



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

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



1-0041493

(51)<sup>7</sup> C07K 16/28; A61K 39/00; A61P 25/28 (13) B

- 
- (21) 1-2019-07308 (22) 08/06/2018  
(86) PCT/EP2018/065107 08/06/2018 (87) WO 2018/224630 13/12/2018  
(30) 17175122.5 09/06/2017 EP  
(45) 25/10/2024 439 (43) 25/03/2020 384ASC  
(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)  
Binger Strasse 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, Germany  
(72) HERRMANN, Rolf (DE); BAKKER, Remko, Alexander (NL); BANDHOLTZ,  
Sebastian (DE); BENZ, Peter, Michael (DE); DZIEGELEWSKI, Michael (US);  
FLORIN, Lore (DE); KENNY, Cynthia, Hess (US); LOW, Sarah (US);  
ROSENBROCK, Holger (DE); SINGH, Sanjaya (US); STAHL, Heiko, Friedrich  
(DE); VENKATARAMANI, Sathyadevi (US); VOYNOV, Vladimir (US); XIAO,  
Haiguang (US).  
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
- 

- (54) KHÁNG THỂ KHÁNG TRKB, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ  
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ  
(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng TrkB chủ vận, dược phẩm chứa kháng thể  
này và phương pháp sản xuất kháng thể.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập chung đến các kháng thể kháng TrkB chủ vận để sử dụng trong chẩn đoán và điều trị và đặc biệt là các kháng thể kháng TrkB chủ vận được làm giống như của người. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng TrkB chủ vận và phương pháp sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau. Sáng chế còn đề cập đến được phẩm và kit chứa kháng thể kháng TrkB chủ vận.

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

Kinaza thụ thể tropomyosin B (Tropomyosin receptor kinase B-TrkB), còn được gọi là kinaza thụ thể tyrosin B, hoặc thụ thể yếu tố tăng trưởng BDNF/NT-3 hoặc tyrosin kinaza dưỡng thần kinh, thụ thể, typ 2, là protein ở người được mã hóa bởi gen NTRK2 (Genbank ID: 4915). TrkB là thụ thể đối với yếu tố dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (brain-derived neurotrophic factor - BDNF).

Thụ thể tyrosin kinaza dưỡng thần kinh B (TrkB; ký hiệu gen: NTRK2) được biểu hiện bởi các tế bào thần kinh võng mạc và tế bào thần kinh đệm. Ở võng mạc bình thường, tín hiệu TrkB chống lại sự căng thẳng của tế bào và thúc đẩy sự sống của tế bào. Ở mắt bị bệnh, như bệnh võng mạc do đái tháo đường hoặc thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính, sự mất và suy giảm chức năng của các tế bào thần kinh võng mạc và tế bào thần kinh đệm xảy ra gây suy giảm thị lực và mất thị lực. Việc hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu TrkB trên mức cơ bản (mức này bị giảm trong bệnh võng mạc do đái tháo đường) có thể chống lại sự mất và suy giảm chức năng của tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm, do đó cải thiện chức năng thị giác. Hơn nữa, sự hoạt hóa TrkB có khả năng tái tạo các kết nối synap bị mất ở mắt bị bệnh, do đó thúc đẩy sự phục hồi chức năng thị giác. Nhờ sự liên kết phối tử, TrkB trải qua quá trình homodimer hóa, sau đó là quá trình tự phosphoryl hóa. Tùy thuộc vào các vị trí phosphoryl hóa (Y516, Y702, Y706, Y707 hoặc Y817), các con đường dẫn truyền tín hiệu khác nhau được hoạt hóa, bao gồm hoạt động của PLC $\gamma$ 1 hoặc các phân dạng khác nhau của AKT và ERK để điều hòa các tầng tín hiệu chồng chéo khác nhau tạo ra sự tăng cường tín hiệu của axon/sợi trục, làm tăng tính dẻo của synap, hoặc làm tăng tỷ lệ sống của tế bào.

Các kháng thể kháng TrkB chủ vận đã được mô tả trong US20100196390 và US20100150914 cũng như ứng dụng được đề xuất của chúng trong điều trị bệnh Charcot-Marie-Tooth hoặc bệnh đái tháo đường chẳng hạn.

