccgcatctgt atattttcct gctctgcctt ctgggactag ccttggccta
2760

atccttcctc taggagaaga gcattcaggt tttgggagat ggctcatagc caagcccctc
2820

tctcttagtg tgatcccttg gagcaccttc atgcctgggg tttctctccc aaaagcttct
2880

tgcagtctaa gccttatccc ttatgttccc cattaaagga atttcaaaag acatggagaa
2940

agttgggaag gtttgtgctg actgctggga gcagaatagc cgtgggaggc ccaccaagcc
3000

cttaaattcc cattgtcaac tcagaacaca tttgggccca tatgccaccc tggaacacca
3060

gctgacacca tgggcgtcca cacctgctgc tccagacaag cacaaagcaa tctttcagcc
3120

ttgaaatgta ttatctgaaa ggctacctga agcccaggcc cgaatatggg gacttagtcg
3180

attacctgga aaaagaaaag acccacactg tgtcctgctg tgcttttggg caggaaaatg
3240

gaagaaagag tggggtgggc acattagaag tcacccaaat cctgccaggc tgcctggcat
3300

ccctggggca tgagctgggc ggagaatcca ccccgcagga tgttcagagg gacccactcc
3360

ttcatttttc agagtcaaag gaatcagagg ctcacccatg gcaggcagtg aaaagagcca
3420

ggagtcctgg gttctagtcc ctgctctgcc cccaactggc tgtataacct ttgaaaaatc
3480

attttctttg tctgagtctc tggttctccg tcagcaacag gctggcataa ggtcccctgc
3540

aggttccttc tagctggagc actcagagct tccctgactg ctagcagcct ctctggccct
3600

cacagggctg attgttctcc ttctccctgg agctctctct cctgaaaatc tccatcagag
3660

caaggcagcc agagaagccc ctgagaggga atgattggga agtgtccact ttctcaaccg
3720

gctcatcaaa cacactcctt tgtctatgaa tggcacatgt aaatgatgtt atattttgta
3780

tcttttatat catatgcttc accattctgt aaagggcctc tgcattgttg ctcccatcag
3840

gggtctcaag tggaaataaa ccctcgtgga taaccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa
3895

<210> 2
<211> 728
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln
20 25 30

Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp
35 40 45

Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His
50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val
65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr
85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser
100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe
115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys
130 135 140

Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
145 150 155 160

Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr
165 170 175

Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln
180 185 190

Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Phe Pro Asn Pro Tyr Pro Lys
195 200 205

Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val
210 215 220

Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val
225 230 235 240

Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu
245 250 255

Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Ser Thr Gln Ser
260 265 270

His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg
275 280 285

Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu
290 295 300

Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Phe
305 310 315 320

Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu
325 330 335

Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp
340 345 350

Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Ile Val Asp Cys Arg
355 360 365

Ala Pro Gly Glu Leu Glu His Gly Leu Ile Thr Phe Ser Thr Arg Asn
370 375 380

Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Lys Tyr Ser Cys Gln Glu Pro
385 390 395 400

Tyr Tyr Lys Met Leu Asn Asn Asn Thr Gly Ile Tyr Thr Cys Ser Ala
405 410 415

Gln Gly Val Trp Met Asn Lys Val Leu Gly Arg Ser Leu Pro Thr Cys
420 425 430

Leu Pro Glu Cys Gly Gln Pro Ser Arg Ser Leu Pro Ser Leu Val Lys
435 440 445

Arg Ile Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Pro Gly Leu Phe Pro Trp Gln
450 455 460

Ala Leu Ile Val Val Glu Asp Thr Ser Arg Val Pro Asn Asp Lys Trp
465 470 475 480

Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Ala Ser Trp Ile Leu Thr Ala Ala
485 490 495

His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Thr Thr Val Ile Pro Val Ser
500 505 510

Lys Glu His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His Asp Val Arg Asp Lys
515 520 525

Ser Gly Ala Val Asn Ser Ser Ala Ala Arg Val Val Leu His Pro Asp
530 535 540

Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Gln
545 550 555 560

Glu Pro Val Pro Leu Gly Pro His Val Met Pro Val Cys Leu Pro Arg
565 570 575

Leu Glu Pro Glu Gly Pro Ala Pro His Met Leu Gly Leu Val Ala Gly
580 585 590

Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Val Thr Val Asp Glu Ile Ile Ser Ser
595 600 605

Gly Thr Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Gln Tyr Val Lys Leu Pro Val
610 615 620

Val Pro His Ala Glu Cys Lys Thr Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Gly Asn
625 630 635 640

Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Tyr Glu Gly Gly
645 650 655

Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Val Ile Phe Asp
660 665 670

Asp Leu Ser Gln Arg Trp Val Val Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Gly
675 680 685

Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
690 695 700

Ser Asn Tyr Val Asp Trp Val Trp Glu Gln Met Gly Leu Pro Gln Ser
705 710 715 720

Val Val Glu Pro Gln Val Glu Arg
725

<210> 3
<211> 733
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Met Arg Phe Leu Ser Phe Trp Arg Leu Leu Leu Tyr His Ala Leu Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Glu Val Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Glu Met
20 25 30

Phe Gly Gln Ile Gln Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp
35 40 45

Ser Glu Val Thr Trp Asn Ile Thr Val Pro Glu Gly Phe Arg Ile Lys
50 55 60

Leu Tyr Phe Met His Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr
65 70 75 80

Asp Tyr Val Lys Val Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys
85 90 95

Gly Arg Glu Thr Thr Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val
100 105 110

Leu Ser Pro Gly Thr Phe Met Ser Val Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser
115 120 125

Asn Glu Glu Arg Phe Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp
130 135 140

Val Asp Glu Cys Lys Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His
145 150 155 160

Tyr Cys His Asn Tyr Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly
165 170 175

Tyr Ile Leu His Thr Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Gly
180 185 190

Asn Leu Phe Thr Gln Arg Thr Gly Thr Ile Thr Ser Pro Asp Tyr Pro
195 200 205

Asn Pro Tyr Pro Lys Ser Ser Glu Cys Ser Tyr Thr Ile Asp Leu Glu

210 215 220

Glu Gly Phe Met Val Ser Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu
225 230 235 240

Asp His Pro Glu Val Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Ala
245 250 255

Gly Ser Lys Val Trp Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ser Pro Glu Pro
260 265 270

Ile Ser Thr Gln Thr His Ser Val Gln Ile Leu Phe Arg Ser Asp Asn
275 280 285

Ser Gly Glu Asn Arg Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn
290 295 300

Glu Cys Pro Lys Leu Gln Pro Pro Val Tyr Gly Lys Ile Glu Pro Ser
305 310 315 320

Gln Ala Val Tyr Ser Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr
325 330 335

Gly Tyr Lys Val Leu Lys Asp Asn Gly Val Met Asp Thr Phe Gln Ile
340 345 350

Glu Cys Leu Lys Asp Gly Ala Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys
355 360 365

Ile Val Asp Cys Gly Ala Pro Ala Gly Leu Lys His Gly Leu Val Thr
370 375 380

Phe Ser Thr Arg Asn Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Arg Tyr
385 390 395 400

Ser Cys Gln Gln Pro Tyr Tyr Lys Met Leu His Asn Thr Thr Gly Val
405 410 415

Tyr Thr Cys Ser Ala His Gly Thr Trp Thr Asn Glu Val Leu Lys Arg
420 425 430

Ser Leu Pro Thr Cys Leu Pro Val Cys Gly Gln Pro Ser Arg Ala Leu
435 440 445

Pro Asn Leu Val Lys Arg Ile Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Leu Gly
450 455 460

Leu Phe Pro Trp Gln Ala Leu Ile Val Val Glu Asp Thr Ser Arg Val
465 470 475 480

Pro Asn Asp Lys Trp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Glu Ser Trp
485 490 495

Ile Leu Thr Ala Ala His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Asn Thr
500 505 510

Val Ile Pro Val Ser Lys Glu His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His
515 520 525