Tuy nhiên, vẫn còn nhu cầu đáng kể đối với các kháng thể kháng TrkB chủ vận tiềm năng mới có thể được sử dụng để hoạt hóa con đường TrkB và do đó cho phép sử dụng chúng trong các can thiệp điều trị đối với các rối loạn thoái hóa thần kinh và tâm thần.

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

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu với TrkB người. Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế có hoạt tính chủ vận và gây ra quá trình phosphoryl hóa và/hoặc hoạt hóa TrkB. Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế là hữu ích, ví dụ để điều trị các bệnh về mắt hoặc võng mạc như, thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính thứ phát do thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác, bệnh võng mạc do đái tháo đường, bệnh tăng nhãn áp và/hoặc phù hoàng điểm do đái tháo đường.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB, đặc biệt là kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người, có một hoặc nhiều đặc tính được mô tả dưới đây.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gắn kết với TrkB người với ái lực cao. Theo một phương án liên quan đến khía cạnh này, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gắn kết với TrkB người với  $KD < 10$  nM. Theo một phương án khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gắn kết với TrkB người với  $KD < 5$  nM.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế hoạt hóa TrkB với hiệu lực cao. Theo một phương án liên quan đến khía cạnh này, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế hoạt hóa TrkB người với  $EC_{50} < 100$  pM. Theo một phương án khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế hoạt hóa TrkB người với  $EC_{50} < 50$  pM.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế là hữu hiệu hơn trong việc gây ra sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu xuôi dòng TrkB so với phối tử TrkB tự nhiên, BDNF. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế

điều hòa sự biểu hiện gen thông qua các con đường truyền tín hiệu qua trung gian TrkB theo mô hình tương đương với BDNF.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gắn kết epitop mới trong miền ngoại bào của TrkB người. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế không phản ứng chéo với TrkB từ các loài khác, đặc biệt là không phản ứng chéo với TrkB của loài gặm nhấm.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế có thể được bào chế với nồng độ cao để tiêm trong dịch kính vào mắt.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế có nguy cơ gây miễn dịch thấp như được xác định bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 5.

Theo một khía cạnh khác, các trình tự CDR của kháng thể kháng TrkB theo sáng chế có gánh nặng trình tự thấp như được xác định bằng phương pháp được mô tả trong ví dụ 4.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế không làm giảm sự phosphoryl hóa ERK do BDNF gây ra.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế là đặc hiệu đối với sự phosphoryl hóa và/hoặc hoạt hóa TrkB và không phosphoryl hóa/hoạt hóa TrkA hoặc TrkC một cách không đặc hiệu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế không gắn kết không đặc hiệu với VEGF người.

Các khía cạnh khác bao gồm (các) phân tử polynucleotit mã hóa các kháng thể theo sáng chế, các vectơ biểu hiện và các vectơ virus cũng như các tế bào chủ bao gồm (các) phân tử polynucleotit như vậy, và các phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất các ứng dụng điều trị đối với kháng thể theo sáng chế, đặc biệt là cho các bệnh võng mạc/mắt.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 12, tương ứng,

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 13, tương ứng,

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 14, tương ứng,

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 15, tương ứng,

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 16, tương ứng,

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 17, tương ứng,

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 18, tương ứng,

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 19, tương ứng, hoặc

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 20, tương ứng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 hoặc 23,

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 hoặc 26,

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28 hoặc 29,

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31 hoặc 32,

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 34 hoặc 35,

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 hoặc 38,

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 40 hoặc 41,

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 hoặc 44, hoặc

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46 hoặc 47.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng TrkB là kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng để sử dụng trong y học.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng dùng để điều trị các bệnh vồng mạc hoặc mắt.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng dùng để điều trị các bệnh vồng mạc hoặc mắt do thần kinh/tế bào thần kinh.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng dùng để điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng dùng để điều trị bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi tác hoặc bệnh võng mạc do đái tháo đường.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và chất mang dược dụng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng hoặc dược phẩm chứa kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được sử dụng bằng ngoài đường tiêu hóa, đường trong tĩnh mạch, đường trong dịch kính hoặc đường dưới da.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector biểu hiện bao gồm polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector virus bao gồm polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm vector biểu hiện hoặc polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và chuỗi

nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm các bước:

thu được tế bào chủ bao gồm vector biểu hiện hoặc polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng; và nuôi cấy tế bào chủ.