Asp Val Arg Asp Lys Ser Gly Ala Val Asn Ser Ser Ala Ala Arg Val
530 535 540

Ile Leu His Pro Asp Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala
545 550 555 560

Leu Val Gln Leu Gln Lys Pro Val Pro Leu Gly Ala His Val Met Pro
565 570 575

Ile Cys Leu Pro Arg Pro Glu Pro Glu Gly Pro Ala Pro His Met Leu
580 585 590

Gly Leu Val Ala Gly Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Val Thr Val Asp
595 600 605

Glu Ile Ile Leu Ser Gly Thr Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Gln Tyr
610 615 620

Val Lys Leu Pro Val Val Ser His Ala Glu Cys Lys Ala Ser Tyr Glu
625 630 635 640

Ser Arg Ser Gly Asn Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly

645 650 655

Tyr Tyr Glu Gly Gly Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala
660 665 670

Phe Val Ile Phe Asp Glu Met Ser Gln His Trp Val Ala Gln Gly Leu
675 680 685

Val Ser Trp Gly Gly Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly
690 695 700

Val Tyr Thr Lys Val Ser Asn Tyr Val Asp Trp Leu Trp Glu Glu Met
705 710 715 720

Asn Ser Pro Arg Ala Val Arg Asp Leu Gln Val Glu Arg
725 730

<210> 4
<211> 733
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Arg Phe Leu Ser Phe Arg Arg Leu Leu Leu Tyr His Val Leu Cys
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Glu Val Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Glu Met
20 25 30

Phe Gly Gln Ile Gln Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp
35 40 45

Ser Glu Val Thr Trp Asn Ile Thr Val Pro Glu Gly Phe Arg Val Gln
50 55 60

Leu Tyr Phe Met His Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr
65 70 75 80

Asp Tyr Val Lys Val Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys
85 90 95

Gly Arg Glu Thr Thr Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val
100 105 110

Leu Ser Pro Gly Ser Phe Met Ser Val Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser
115 120 125

Asn Glu Glu Arg Phe Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp
130 135 140

Val Asp Glu Cys Lys Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His
145 150 155 160

Tyr Cys His Asn Tyr Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly
165 170 175

Tyr Ile Leu His Thr Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Gly
180 185 190

Asn Leu Phe Thr Gln Arg Thr Gly Thr Ile Thr Ser Pro Asp Tyr Pro
195 200 205

Asn Pro Tyr Pro Lys Ser Ser Glu Cys Ser Tyr Thr Ile Asp Leu Glu
210 215 220

Glu Gly Phe Met Val Thr Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu
225 230 235 240

Asp His Pro Glu Val Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Ala
245 250 255

Gly Ser Lys Val Trp Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ser Pro Glu Pro
260 265 270

Ile Ser Thr Gln Ser His Ser Ile Gln Ile Leu Phe Arg Ser Asp Asn
275 280 285

Ser Gly Glu Asn Arg Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn
290 295 300

Glu Cys Pro Lys Leu Gln Pro Pro Val Tyr Gly Lys Ile Glu Pro Ser
305 310 315 320

Gln Ala Val Tyr Ser Phe Lys Asp Gln Val Leu Ile Ser Cys Asp Thr
325 330 335

Gly Tyr Lys Val Leu Lys Asp Asn Glu Val Met Asp Thr Phe Gln Ile
340 345 350

Glu Cys Leu Lys Asp Gly Ala Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys
355 360 365

Ile Val Asp Cys Gly Val Pro Ala Val Leu Lys His Gly Leu Val Thr
370 375 380

Phe Ser Thr Arg Asn Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Arg Tyr
385 390 395 400

Ser Cys Gln Gln Pro Tyr Tyr Lys Met Leu His Asn Thr Thr Gly Val
405 410 415

Tyr Thr Cys Ser Ala His Gly Thr Trp Thr Asn Glu Val Leu Lys Arg
420 425 430

Ser Leu Pro Thr Cys Leu Pro Val Cys Gly Gln Pro Ser Arg Ala Leu
435 440 445

Pro Asn Leu Val Lys Arg Ile Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Leu Gly
450 455 460

Leu Phe Pro Trp Gln Ala Leu Ile Val Val Glu Asp Thr Ser Arg Ile
465 470 475 480

Pro Asn Asp Lys Trp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Glu Ser Trp
485 490 495

Ile Leu Thr Ala Ala His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Asn Thr
500 505 510

Val Ile Pro Val Ser Lys Asp His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His
515 520 525

Asp Val Arg Asp Lys Ser Gly Ala Val Asn Ser Ser Ala Ala Arg Val
530 535 540

Val Leu His Pro Asp Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala
545 550 555 560

Leu Val Gln Leu Gln Glu Pro Val Pro Leu Gly Ala His Val Met Pro
565 570 575

Ile Cys Leu Pro Arg Pro Glu Pro Glu Gly Pro Ala Pro His Met Leu
580 585 590

Gly Leu Val Ala Gly Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Val Thr Val Asp
595 600 605

Glu Ile Ile Ile Ser Gly Thr Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Gln Tyr
610 615 620

Val Lys Leu Pro Val Val Ser His Ala Glu Cys Lys Ala Ser Tyr Glu
625 630 635 640

Ser Arg Ser Gly Asn Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly
645 650 655

Tyr Tyr Glu Gly Gly Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala
660 665 670

Phe Val Ile Phe Asp Glu Met Ser Gln Arg Trp Val Ala Gln Gly Leu
675 680 685

Val Ser Trp Gly Gly Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly
690 695 700

Val Tyr Thr Lys Val Ser Asn Tyr Val Asp Trp Leu Leu Glu Glu Met
705 710 715 720

Asn Ser Pro Arg Gly Val Arg Glu Leu Gln Val Glu Arg
725 730

<210> 5
<211> 730

<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 5

Met Arg Tyr Pro Leu Ala Trp Ser Met Cys Ala Trp Leu Leu Gly Val
1 5 10 15

Val Gly Ala Val Glu Leu Thr Asp Met Phe Gly Glu Ile Arg Ser Pro
20 25 30

Asn Phe Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp Asn Ile
35 40 45

Ser Val Pro Glu Gly Phe Lys Ile Lys Leu Tyr Tyr Met His Phe Asp
50 55 60

Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Ile Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Gln Glu Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr Asp Thr
85 90 95

Glu Gln Ala Pro Gly Gln Gln Val Ile Leu Ser Pro Gly Pro Tyr Met
100 105 110

Gly Leu Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe Thr Gly
115 120 125

Phe Asp Ala His Tyr Thr Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Leu Glu Lys
130 135 140

Ser Asp Glu Glu Leu Ala Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Ile Gly
145 150 155 160

Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Ser Asp Asn
165 170 175

Arg Thr Cys Lys Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Tyr Thr Gln Arg Ser
180 185 190

Gly Val Val Thr Ser Ala Asp Phe Pro Ser Pro Tyr Pro Lys Ser Ser

195 200 205

Asp Cys Leu Tyr Arg Ile Glu Leu Glu Asp Gly Phe Phe Ile Thr Leu
210 215 220

Ser Phe Glu Asp Ser Phe Asp Val Glu Asp His Pro Glu Val Thr Cys
225 230 235 240

Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Ala Gly Gln Arg Glu Phe Gly Pro
245 250 255

Phe Cys Gly Glu Lys Ser Pro Gly Arg Ile Glu Thr Gln Thr Asn Ser
260 265 270

Val Gln Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg Gly Trp
275 280 285

Lys Leu Ser Tyr Thr Ala Ile Gly Asn Pro Cys Pro Leu Val Gln Pro
290 295 300

Pro Ile Asn Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Thr Phe Lys
305 310 315 320

Asp Gln Val Val Ile Ser Cys Asn Thr Gly Tyr Lys Val Leu Lys Asp
325 330 335

Asn Leu Glu Ser Asp Ser Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp Gly Thr
340 345 350