Theo một phương án, phương pháp sản xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng còn bao gồm bước thu hồi và tinh chế kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin 92-112, 130-143 và/hoặc 205-219 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin 92-112 và 130-143; hoặc 92-112 và 205-219; hoặc 130-143 và 205-219; hoặc 92-112 và 130-143 và 205-219 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong tổ hợp bất kỳ nêu trên và ngoài ra còn gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin 313-330 và/hoặc 348-367 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 và 348-367 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 thể hiện sự lập bản đồ epitop của BDNF, kháng thể 277, các kháng thể C2 hoặc C20 đối với miền ngoại bào của TrkB người.

FIG.2 thể hiện số liệu biểu hiện qPCR (trục y) đối với các gen được điều hòa (trục x) về tính dẻo của synap trong các tế bào SH-SY5Y sau khi xử lý bằng BDNF, kháng thể IgG1 (kháng 2,4,6-trinitrophenyl, kháng TNP) đối chứng hoặc kháng thể D003.

FIG.3 thể hiện đồ thị nồng độ của kháng thể 277 trong khoang mắt như được chỉ định và huyết tương sau khi tiêm trong dịch kính 1 mg kháng thể 277 vào mắt thỏ dưới dạng hàm theo thời gian.

FIG.4 thể hiện PK mắt được tính toán của kháng thể IgG1. Trục y thể hiện nồng độ trong dịch kính và trục x thể hiện số ngày sau khi sử dụng trong dịch kính. Thời gian sau khi tiêm trong dịch kính để đạt được nồng độ trong dịch kính tương đương với  $EC_{50}$  được chỉ ra bởi các đường mũi tên.

FIG.5 thể hiện tổng quan nghiên cứu bao gồm các nhóm động vật và khoảng thời gian. Vào tuần thứ 5, đánh giá ERG đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) được thực hiện để đánh giá mức độ rối loạn chức năng tế bào thần kinh do chứng tăng đường huyết gây ra ở võng mạc. Nhóm 1 và nhóm 2 đã được tiêm trong dịch kính kháng thể IgG1 đối chứng kháng 2,4,6-trinitrophenyl (kháng TNP) mà không gây ra bất kỳ ảnh hưởng nào đến chức năng võng mạc. Các mắt thuộc nhóm 3 được điều trị bằng C2 (kháng thể kháng TrkB chủ vận đại diện). Chức năng võng mạc được đánh giá một lần nữa vào tuần thứ 7 (sau khi sử dụng trong dịch kính).

FIG.6 thể hiện sự thay đổi thời gian ẩn sáng b được gây ra bởi tế bào hình que so với thời gian ẩn trung bình của nhóm đối chứng, tại đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) và 1 tuần sau khi sử dụng trong dịch kính (xem FIG.5 về tổng quan nghiên cứu). Nhóm đối chứng không đái tháo đường 1 (màu đen, n = 23 mắt được nghiên cứu) và nhóm bị tăng đường huyết 2 (nhiều chấm, n = 21 mắt được nghiên cứu) đã được tiêm trong dịch kính với IgG1 đối chứng. Nhóm 3 được tiêm trong dịch kính với C2 (n=24 mắt được nghiên cứu). Số liệu là trung bình + SEM. ns, không đáng kể; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; sự chênh lệch trước khi tiêm giữa các nhóm

bị tăng đường huyết 2 và 3 và nhóm đối chứng 1 là đáng kể (số liệu thống kê được bỏ qua cho rõ ràng; ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey).

FIG.7 thể hiện độ nhạy sáng, S, của các sóng b được gây ra bởi tế bào hình que được chuẩn hóa thành độ nhạy sáng trung bình của nhóm đối chứng,  $S_{\text{đối chứng}}$ , tại đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) hoặc 1 tuần sau khi sử dụng trong dịch kính (xem FIG.5 để biết tổng quan về nghiên cứu). Nhóm đối chứng không đái tháo đường 1 (màu đen,  $n = 23$  mắt được nghiên cứu) và nhóm bị tăng đường huyết 2 (màu đỏ,  $n = 20$  mắt được nghiên cứu) đã được tiêm trong dịch kính với IgG1 đối chứng. Nhóm 3 được tiêm trong dịch kính với C2 ( $n=24$  mắt được nghiên cứu). Số liệu là trung bình + SEM. ns, không đáng kể; \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ; \*\*\*,  $p<0,001$ ; sự chênh lệch trước khi tiêm trong dịch kính giữa các nhóm bị tăng đường huyết 2 và 3 và nhóm đối chứng 1 là đáng kể (số liệu thống kê được bỏ qua cho rõ ràng; ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey).

FIG.8 thể hiện các đáp ứng của sóng a được gây ra bởi tế bào hình que được gây ra bởi tia sáng  $0,1 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ , R, được chuẩn hóa thành đáp ứng trung bình của nhóm đối chứng, tại đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) hoặc 1 tuần sau khi sử dụng trong dịch kính (xem FIG.5 để biết tổng quan về nghiên cứu). Nhóm đối chứng không đái tháo đường 1 (màu đen,  $n = 23$  mắt được nghiên cứu) và nhóm bị tăng đường huyết 2 (màu đỏ,  $n = 20$  mắt được nghiên cứu) đã được tiêm trong dịch kính với IgG1 đối chứng. Nhóm 3 được tiêm trong dịch kính với C2 ( $n=24$  mắt được nghiên cứu). Số liệu là trung bình + SEM. ns, không đáng kể; \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ; \*\*\*,  $p<0,001$ ; sự chênh lệch trước khi tiêm trong dịch kính giữa các nhóm bị tăng đường huyết 2 và 3 và nhóm đối chứng 1 là đáng kể (số liệu thống kê được bỏ qua cho rõ ràng; ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey).

FIG.9 thể hiện sự thay đổi thời gian ẩn sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV so với thời gian ẩn trung bình của nhóm đối chứng, tại đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) và 1 tuần sau khi sử dụng trong dịch kính (xem FIG.5 về tổng quan nghiên cứu). Nhóm đối chứng không đái tháo đường 1 (màu đen,  $n = 24$  mắt được nghiên cứu) và nhóm bị tăng đường huyết 2 (màu đỏ,  $n = 22$  mắt được nghiên cứu) đã được tiêm trong dịch kính với IgG1 đối chứng. Nhóm 3 được tiêm trong dịch kính với C2 ( $n=24$  mắt được nghiên cứu). Số liệu là trung bình + SEM. ns, không đáng

kê; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; sự chênh lệch trước khi tiêm trong dịch kính giữa các nhóm bị tăng đường huyết 2 và 3 và nhóm đối chứng 1 là đáng kể (số liệu thống kê được bỏ qua cho rõ ràng; ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey).

FIG.10 thể hiện sự thay đổi thời gian ẩn sáng b được gây ra bởi tế bào hình nón M so với thời gian ẩn trung bình của nhóm đối chứng, tại đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) và 1 tuần sau khi sử dụng trong dịch kính (xem FIG.5 về tổng quan nghiên cứu). Nhóm đối chứng không đái tháo đường 1 (màu đen,  $n = 24$  mắt được nghiên cứu) và nhóm bị tăng đường huyết 2 (màu đỏ,  $n = 22$  mắt được nghiên cứu) đã được tiêm trong dịch kính với IgG1 đối chứng. Nhóm 3 được tiêm trong dịch kính với C2 ( $n=24$  mắt được nghiên cứu). Số liệu là trung bình + SEM. ns, không đáng kể; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; sự chênh lệch trước khi tiêm trong dịch kính giữa các nhóm bị tăng đường huyết 2 và 3 và nhóm đối chứng 1 là đáng kể (số liệu thống kê được bỏ qua cho rõ ràng; ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey).