Trp Ser Asn Lys Ile Pro Ile Cys Lys Ile Ala Asp Cys Gln Ala Pro
355 360 365

Pro Glu Leu Glu His Gly Phe Val Thr Phe Leu Ser Arg Asn Asn Leu
370 375 380

Thr Thr Tyr Arg Ala Arg Ile Gln Tyr His Cys Gln His Pro Tyr Tyr
385 390 395 400

His Met Ala Pro Asn Ser Thr Ala Thr Tyr Thr Cys Asp Ala Ser Gly
405 410 415

Val Trp Arg Ser Glu Glu Leu Gly Thr Val Leu Pro Ser Cys Arg Pro
420 425 430

Val Cys Gly Arg Pro Val Arg Ala Leu Pro Gly Ile Ile Lys Arg Ile
435 440 445

Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Pro Gly Phe Phe Pro Trp Gln Ala Leu
450 455 460

Ile Val Val Glu Asp Met Ser Arg Val Pro Asn Asp Lys Trp Phe Gly
465 470 475 480

Ser Gly Ala Leu Leu Ser Asp Ser Trp Val Leu Thr Ala Ala His Val
485 490 495

Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Lys Thr Val Ile Pro Val Ser Lys Glu
500 505 510

His Val Thr Val Tyr Leu Ala Leu His Asp Val Arg Asn Lys Leu Glu
515 520 525

Ala Val Asn Arg Thr Val Glu Arg Ile Ile Leu His Glu Asp Phe Asp
530 535 540

Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Val Lys Leu Lys Glu Lys
545 550 555 560

Val Thr Met Gly Asn Tyr Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Gln Phe Glu
565 570 575

His Glu Leu Glu Gly Pro His Pro Asn Thr Leu Gly Leu Val Ala Gly
580 585 590

Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Ile Thr Val Asp Glu Ile Ile Ser Ser
595 600 605

Gly Met Arg Thr Leu Ser Asp Ile Leu Gln Tyr Val Lys Leu Pro Val
610 615 620

Val Leu His Ala Glu Cys Lys Thr Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Gly Asn

625 630 635 640

Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Tyr Glu Gly Gly
645 650 655

Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Val Ile Gln Asp
660 665 670

Pro Gly Thr Arg Arg Trp Val Ala Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Gly
675 680 685

Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
690 695 700

Ser Asn Tyr Val Asp Trp Val Glu Lys Asn Thr Gly Ser Ser Glu Arg
705 710 715 720

Trp Thr Phe Leu Asp Pro Glu Leu Glu Arg
725 730

<210> 6
<211> 728
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 6

Met Arg Trp Leu Leu Leu Cys His Ala Leu Cys Phe Ser Leu Leu Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asp Met Phe Gly Gln Ile Gln
20 25 30

Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp
35 40 45

Asn Ile Thr Val Pro Glu Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His
50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val
65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr
85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser
100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe
115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys
130 135 140

Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
145 150 155 160

Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr
165 170 175

Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln
180 185 190

Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Tyr Pro Asn Pro Tyr Pro Lys
195 200 205

Ser Ser Glu Cys Phe Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Ile
210 215 220

Ser Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val
225 230 235 240

Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Glu Asn Val Trp
245 250 255

Gly Pro Tyr Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Ala Ile Ser Thr Gln Ser
260 265 270

His Ser Val Gln Ile Leu Phe Arg Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg
275 280 285

Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Ser Glu Leu
290 295 300

Gln Pro Pro Asp Gln Gly Lys Ile Glu Pro Leu Gln Ala Lys Tyr Phe
305 310 315 320

Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu
325 330 335

Lys Asp Asp Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp
340 345 350

Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Met Val Asp Cys Gly
355 360 365

Val Pro Ala Glu Leu Glu His Gly Leu Leu Thr Phe Ser Ser Arg Ser
370 375 380

Asn Leu Thr Thr Tyr Ala Ser Glu Val Thr Tyr Ser Cys Gln Gln Pro
385 390 395 400

Tyr Tyr Arg Leu Leu His Asn Val Ser Gly Val Tyr Thr Cys Ser Ala
405 410 415

Gln Gly Ile Trp Thr Asn Glu Val Leu Gly Arg Ser Leu Pro Thr Cys
420 425 430

Ile Pro Val Cys Gly Gln Pro Ser Arg Ser Leu Pro Ser Leu Ile Lys
435 440 445

Arg Ile Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Pro Gly Leu Phe Pro Trp Gln
450 455 460

Ala Leu Ile Val Val Glu Asp Thr Ser Arg Val Pro Asn Asp Lys Trp
465 470 475 480

Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Glu Ser Trp Ile Leu Thr Ala Ala
485 490 495

His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Asn Thr Val Ile Pro Val Ser
500 505 510

Arg Glu His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His Asp Val Arg Asp Lys
515 520 525

Ser Gly Ala Val Asn Ser Ser Ala Ala Arg Val Leu Leu His Pro Asp
530 535 540

Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Gln
545 550 555 560

Glu Pro Val Pro Leu Gly Pro His Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg
565 570 575

Pro Glu Pro Glu Gly Pro Ala Pro Tyr Met Leu Gly Leu Val Ala Gly
580 585 590

Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Val Thr Val Asp Glu Ile Ile Ser Ser
595 600 605

Gly Thr Arg Thr Leu Ser Asp Ile Leu Gln Tyr Val Lys Leu Pro Val
610 615 620

Val Pro His Ala Glu Cys Lys Thr Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Gly Asn
625 630 635 640

Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Tyr Glu Gly Gly
645 650 655

Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Val Ile Leu Asp
660 665 670

Asp Leu Ser Arg Arg Trp Val Ala Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Gly
675 680 685

Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
690 695 700

Ser Asn Tyr Val Asp Trp Val Trp Glu Gln Met Gly Ser Pro Gln Gly
705 710 715 720

Leu Gly Glu Leu Gln Val Glu Arg
725

<210> 7
<211> 728
<212> PRT
<213> Khỉ đuôi dài

<400> 7

Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr His Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asp Met Phe Gly Gln Ile Gln
20 25 30

Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp
35 40 45

Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His
50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val
65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr
85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser
100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe
115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys
130 135 140

Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
145 150 155 160

Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr
165 170 175

Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln

180 185 190

Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Phe Pro Asn Pro Tyr Pro Lys
195 200 205

Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val
210 215 220

Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val
225 230 235 240

Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu
245 250 255

Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Asn Thr Gln Ser
260 265 270

His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg
275 280 285

Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu
290 295 300

Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Ser
305 310 315 320

Phe Lys Asp Gln Val Leu Ile Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu
325 330 335

Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp
340 345 350

Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Ile Val Asp Cys Arg
355 360 365

Ala Pro Gly Glu Leu Glu His Gly Leu Val Thr Phe Ser Thr Arg Asn
370 375 380

Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Arg Tyr Ser Cys Gln Glu Pro
385 390 395 400

Tyr Tyr Lys Met Leu Asn Asn Ile Thr Gly Ile Tyr Thr Cys Ser Ala
405 410 415

Gln Gly Val Trp Met Asn Lys Val Leu Gly Arg Ser Leu Pro Thr Cys
420 425 430

Leu Pro Glu Cys Gly Gln Pro Ser Arg Ser Leu Pro Ser Leu Val Lys
435 440 445

Arg Ile Ile Gly Gly Arg Asn Ala Glu Pro Gly Leu Phe Pro Trp Gln
450 455 460

Ala Leu Ile Val Val Glu Asp Thr Ser Arg Val Pro Asn Asp Lys Trp
465 470 475 480

Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Glu Ser Trp Ile Leu Thr Ala Ala
485 490 495

His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Thr Thr Val Ile Pro Val Ser
500 505 510

Lys Glu His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His Asp Val Arg Asp Lys
515 520 525

Ser Gly Ala Val Asn Ser Ser Ala Ala Arg Val Val Leu His Pro Asp
530 535 540

Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Gln
545 550 555 560

Glu Pro Val Pro Leu Gly Pro His Val Met Pro Val Cys Leu Pro Arg
565 570 575

Leu Glu Pro Glu Gly Pro Ser Pro His Met Leu Gly Leu Val Ala Gly
580 585 590

Trp Gly Ile Ser Asn Pro Asn Val Thr Val Asp Glu Ile Ile Ser Ser
595 600 605

Gly Thr Arg Thr Leu Ser Asp Val Leu Gln Tyr Val Lys Leu Pro Val

610 615 620

Val Pro His Ala Glu Cys Lys Thr Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Gly Asn
625 630 635 640

Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Tyr Glu Gly Gly
645 650 655

Lys Asp Thr Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Ala Phe Val Ile Leu Asp
660 665 670

Asp Leu Ser Gln Arg Trp Val Val Gln Gly Leu Val Ser Trp Gly Gly
675 680 685

Pro Glu Glu Cys Gly Ser Lys Gln Val Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
690 695 700

Ser Asn Tyr Val Asp Trp Val Trp Glu Gln Met Gly Ser Pro Gln Gly
705 710 715 720

Arg Ala Pro Gly Gly Thr Val Ser
725

<210> 8
<211> 699
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Trp Leu Leu Leu Tyr Tyr Ala Leu Cys Phe Ser Leu Ser Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Thr Val Glu Leu Asn Asn Met Phe Gly Gln Ile Gln
20 25 30

Ser Pro Gly Tyr Pro Asp Ser Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Val Thr Trp
35 40 45

Asn Ile Thr Val Pro Asp Gly Phe Arg Ile Lys Leu Tyr Phe Met His
50 55 60

Phe Asn Leu Glu Ser Ser Tyr Leu Cys Glu Tyr Asp Tyr Val Lys Val
65 70 75 80

Glu Thr Glu Asp Gln Val Leu Ala Thr Phe Cys Gly Arg Glu Thr Thr
85 90 95

Asp Thr Glu Gln Thr Pro Gly Gln Glu Val Val Leu Ser Pro Gly Ser
100 105 110

Phe Met Ser Ile Thr Phe Arg Ser Asp Phe Ser Asn Glu Glu Arg Phe
115 120 125

Thr Gly Phe Asp Ala His Tyr Met Ala Val Asp Val Asp Glu Cys Lys
130 135 140

Glu Arg Glu Asp Glu Glu Leu Ser Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
145 150 155 160

Ile Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Phe Gly Tyr Ile Leu His Thr
165 170 175

Asp Asn Arg Thr Cys Arg Val Glu Cys Ser Asp Asn Leu Phe Thr Gln
180 185 190

Arg Thr Gly Val Ile Thr Ser Pro Asp Phe Pro Asn Pro Tyr Pro Lys
195 200 205

Ser Ser Glu Cys Leu Tyr Thr Ile Glu Leu Glu Glu Gly Phe Met Val
210 215 220

Asn Leu Gln Phe Glu Asp Ile Phe Asp Ile Glu Asp His Pro Glu Val
225 230 235 240

Pro Cys Pro Tyr Asp Tyr Ile Lys Ile Lys Val Gly Pro Lys Val Leu
245 250 255

Gly Pro Phe Cys Gly Glu Lys Ala Pro Glu Pro Ile Ser Thr Gln Ser
260 265 270

His Ser Val Leu Ile Leu Phe His Ser Asp Asn Ser Gly Glu Asn Arg
275 280 285

Gly Trp Arg Leu Ser Tyr Arg Ala Ala Gly Asn Glu Cys Pro Glu Leu
290 295 300

Gln Pro Pro Val His Gly Lys Ile Glu Pro Ser Gln Ala Lys Tyr Phe
305 310 315 320

Phe Lys Asp Gln Val Leu Val Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Lys Val Leu
325 330 335

Lys Asp Asn Val Glu Met Asp Thr Phe Gln Ile Glu Cys Leu Lys Asp
340 345 350

Gly Thr Trp Ser Asn Lys Ile Pro Thr Cys Lys Ile Val Asp Cys Arg
355 360 365

Ala Pro Gly Glu Leu Glu His Gly Leu Ile Thr Phe Ser Thr Arg Asn
370 375 380

Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Ser Glu Ile Lys Tyr Ser Cys Gln Glu Pro
385 390 395 400

Tyr Tyr Lys Met Leu Asn Asn Asn Thr Gly Ile Tyr Thr Cys Ser Ala
405 410 415

Gln Gly Val Trp Met Asn Lys Val Leu Gly Arg Ser Leu Pro Thr Cys
420 425 430

Leu Pro Val Cys Gly Leu Pro Lys Phe Ser Arg Lys Leu Met Ala Arg
435 440 445

Ile Phe Asn Gly Arg Pro Ala Gln Lys Gly Thr Thr Pro Trp Ile Ala
450 455 460

Met Leu Ser His Leu Asn Gly Gln Pro Phe Cys Gly Gly Ser Leu Leu
465 470 475 480

Gly Ser Ser Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Leu His Gln Ser Leu
485 490 495

Asp Pro Lys Asp Pro Thr Leu Arg Asp Ser Asp Leu Leu Ser Pro Ser
500 505 510

Asp Phe Lys Ile Ile Leu Gly Lys His Trp Arg Leu Arg Ser Asp Glu
515 520 525

Asn Glu Gln His Leu Gly Val Lys His Thr Thr Leu His Pro Lys Tyr
530 535 540

Asp Pro Asn Thr Phe Glu Asn Asp Val Ala Leu Val Glu Leu Leu Glu
545 550 555 560

Ser Pro Val Leu Asn Ala Phe Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Glu Gly
565 570 575

Pro Gln Gln Glu Gly Ala Met Val Ile Val Ser Gly Trp Gly Lys Gln
580 585 590

Phe Leu Gln Arg Phe Pro Glu Thr Leu Met Glu Ile Glu Ile Pro Ile
595 600 605

Val Asp His Ser Thr Cys Gln Lys Ala Tyr Ala Pro Leu Lys Lys Lys
610 615 620

Val Thr Arg Asp Met Ile Cys Ala Gly Glu Lys Glu Gly Gly Lys Asp
625 630 635 640

Ala Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Thr Leu Asn Arg Glu
645 650 655

Arg Gly Gln Trp Tyr Leu Val Gly Thr Val Ser Trp Gly Asp Asp Cys
660 665 670

Gly Lys Lys Asp Arg Tyr Gly Val Tyr Ser Tyr Ile His His Asn Lys
675 680 685

Asp Trp Ile Gln Arg Val Thr Gly Val Arg Asn
690 695

<210> 9
<211> 12

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 9

Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Thr Thr Val Ile
1 5 10

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 10

Thr Ala Ala His Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Thr Thr Val
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 11

Asp Phe Asn Ile Gln Asn Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Val Gln
1 5 10 15

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 12

Pro His Ala Glu Cys Lys Thr Ser Tyr Glu Ser Arg Ser
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 13

Gly Asn Tyr Ser Val Thr Glu Asn Met Phe Cys
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 14

Val Ser Asn Tyr Val Asp Trp Val Trp Glu
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 15

Val Leu Arg Ser Gln Arg Arg Asp Thr Thr Val
1 5 10

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 16

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

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 17

Arg Asn Ala Glu Pro Gly Leu Phe Pro Trp Gln
1 5 10

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 18

Lys Trp Phe Gly Ser Gly Ala Leu Leu Ser Ala Ser Trp Ile Leu
1 5 10 15

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 19

Glu His Val Thr Val Tyr Leu Gly Leu His
1 5 10

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 20

Pro Val Pro Leu Gly Pro His Val Met Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 21

Ala Pro His Met Leu Gly Leu
1 5

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 22

Ser Asp Val Leu Gln Tyr Val Lys Leu Pro
1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 23

Ala Phe Val Ile Phe Asp Asp Leu Ser Gln Arg Trp
1 5 10

<210> 24
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 24

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Asp
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Asp Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Ser Leu Glu Asp Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ala Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 25
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 25

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Thr Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Gly Val Glu Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 26
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 26

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Glu Glu Phe
50 55 60

Thr Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Ser Val Glu Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 27
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 27

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Thr Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Glu Leu His Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Ser Val Glu Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 28
<211> 116

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 28

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Arg Thr Pro Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 29

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Thr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 30

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Lys
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Leu Arg Ser Glu Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 31
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 31