FIG.11 thể hiện độ nhạy sáng, S, của các sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV được chuẩn hóa thành độ nhạy sáng trung bình của nhóm đối chứng,  $S_{\text{đối chứng}}$ , tại đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) hoặc 1 tuần sau khi sử dụng trong dịch kính (xem FIG.5 để biết tổng quan về nghiên cứu). Nhóm đối chứng không đái tháo đường 1 (màu đen,  $n = 22$  mắt được nghiên cứu) và nhóm bị tăng đường huyết 2 (màu đỏ,  $n = 22$  mắt được nghiên cứu) đã được tiêm trong dịch kính với IgG1 đối chứng. Nhóm 3 được tiêm trong dịch kính với C2 ( $n=21$  mắt được nghiên cứu). Số liệu là trung bình + SEM. ns, không đáng kể; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; sự chênh lệch trước khi tiêm trong dịch kính giữa các nhóm bị tăng đường huyết 2 và 3 và nhóm đối chứng 1 là đáng kể (số liệu thống kê được bỏ qua cho rõ ràng; ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey).

FIG.12 thể hiện biên độ đáp ứng bão hòa,  $R_{\text{max}}$ , của sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón M được chuẩn hóa thành biên độ đáp ứng bão hòa trung bình của các đối chứng,  $R_{\text{max}}$ , đối chứng, tại đường cơ sở (trước khi sử dụng trong dịch kính) hoặc 1 tuần sau khi sử dụng trong dịch kính (xem FIG.5 để biết tổng quan về nghiên cứu). Nhóm đối chứng không đái tháo đường 1 (màu đen,  $n = 24$  mắt được nghiên cứu) và

nhóm bị tăng đường huyết 2 (màu đỏ,  $n = 22$  mắt được nghiên cứu) đã được tiêm trong dịch kính với IgG1 đối chứng. Nhóm 3 được tiêm trong dịch kính với C2 ( $n=24$  mắt được nghiên cứu). Số liệu là trung bình  $\pm$  SEM. ns, không đáng kể; \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ; \*\*\*,  $p<0,001$ ; sự chênh lệch trước khi tiêm trong dịch kính giữa các nhóm bị tăng đường huyết 2 và 3 và nhóm đối chứng 1 là đáng kể (số liệu thống kê được bỏ qua cho rõ ràng; ANOVA một chiều với thử nghiệm so sánh nhiều lần Tukey).

FIG.13 thể hiện sự phosphoryl hóa ERK trong các tế bào CHO biểu hiện thụ thể TrkB người sau khi kích thích với (A) BDNF, kháng thể 277, hoặc tổ hợp của BDNF 1 nM với các nồng độ tăng của kháng thể 277 hoặc (B) BDNF, kháng thể C2, hoặc tổ hợp của BDNF 1 nM với các nồng độ tăng của kháng thể C2. Số liệu (các ký hiệu) được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  SEM (đối với một số điểm, các thanh sai số ngắn hơn chiều cao của ký hiệu); các đường kết nối phản ánh hồi quy phi tuyến tính (log (chất chủ vận) so với đáp ứng (ba tham số)). Một thử nghiệm đại diện gồm một dãy gồm ba lô tế bào độc lập được hiển thị; n.s., sự khác biệt không đáng kể giữa một mình BDNF 1nM và BDNF 1nM với các nồng độ kháng thể 277 được chỉ định. # $p < 0,001$  một mình BDNF 1nM so với BDNF 1 nM với các nồng độ kháng thể C2 được chỉ định; ANOVA một chiều với nhiều thử nghiệm so sánh.

FIG.14 thể hiện sự gắn kết của kháng thể 277 hoặc kháng thể C2 với VEGF người hoặc chuột trong thử nghiệm ELISA in vitro. Số liệu (các ký hiệu) được biểu thị dưới dạng trung bình  $\pm$  SEM (lưu ý: các thanh sai số ngắn hơn chiều cao của ký hiệu); các đường kết nối phản ánh hồi quy phi tuyến tính (log(chất chủ vận) so với đáp ứng (ba tham số)). Một thử nghiệm đại diện của một dãy gồm năm thử nghiệm độc lập được hiển thị. # $p<0,01$  hVEGF-C2 so với hVEGF-Isotyp IgG1 ở các nồng độ được chỉ định (thử nghiệm t không ghép cặp).