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

Ser Val Lys Leu Ala Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 32
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 32

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Gln Ala Phe Tyr Thr Phe Ser Arg Arg Val
20 25 30

His Phe Ala Ile Arg Asp Thr Asn Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln
35 40 45

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn
50 55 60

Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr
85 90 95

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Ser His Tyr Phe
100 105 110

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

<210> 33
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 33

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Val Asn Pro Asn Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Ser
65 70 75 80

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

Ala Ile Cys Pro Phe Tyr Tyr Leu Gly Lys Gly Thr His Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 34

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

Ser Gly Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ile Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Lys Ile Tyr Asn Gly Gly 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 Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Ser Leu Tyr Asp Tyr Asp Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 35

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

Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Asp Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Ala Ser Arg Trp Phe Ala Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 36

Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys 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

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Tyr Tyr Ala Thr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 120

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 37

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Glu 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 Asn Tyr Tyr Ile Ser Ser Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 38

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Pro Ile Glu Trp Met Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Phe His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Val Tyr Tyr Ser Tyr Phe Trp Phe Gly Tyr Trp Gly His
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 39

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Pro Ile Glu Trp Met Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Phe His Pro Tyr Asn Gly Asp Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ser Arg Leu Pro Ser Ala Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Tyr Ala Ala Ser Pro Trp Phe Ala His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 40

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 41
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 41

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

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 42
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 42

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ile Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 43
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 43

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 44
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 44

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 45
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 45

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Ile Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 46
<211> 113

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 46

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

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Gln Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 47
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 47

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 48
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 48

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Gly Thr Val Lys Leu Leu Val
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ala Glu His Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Phe Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 49
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 49

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

Asp Gln Ala Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 50
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 52
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 53
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr His
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

<210> 54
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Thr
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val His Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 55
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 55

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 56

Thr Asp Asp Ile Asn
1 5

<210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 57

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 58

Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Asp Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 59
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 59

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

Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ser Ser
20 25 30

<210> 60
<211> 5

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 60

Leu Glu Asp Thr Tyr
1 5

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 61

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ala Val Ser Ser
1 5 10

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 62

Ser Asn Asp Ile Asn
1 5

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 63

Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Thr
1 5 10 15

Asp

<210> 64
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 64

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

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

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 65

Val Glu Asp Ser Tyr
1 5

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 66

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 67

Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Glu Glu Phe Thr
1 5 10 15

Asp

<210> 68
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 68

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Ser Ser Thr Ala Phe Met Glu
1 5 10 15

Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ser Ser
20 25 30

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 69

Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Thr Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Thr
1 5 10 15

Asp

<210> 70
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 70

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Val Ser Ser Ser Thr Ala Phe Met Glu
1 5 10 15

Leu His Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ser Ser
20 25 30

<210> 71
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 71

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr
20 25 30

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 72

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 73

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
1 5 10

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 74

Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 75
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 75

Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Arg Thr Pro Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 76

Gly Gly Glu Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 77

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 78
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 78

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr
20 25 30

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 79

Ser Tyr Gly Ile Thr
1 5

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 80

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
1 5 10

<210> 81
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 81

Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Tyr Phe Cys Thr Arg
20 25 30

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 82

Gly Gly Asp Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 83
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 83

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 84

Gly Lys Trp Ile Glu
1 5

<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 85

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 86

Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 87
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 87

Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys Leu Arg
20 25 30

<210> 88
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 88

Ser Glu Asp Val
1

<210> 89
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 89

Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 90
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 90

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

Ser Val Lys Leu Ala Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 91

Gly Tyr Trp Ile Glu
1 5

<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 92

Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 93

Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 94
<211> 32

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 94

Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

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

<210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 95

Ser Ile Asp Tyr
1

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 96

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 97
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 97

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 98
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 98

Ser Tyr Trp Ile Thr
1 5

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 99

Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 100
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 100

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

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 101

Arg Arg Tyr Tyr Ala Thr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 102
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 102

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 103

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 104
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 104

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 105

Arg Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 106
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 106

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Glu Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 107

Asn Tyr Tyr Ile Ser Ser Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 108
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 108

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Gln Ala Phe Tyr Thr Phe Ser Arg
20 25 30

<210> 109
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 109

Arg Val His Phe Ala Ile Arg Asp Thr Asn Tyr Trp Met Gln
1 5 10

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 110

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

Gly

<210> 111
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 111

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 112

Gly Ser His Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 113
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 113

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 114
<211> 5

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 114

Thr Tyr Pro Ile Glu
1 5

<210> 115
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 115

Trp Met Lys Gln Asn His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 116
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 116

Asn Phe His Pro Tyr Asn Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 117
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 117

Lys Ala Thr Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 118

Arg Val Tyr Tyr Ser Tyr Phe Trp Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 119
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 119

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 120
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 120

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 121

Asn Phe His Pro Tyr Asn Gly Asp Ser Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 122
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 122

Lys Ala Thr Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Pro Ser Ala Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 123

Arg His Tyr Ala Ala Ser Pro Trp Phe Ala His
1 5 10

<210> 124
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 124

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr
20 25 30

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 125

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 126
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 126

Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 127

Asp Val Asn Pro Asn Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 128
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 128

Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Ser Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile
20 25 30

<210> 129
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 129

Cys Pro Phe Tyr Tyr Leu Gly Lys Gly Thr His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 130

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 131
<211> 30

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 131

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

Ser Gly Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr
20 25 30

<210> 132
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 132

Asp Tyr Tyr Met Ile
1 5

<210> 133
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 133

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

Gly

<210> 134
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 134

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

Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 135
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 135

Gly Pro Ser Leu Tyr Asp Tyr Asp Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 136
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 136

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

Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 137

Ala Tyr Trp Ile Glu
1 5

<210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 138

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 139
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 139

Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 140
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 140

Ser Tyr Tyr Tyr Ala Ser Arg Trp Phe Ala Phe
1 5 10

<210> 141
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 141

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 142
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 142

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 143
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 143

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 144
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 144

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 145
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 145

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
1 5 10 15

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

<210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 146

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr
1 5

<210> 147
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 147

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 148
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 148

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

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys
20

<210> 149
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 149

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ile Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ser

<210> 150
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 150

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 151
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 151

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
20

<210> 152
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 152

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 153
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 153

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 154
<211> 15

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 154

Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 155

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 156
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 156

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 157

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 158
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 158

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 159
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 159

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 160

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 161
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 161

Lys Gln Ser Tyr Asn Ile Pro Thr
1 5

<210> 162
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 162

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

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 163
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 163

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 164
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 164

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 165
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 165

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 166
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 166

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 167

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 168
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 168

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
20

<210> 169
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 169

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 170
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 170

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 171

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 172
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 172

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 173

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 174

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
1 5 10

<210> 175
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 175

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
20

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 176

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn Val Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 177

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 178
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 178

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 179
<211> 32

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 179

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 180

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 181
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 181

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys
20

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 182

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
1 5 10

<210> 183
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 183

Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys
1 5 10 15

<210> 184
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 184

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 185
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 185

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 186
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 186

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 187
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 187

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Val Thr Cys
20

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 188

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr His Val Ala
1 5 10

<210> 189
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 189

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 190
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 190

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 191
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 191

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Thr Val Ala
1 5 10

<210> 192
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 192

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Val His Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 193
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 193

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 194

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 195
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 195

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

<210> 196
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 196

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 197
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 197

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Gly Thr Val Lys Leu Leu Val Phe
1 5 10 15

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 198

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 199
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 199

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu His Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 200

Gln Gln Gly Phe Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 201

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 202
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 202

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

Asp Gln Ala Ser Phe Ser Cys
20

<210> 203
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 203

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 204
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 204

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 205
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 205

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
20

<210> 206
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 206

Arg Ala Ser Gln Asn Val Gly Pro Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 207
<211> 7

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 207

Ser Ala Ser Tyr Arg Phe Ser
1 5

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 208

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 209
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (1)..(1)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 1 là S hoặc T

<220>
<221> biến thể
<222> (2)..(2)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 2 là N hoặc D

<400> 209

Xaa Xaa Asp Ile Asn
1 5

<210> 210
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (7)..(7)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 7 là G hoặc D

<220>
<221> biến thể
<222> (8)..(8)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 8 là S hoặc T hoặc R

<220>
<221> biến thể
<222> (9)..(9)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 9 là I hoặc T

<220>
<221> biến thể
<222> (13)..(13)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 13 là E hoặc D

<220>
<221> biến thể
<222> (14)..(14)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 14 là K hoặc E

<220>
<221> biến thể
<222> (16)..(16)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 16 là T hoặc K

<400> 210

Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Xaa Xaa Xaa Lys Tyr Asn Xaa Xaa Phe Xaa
1 5 10 15

Asp

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

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (1)..(1)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 1 là L hoặc V

<220>
<221> biến thể
<222> (4)..(4)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 4 là T hoặc S

<400> 211

Xaa Glu Asp Xaa Tyr
1 5

<210> 212
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (8)..(8)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 8 là N hoặc I hoặc Q hoặc A

<220>
<221> biến thể
<222> (9)..(9)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 9 là S hoặc T

<220>
<221> biến thể
<222> (17)..(17)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 17 là A hoặc S

<400> 212

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Xaa Xaa Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Xaa

<210> 213
<211> 5
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (4)..(4)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 4 là M hoặc I

<220>
<221> biến thể
<222> (5)..(5)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 5 là S hoặc T

<400> 213

Ser Tyr Gly Xaa Xaa
1 5

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (3)..(3)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 3 là E hoặc D

<220>
<221> biến thể
<222> (5)..(5)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 5 là M hoặc L

<400> 214

Gly Gly Xaa Ala Xaa Asp Tyr
1 5

<210> 215
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (10)..(10)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 10 là D hoặc E hoặc A

<220>
<221> biến thể
<222> (11)..(11)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 11 là G hoặc A

<220>
<221> biến thể
<222> (16)..(16)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 16 là N hoặc S

<400> 215

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Xaa Xaa Lys Thr Tyr Leu Xaa
1 5 10 15

<210> 216
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (8)..(8)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 8 là W hoặc Y

<400> 216

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Xaa Thr
1 5

<210> 217
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 217
caggtgcagc tgaagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagttg
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca accgacgata taaactgggt gaagcagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatccta gagatgatag aactaagtac
180

aatgacaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcttccaa cacagcgtac
240

atggacctcc acagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgttc aagcctcgag
300

gatacttact ggggccaagg gactctggtc gctgtctctt ca
342

<210> 218
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 218
caggtgcagc tgaagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagttg
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaacgata taaactgggt gaagcagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatccta gagatgggag tattaaatat
180

aatgagaaat tcacggacaa ggccacattg acagttgacg tatcctccag cacagcgtac
240

atggagctcc acagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgttc aggtgtcgag
300

gattcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca
342

<210> 219
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 219

caggtgcagc tgaagcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaattg
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaacgata taaactgggt gaaacagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatccta gagatggtac tactaagtac
180

aatgaggagt tcacggacaa ggccacattg actgttgacg tatcctccag cacagcgttc
240

atggagctcc acagcctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgttc aagtgtcgag
300

gattcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca
342

<210> 220
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 220
caggtgcagc tgaagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagttg
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaacgata taaactgggt gaagcagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatccta gagatggtac tactaagtac
180

aatgagaagt tcacggacaa ggccacattg actgttgacg tatcctccag cacagcgttc
240

atggagctcc acaggctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgttc aagtgtcgag
300

gattcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca
342

<210> 221
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 221
cagatccagt tggtacagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc
60

tcctgcaagg cttctgggta tattttcaca agctatggaa tgagctgggt gagacaggct
120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct actctggagt gccaacatat
180

gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag aactccctat
240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgcgc aagaggggc
300

gaagctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca
348

<210> 222
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 222
cagatccagt tggtacagtc tggacctgag ctgaagacgc caggagagac agtcaagatc
60

tcctgcaagg cttctgggta tatcttcaca tcctatggaa ttacctgggt gaaacaggct
120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct actctggagt gccaacatat
180

gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cgtctgccag cactgcctat
240

ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acgactacat atttctgtac aagaggggt
300

gatgctttgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca
348

<210> 223
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 223
caggtgcagc tgaagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagctt
60

tcctgcaagg ctactggcta cacattcact ggcaagtgga tagagtgggt aaaacagagg
120

cctggacatg gcctagagtg gattggagag attttacctg gaactggtag tactaactac
180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagact catcctccaa cacagcctac
240

atgcaactca gcagcctgac aactgaagac tctgctatgt attattgttt aagatccgag
300

gatgtctggg gcacagggac cacggtcacc gtctcctca
339

<210> 224
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 224
caggtgcagc tgaagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagctt
60

gcctgcaagg ctactggcta cacattcact ggctactgga tagagtggat aaagcagagg
120

cctggacaag gccttgagtg gattggagag atgttacctg gaagtggtag tactcactac
180

aatgagaagt tcaagggtaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac
240

atgcaactca gcggcctgac aactgaggac tctgccatct attactgtgt aagaagcata
300

gactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctca
339

<210> 225
<211> 375
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 225
caggtgcagc tgaagcagtc tgggcctgag ctggcaaggc cttgggcttc agtgaagata
60

tcctgccagg ctttctacac cttttccaga agggtgcact ttgccattag ggataccaac
120

tactggatgc agtgggtaaa acagaggcct ggacagggtc tggaatggat cggggctatt
180

tatcctggaa atggtgatac tagttacaat cagaagttca agggcaaggc cacattgact
240

gcagacaaat cctccagcac agcctacatg caactcagca gcctgacatc tgaggactct
300

gcggtctatt actgtgcatc cggtagccac tactttgact actggggcca aggcaccact
360

ctcacagtct cctca
375

<210> 226
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 226
gaggtccagc tgcaacaatc tgggcctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaggta
60

tcctgtaagg cttctggata cacgctcact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc
120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat gttaatccta acaatgatgg tactacctac
180

aaccagaaat tcaagggcag ggccacattg actgtagaca agtcttccaa cacagcctcc
240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct actactgtgc aatatgcccc
300

ttttattacc tcggtaaagg gacccacttt gactactggg gccaaggcac ctctctcaca
360

gtctcctca
369

<210> 227
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 227
gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agggaagatg
60

tcctgtaagg cttctggata caaattcact gactactata tgatctgggt gaagcagagc
120

catggaaaga gccttgagtg gattggagtt attaaaattt ataacggtgg tacgagctac
180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac
240

atggagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagggcca
300

tctctctatg attacgaccc ttactggtac ttcgatgtct ggggcacagg gaccacggtc
360

accgtctcct ca
372

<210> 228
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 228
caggtgcagc tgaagcagtc tggaactgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaacctt
60

tcctgcaagg cttctggcta cacattcact gcctactgga tagagtgggt aaagcagagg
120

cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtac tactaactac
180

aatgagaact tcaaggacag ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac
240

atgcaactca gcagcctgac aagtgaggac tctgccatct attactgtgc aagatcctat
300

tactacgcta gtagatggtt tgctttctgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca
360