### Mô tả chi tiết sáng chế

#### Các định nghĩa

Cấu trúc tổng quát của kháng thể hoặc globulin miễn dịch được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, các phân tử này là các glycoprotein heterotetrame, thường là khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ (L) giống hệt nhau và hai chuỗi nặng (H) giống hệt nhau. Mỗi chuỗi nhẹ được liên kết cộng hóa trị với một chuỗi nặng bởi một liên kết disulfua để tạo thành heterodime, và phân tử

heterotrimer được hình thành thông qua liên kết cộng hóa trị disulfua giữa hai chuỗi nặng giống hệt nhau của các heterodimer. Mặc dù các chuỗi nhẹ và nặng được liên kết với nhau bằng một liên kết disulfua, song số lượng các liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng thay đổi bởi isotyp globulin miễn dịch. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các cầu disulfua nội chuỗi cách đều nhau. Mỗi chuỗi nặng có tại đầu amin một miền biến đổi (VH = chuỗi nặng biến đổi), theo sau là ba hoặc bốn miền không đổi (CH1, CH2, CH3, và CH4), cũng như một vùng bản lề giữa CH1 và CH2. Mỗi chuỗi nhẹ có hai miền, một miền biến đổi đầu amin (VL = chuỗi nhẹ biến đổi) và một miền không đổi đầu carboxy (CL). Miền VL liên kết không cộng hóa trị với miền VH, trong khi miền CL thường được liên kết cộng hóa trị với miền CH1 thông qua liên kết disulfua. Các gốc axit amin đặc biệt được cho là tạo ra giao diện giữa các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

Các miền nhất định nằm trong các miền biến đổi khác nhau rất nhiều giữa các kháng thể khác nhau, tức là "siêu biến đổi". Các miền siêu biến đổi này chứa các gốc có liên quan trực tiếp đến sự gắn kết và tính đặc hiệu của mỗi kháng thể cụ thể đối với yếu tố quyết định kháng nguyên đặc hiệu của nó. Khả năng siêu biến đổi, cả ở miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, tập trung ở ba đoạn được gọi là các vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining region-CDR) hoặc các vòng siêu biến đổi (hypervariable loop-HVL). Các CDR được xác định bởi sự so sánh trình tự trong Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., trong khi các HVL có cấu trúc được xác định theo cấu trúc ba chiều của miền biến đổi, như được mô tả bởi Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917. Khi hai phương pháp này dẫn đến việc xác định CDR hơi khác nhau, định nghĩa cấu trúc được ưu tiên. Theo định nghĩa của Kabat, CDR-L1 được định vị ở khoảng các gốc 24-34, CDR-L2, ở khoảng các gốc 50-56, và CDR-L3, ở khoảng các gốc 89-97 trong miền biến đổi của chuỗi nhẹ; CDR-H1 được định vị ở khoảng các gốc 31-35, CDR-H2 ở khoảng các gốc 50-65, và CDR-H3 ở khoảng các gốc 95-102 trong miền biến đổi của chuỗi nặng. Do đó, CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ xác định các đặc tính chức năng và duy nhất đặc hiệu đối với một kháng thể nhất định.

Ba CDR trong mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được phân tách bằng các vùng khung (framework region-FR), chứa các chuỗi có xu hướng ít biến đổi. Từ đầu amin

đến đầu carboxy của miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các FR và CDR được sắp xếp theo thứ tự: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Cấu hình phần lớn dải  $\beta$  của các FR mang các CDR nằm trong mỗi chuỗi đến gần nhau cũng như gần với các CDR từ chuỗi khác. Cấu hình thu được góp phần vào vị trí gắn kết kháng nguyên (xem Kabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669), mặc dù không phải tất cả các gốc CDR nhất thiết phải liên quan trực tiếp đến sự gắn kết kháng nguyên.