<210> 229
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 229
gaggtccagc tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg
60

tcctgtaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga taacctgggt gaagcagagg
120

cctggacaag gccttgagtg gattggagat atttatcctg gtagtggtag tactaactac
180

aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac
240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaaggaga
300

tactacgcta cggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca
360

<210> 230
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 230
caggtgcagc tgaagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg
60

tcctgcaagg cttctggcta cactttcact gactactata taaactgggt gaagcagagg
120

cctggacagg gacttgagtg gattgcaagg atttatcctg gaagtggtaa tacttactac
180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaaa aatcctccag cactgcctac
240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagaaattac
300

tacattagta gtccctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca
360

<210> 231
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 231
caggtgcagc tgaagcagtc tggggctgag ctagtgacgc ctggagcctc agtgaagatg
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcact acctatccta tagagtggat gaaacagaat
120

catggaaaga gcctagagtg gattggaaat tttcatcctt acaatgatga tactaagtac
180

aatgaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaaa aatcctctaa cacagtctac
240

ttggagctca gccgattaac atctgatgac tctgctgttt atttctgtgc aaggagggtc
300

tactatagtt acttctggtt tggttactgg ggccacggga ctctggtcac tgtctcttca
360

<210> 232
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 232
caggtgcagc tgaagcagtc tggggctgag ctagtgaaac ctggagcctc agtgaagatg
60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcact acctatccta tagagtggat gaagcagaat
120

catgggaaga gcctagagtg gattggaaat tttcatcctt acaatggtga ttctaagtac
180

aatgaaaagt tcaagggcaa ggccaccttg actgtagaaa aatcctctag cacagtctac
240

ttagaactca gccgattacc atctgctgac tctgctattt attactgtgc aaggaggcac
300

tacgctgcta gtccctggtt tgctcactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca
360

<210> 233
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 233
gacattgtga tgacccagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact
60

atgacctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct
120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg
180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt ctctctcacc
240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg
300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg
339

<210> 234
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 234

gacattgtga tgacccagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gagggtcact
60

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc atcagtagaa cccgaaagaa ctatttgtct
120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg
180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagtg tacaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg
300

tacacgttcg gcgggggggac caagctggaa ataaaacgg
339

<210> 235
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 235
gacattgtga tgacccagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact
60

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc atcagtagaa cccgaaagaa ctatttgtct
120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctattgggc atccactagg
180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagtg tacaggctga agacctggca gtttattact gcaaacaatc ttataatctg
300

tacacgttcg gcgggggggac caagctggaa atcaaacgg
339

<210> 236
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 236
gatgttttga tgacccaaac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc
60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg
120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atctggtgtc taaactggac
180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc
240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg
300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg
339

<210> 237
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 237
gatattgtga tgacgcaggc tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc
60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgagttgg
120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atctggtgtc taaactggac
180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc
240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg
300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg
339

<210> 238
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 238
gacattgtga tgacccagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact
60

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct
120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg
180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc
240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatatt
300

ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg
339

<210> 239
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 239
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga acaagcctcc
60

atctcttgca gatcaagtca gagccttgta caaagtaatg gaaacaccta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt
180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct
300

ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg
339

<210> 240
<211> 324
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 240
gacatccagc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt
60

ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca
120

aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc
180

aggtttagtg gcagtggatc agggacagat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct
240

gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggccgtacac gttcggaggg
300

gggaccaagc tggaaataaa acgg
324

<210> 241
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 241
gatatccaga tgacacagac tccagcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc
60

atcagttgta gggcaagtca ggacattagc aatttttaa actggtatca acagaaaccg
120

aatggaactg ttaaactcct agtcttctac acatcaagat tacactcagg agtcccatca
180

aggttcagtg gcagtgggtc tggagcagag cattctctca ccattagcaa cctggagcag
240

gaagatgttg ccacttactt ttgccaacag ggttttacgc ttccgtggac gttcggtggg
300

ggcaccaagg tggaaatcaa acgg
324

<210> 242

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 242
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc
60

ttctcttgca gatctagtca gagccttata cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt
180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg
300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg
339

<210> 243
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 243
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat caataggaga cagggtcagc
60

gtcacctgca gggccagtca gaatgtgggt cccaatttag cctggtatca acagaaacca
120

gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc gattcagtgg agtccctgat
180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct
240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaggt atccattcac gttcggctcg
300

gggacaaagt tggaaataaa acgg
324

<210> 244
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 244
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc
60

atcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca
120

ggacaatctc ctaaactact gatttcctcg gcatccaatc ggtacactgg agtccctgat
180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tatgcagtct
240

gaagacgtgg cagattattt ctgccagcaa tataacagct atcctctcac gttcggtgct
300

gggaccaagc tggagctgaa acgg
324

<210> 245
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 245
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccactt cagtaggaga cagggtcagc
60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt cctaatgtag cctggtatca acagaaacca
120

gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat
180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct
240

gaagacttgg cagactattt ctgtcagcaa tataaccgct atcctctcac gttcggtgct
300

gggaccaaac tggagctgaa acgg
324

<210> 246
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 246
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcaac
60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actcatgtag cctggtatca acagaaacca
120

gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg cgtccctgat
180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct
240

gaagacctgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atcctcgagc gctcacgttc
300

ggtgctggga ccaagctgga gctgaaacgg
330

<210> 247
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 247
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcaac
60

gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt cctactgtag cctggtatca acagaaacca
120

gggcaatctc ctaaagcact aatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat
180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcactct
240

gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccattcac gttcggctcg
300

gggacaaagt tggaaataaa acgg
324

<210> 248
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 248

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 Thr Asp
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Asp Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn 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

Ser Ser Leu Glu Asp Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 249
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 249

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 Thr Asp
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Arg Asp Asp Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn 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

Ser Ser Leu Glu Asp Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 250
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 250

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 251
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 251

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Arg Thr Pro Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 252
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 252

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Arg Thr Pro Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 253
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 253

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 254
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 254

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Lys
20 25 30

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser 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

Leu Arg Ser Glu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 255
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 255

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Lys
20 25 30

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser 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

Leu Arg Ser Glu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 256
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 256

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 257
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 257

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Gln Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 258
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 258

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 259
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 259

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 260
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<220>
<221> biến thể
<222> (8)..(8)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 8 là N hoặc Q hoặc A

<220>
<221> biến thể
<222> (9)..(9)
<223> trong đó Xaa ở vị trí 9 là S hoặc T

<400> 260

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Xaa Xaa Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 261
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 261

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 262
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 262

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Ala Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 263
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 263

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 264
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 264

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
20 25 30

<210> 265
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 265

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 266
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 266

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Ser
20 25 30

<210> 267
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 267

Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Ser
20 25 30

<210> 268
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 268

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 269
<211> 30

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 269

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr
20 25 30

<210> 270
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 270

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Arg Thr Pro Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 271
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 271

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Arg Thr Pro Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 272
<211> 11

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 272

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 273
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 273

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
20 25 30

<210> 274
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 274

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 275
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 275

Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 276
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 276

Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Arg
20 25 30

<210> 277
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 277

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 278
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 278

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 279
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 279

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 280
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 280

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ala Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Ile Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 281
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 281

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 282
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 282

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 283
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 283

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 284
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 284

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 285
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 285

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 286
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 286

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 287
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 287

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 288
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 288
caagtccaac tcgtccagtc cggggccgaa gtcaagaagc cgggagcctc agtgaaagtg
60

tcgtgcaaag cttccggcta caccttcacc accgatgaca ttaactgggt cagacaggcg
120

cccggacagg ggctggaatg gatcggttgg atctaccctc gggacgaccg gactaagtac
180

aacgacaagt tcaaggacaa agcgaccctc accgtcgaca ccagcagcaa cactgcctac
240

atggaactgt catccctgag gagcgaggac actgccgtgt attactgttc gagcctggag
300

gatacctact ggggacaggg cactcttgtg accgtgtcct cc
342

<210> 289
<211> 342
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 289
caagtccaac tcgtccagtc cggggccgaa gtcaagaagc cgggagcctc agtgaaagtg
60

tcgtgcaaag cttccggcta caccttcacc accgatgaca ttaactgggt cagacaggcg
120

cccggacagg ggctggaatg gatcggttgg atctaccctc gggacgaccg gactaagtac
180

aacgacaagt tcaaggacag agcgaccctc accgtcgaca ccagcagcaa cactgcctac
240

atggaactgt catccctgag gagcgaggac actgccgtgt attactgttc gagcctggag
300

gatacctact ggggacaggg cactcttgtg accgtgtcct cc
342

<210> 290
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 290
caaatccagc tggtccagtc cggttccgag ctcaagaagc cgggagcctc agtgaaagtg
60

tcgtgcaagg cctccggtta catcttcacc tcctacggaa tgtcgtgggt ccgccaagca
120

cctggaaagg gccttaagtg gatggggtgg atcaacacct atagcggcgt gcccacttac
180

gccgacgact ttaagggccg gttcgtgttc tccctggata cgtccgtgcg cactccgtac
240

ctccaaatta gcagcctgaa ggccgaagat actgcggtgt acttctgcgc tagaggaggg
300

gaagccatgg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtcgtcc
348

<210> 291
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 291
caaatccagc tggtccagtc cggttccgag ctcaagaagc cgggagcctc agtgaaagtg
60

tcgtgcaagg cctccggtta catcttcacc tcctacggaa tgtcgtgggt ccgccaagca
120

cctggaaagg gccttaagtg gatggggtgg atcaacacct atagcggcgt gcccacttac
180

gccgacgact ttaagggccg gttcgtgttc tccctggata cgtccgtgcg cactccgtac
240

ctccaaatta gcagcctgaa ggccgaagat actgcgacgt acttctgcgc tagaggaggg
300

gaagccatgg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtcgtcc
348

<210> 292
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 292
caagtccaac tcgtgcagtc aggagcagaa gtcaagaagc cgggagcctc cgtgaaagtg
60

tcgtgcaagg cctccggata cactttcacc gggaagtgga ttgaatgggt ccgccaggcg
120

cccggccagg gcctggagtg gatcggagag atcctgcctg gtaccggtag cactaactac
180

gctcagaagt tccagggcag agcgaccttc accgccgact cgagcacctc cactgcgtac
240

atggaactga gctccctgag gtcggaggac accgccgtgt attactgcct ccggtccgaa
300

gatgtctggg gccaggggac cctcgtgact gtgtcatcc
339

<210> 293
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 293

caagtccaac tcgtgcagtc aggagcagaa gtcaagaagc cgggagcctc cgtgaaagtg
60

tcgtgcaagg cctccggata cactttcacc gggaagtgga ttgaatgggt ccgccaggcg
120

cccggccagg gcctggagtg gatcggagag atcctgcctg gtaccggtag cactaactac
180

aacgagaagt tcaagggcag agcgaccttc accgccgact cgagcacctc cactgcgtac
240

atggaactga gctccctgag gtcggaggac accgccgtgt attactgcct ccggtccgaa
300

gatgtctggg gccaggggac cctcgtgact gtgtcatcc
339

<210> 294
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 294
gatattgtca tgacccagtc ccccgattcc cttgctgtct ccctgggcga acgcgcgact
60

attaactgca agagctcaca gtcgctgctg aattcccgga ctcggaagaa ctacctggcc
120

tggtaccagc agaagcctgg gcaaccgccg aagctcttga tctactgggc ctcgactaga
180

gagagcggag tgccagaccg cttctccggt tccggatcag gaaccgactt taccctgacc
240

atctcgagcc tgcaagcaga ggacgtggcc gtgtattact gcaagcagtc ctacaacctc
300

tacacgttcg gccagggcac caaagtggaa atcaagagg
339

<210> 295
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 295
gatatcgtca tgacccaatc ccccgattcc cttgctgtct cactgggaga aagagccacc
60

atcaactgca agagctcgca gtccctgctg gctagcagga ctcgcaagaa ctacctggcc
120

tggtatcagc agaagcccgg acagcctcca aagctcttga tctactgggc ctccactcgg
180

gagtccggcg tgccggaccg gttcagcgga tcaggctccg gtactgactt caccctcacc
240

atttcgtcgc tgcaagcaga ggacgtggcg gtgtactact gcaagcagtc ctacaacatt
300

ccgacgtttg ggcagggcac caaagtggaa atcaagcgc
339

<210> 296
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 296
gacgtgctga tgacccaaac ccccctttcc ctgtccgtga ctcctggaca acccgcgtca
60

atctcctgca agagctcgca gtccctcctc gactccgacg gaaaaaccta cctgaactgg
120

cttttgcaga ggccagggca gagcccgaag cggctgatct acctcgtgtc caagctggac
180

tccggagtgc cggatcgctt ctcgggatca ggctcgggta ccgatttcac gctgaagatc
240

tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtc tactactgtt ggcagggcac tcactttccg
300

tggaccttcg gtcaagggac caaggtcgag attaagagg
339

<210> 297
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 297
gacgtgctga tgacccaaac ccccctttcc ctgtccgtga ctcctggaca acccgcgtca
60

atctcctgca agagctcgca gtccctcctc gactccgacg caaaaaccta cctgaactgg
120

cttttgcaga ggccagggca gagcccgaag cggctgatct acctcgtgtc caagctggac
180

tccggagtgc cggatcgctt ctcgggatca ggctcgggta ccgatttcac gctgaagatc
240

tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtc tactactgtt ggcagggcac tcactttccg
300

tggaccttcg gtcaagggac caaggtcgag attaagagg
339

<210> 298
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 298
gatatcgtca tgacccaatc ccccgattcc cttgctgtct cactgggaga aagagccacc
60

atcaactgca agagctcgca gtccctgctg aatagcagga ctcgcaagaa ctacctggcc
120

tggtatcagc agaagcccgg acagcctcca aagctcttga tctactgggc ctccactcgg
180

gagtccggcg tgccggaccg gttcagcgga tcaggctccg gtactgactt caccctcacc
240

atttcgtcgc tgcaagcaga ggacgtggcg gtgtactact gcaagcagtc ctacaacatt
300

ccgacgtttg ggcagggcac caaagtggaa atcaagcgc
339

<210> 299
<211> 339
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 299
gatattgtca tgacccagtc ccccgattcc cttgctgtct ccctgggcga acgcgcgact
60

attaactgca agagctcaca gtcgctgctg gcttcccgga ctcggaagaa ctacctggcc
120

tggtaccagc agaagcctgg gcaaccgccg aagctcttga tctactgggc ctcgactaga
180

gagagcggag tgccagaccg cttctccggt tccggatcag gaaccgactt taccctgacc
240

atctcgagcc tgcaagcaga ggacgtggcc gtgtattact gcaagcagtc ctacaacctc
300

tacacgttcg gccagggcac caaagtggaa atcaagagg
339

<210> 300
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 300

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

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Asp Asp Asp Gly Ser Gly Thr Arg Tyr Ala Pro Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Leu Arg
65 70 75 80

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

Thr Lys Cys Ala Tyr Ser Ser Gly Cys Asp Tyr Glu Gly Gly Tyr Ile
100 105 110

Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 301
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 301

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

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Gly Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35 40 45

Ala Gly Ile Arg Ser Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Ala Thr Ala Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Ser Gly Asn Val Gly Asp Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr
100 105 110

Glu Val Ile Val Ser Ser
115

<210> 302
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 302

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

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gln Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Arg Phe Gly Asn Ser Thr Gly His Gly Ala Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Val Tyr Gly Tyr Cys Gly Ser Tyr Ser Cys Cys Gly Val
100 105 110

Asp Thr Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 303
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 303

Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Leu Gly Gly Thr Val

1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Val Ile
35 40 45

Tyr Asp Asn Asp Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 304
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 304

Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr
20 25 30

Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg

65 70 75 80

Ala Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly
85 90 95

Ala Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 305
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 305

Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 306
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 306

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

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Gly Ile Tyr Lys Ser Gly Ala Gly Thr Asn Tyr Ala Pro Ala Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Thr Thr Gly Ser Gly Cys Ser Ser Gly Tyr Arg Ala Glu Tyr
100 105 110

Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 307
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 307

Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 308
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 308

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

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
35 40 45

Ala Gly Ile Ser Arg Asn Asp Gly Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ser Ala
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Asp Ala Gly Gly Ser Ala Tyr Trp Phe Asp Ala Gly Gln
100 105 110

Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

<210> 309
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 309

Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Asn Pro Gly Glu Thr Val
1 5 10 15

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr
20 25 30

Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Asn Asn Lys Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala
65 70 75 80

Asp Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Asn Ser Gly Ala
85 90 95

Ala Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 310
<211> 327
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 310

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 311
<211> 327
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 311

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 312
<211> 327
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 312

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 313
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 313

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105