Các gốc FR và miền không đổi Ig không liên quan trực tiếp đến sự gắn kết kháng nguyên, nhưng góp phần vào sự gắn kết kháng nguyên và/hoặc gián tiếp đến chức năng tác động của kháng thể. Một số gốc FR được cho là có ảnh hưởng đáng kể đến sự gắn kết kháng nguyên theo ít nhất ba cách: bằng cách gắn kết trực tiếp không cộng hóa trị với epitop, bằng cách tương tác với một hoặc nhiều gốc CDR, và bằng cách ảnh hưởng đến giao diện giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các miền không đổi không liên quan trực tiếp đến sự gắn kết kháng nguyên mà làm trung gian cho các chức năng tác động Ig khác nhau, như sự tham gia của kháng thể trong tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity-ADCC), tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity-CDC) và sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular phagocytosis-ADCP).

Các chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch của động vật có xương sống được chia thành một trong số hai loại khác nhau rõ rệt, kappa ("κ") và lambda ("λ"), dựa trên trình tự axit amin vùng không đổi. Để so sánh, các chuỗi nặng của globulin miễn dịch của động vật có vú được chia thành một trong năm nhóm chính, theo trình tự của các miền không đổi: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM. IgG và IgA còn được chia thành các nhóm phụ (isotyp), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2, tương ứng. Các miền không đổi của chuỗi nặng tương ứng với các loại globulin miễn dịch khác nhau được gọi là  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  và  $\mu$ , tương ứng. Các cấu trúc dưới đơn vị và cấu hình ba chiều của các nhóm globulin miễn dịch tự nhiên đã được biết rõ.

Các thuật ngữ "kháng thể", "kháng thể kháng TrkB", "kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người", và "kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người dạng biến thể" được sử dụng ở đây theo nghĩa rộng nhất và đặc biệt bao gồm các kháng thể đơn dòng (bao gồm cả kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ), các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép), các kháng thể có các cải biến nhỏ

như cắt cụt đầu N hoặc C và các đoạn kháng thể như miền biến đổi và các phần khác của kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn, ví dụ, gắn kết TrkB.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” (mAb) dùng để chỉ kháng thể gồm quần thể các kháng thể gần như đồng nhất; tức là, các kháng thể riêng rẽ trong quần thể đó là giống hệt nhau ngoại trừ các thể đột biến có thể có trong tự nhiên có thể có mặt với lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng là đặc hiệu cao, được định hướng kháng lại một yếu tố quyết định kháng nguyên đơn lẻ, một “epitop”. Do đó, yếu tố cải biến “đơn dòng” là biểu hiện của quần thể kháng thể gần như đồng nhất được định hướng đến epitop giống hệt nhau và không được hiểu là yêu cầu sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Cần phải hiểu rằng các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bởi kỹ thuật hoặc hệ phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này; bao gồm, ví dụ: phương pháp lai (Kohler et al., 1975, *Nature* 256:495), hoặc phương pháp ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567), hoặc các phương pháp phân lập đơn dòng tái tổ hợp được tạo ra bằng các thư viện kháng thể thể thực khuẩn, bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624-628, và Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

Các kháng thể khảm bao gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một kháng thể từ một loài (ví dụ, động vật có vú không phải người như chuột) và các vùng không đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một loài khác (ví dụ, người) và có thể thu được bằng cách liên kết các trình tự ADN mã hóa các vùng biến đổi của kháng thể từ loài đầu tiên (ví dụ, chuột) sang trình tự ADN cho các vùng không đổi của kháng thể từ loài thứ hai (ví dụ, người) và biến đổi vật chủ với vector biểu hiện chứa các trình tự liên kết để cho phép nó tạo thành kháng thể khảm. Ngoài ra, kháng thể khảm cũng có thể là kháng thể trong đó một hoặc nhiều vùng hoặc miền của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống hệt nhau, đồng nhất với, hoặc là một biến thể của trình tự tương ứng trong một kháng thể đơn dòng từ một nhóm hoặc một isotyp globulin miễn dịch khác, hoặc từ một trình tự liên ứng hoặc trình tự dòng mầm. Các kháng thể khảm có thể bao gồm các đoạn của các kháng thể như vậy, với điều kiện là đoạn kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn của kháng thể bố mẹ của nó, ví dụ như liên kết với cùng một epitop (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

Các thuật ngữ, "đoạn kháng thể", "đoạn gắn kết kháng nguyên", "đoạn kháng thể kháng TrkB", "đoạn kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người", "đoạn kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người dạng biến thể" đề cập đến một phần của kháng thể kháng TrkB chiều dài đầy đủ, trong đó một vùng biến đổi hoặc khả năng hoạt động được giữ lại, ví dụ, sự gắn kết epitop TrkB đặc hiệu. Ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đoạn Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv và scFv-Fc, diabody, kháng thể thẳng, kháng thể chuỗi đơn, minibody, diabody được tạo thành từ các đoạn kháng thể, và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể.

Kháng thể chiều dài đầy đủ có thể được xử lý bằng các enzym như papain hoặc pepsin để tạo ra các đoạn kháng thể hữu ích. Sự phân giải bằng papain được sử dụng để tạo thành hai đoạn kháng thể gắn kết kháng nguyên giống nhau được gọi là các đoạn Fab, mỗi đoạn có một vị trí gắn kết kháng nguyên duy nhất, và một đoạn Fc còn lại. Đoạn Fab còn chứa miền không đổi của chuỗi nhẹ và miền CH1 của chuỗi nặng. Xử lý bằng pepsin tạo ra đoạn F(ab')<sub>2</sub> mà có hai vị trí gắn kết kháng nguyên và vẫn có khả năng liên kết ngang với kháng nguyên.

Các đoạn Fab' khác với các đoạn Fab bởi sự có mặt của các gốc bổ sung bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề kháng thể tại đầu tận cùng C của miền CH1. Các đoạn kháng thể F(ab')<sub>2</sub> là các cặp đoạn Fab' được liên kết bởi các gốc xystein trong vùng bản lề. Các cách kết hợp hóa học khác giữa các đoạn kháng thể cũng đã biết.

Đoạn "Fv" chứa vị trí nhận biết kháng nguyên và gắn kết kháng nguyên trọn vẹn gồm dime của một miền biến đổi của chuỗi nặng và một miền biến đổi của chuỗi nhẹ kết hợp chặt chẽ, không đồng hóa trị. Ở cấu hình này, ba CDR của mỗi miền biến đổi tương tác để định ra vị trí gắn kết kháng nguyên trên bề mặt của dime VH-VL. Nói chung, sáu CDR tạo ra tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên cho kháng thể.

Đoạn kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" là biến thể Fv chuỗi đơn bao gồm các miền VH và VL của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Fv chuỗi đơn có khả năng nhận biết và gắn kết kháng nguyên. Polypeptit scFv cũng có thể tùy ý chứa một liên kết polypeptit được định vị giữa các miền VH và VL để tạo điều kiện hình thành cấu trúc ba chiều mong muốn cho sự gắn

kết kháng nguyên bởi scFv (xem, ví dụ, Pluckthun, 1994, In *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315).

Các đoạn kháng thể được nhận biết khác bao gồm các đoạn gồm một cặp đoạn Fd nối tiếp (VH-CH1-VH-CH1) để tạo thành một cặp vùng gắn kết kháng nguyên. "Các kháng thể thẳng" này có thể là đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu đơn như được mô tả trong, ví dụ, Zapata et al. 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062.

Kháng thể được làm giống như của người hoặc đoạn kháng thể được làm giống như của người là một loại kháng thể khảm đặc hiệu bao gồm một biến thể trình tự axit amin globulin miễn dịch, hoặc đoạn của chúng, có khả năng gắn kết với một kháng nguyên được xác định trước và bao gồm một hoặc nhiều FR gần như có trình tự axit amin của globulin miễn dịch của người và một hoặc nhiều CDR gần như có trình tự axit amin của globulin miễn dịch không phải của người. Trình tự axit amin không phải của người này thường được gọi là trình tự "nhập khẩu" thường được lấy từ miền kháng thể "nhập khẩu", đặc biệt là miền biến đổi. Nói chung, kháng thể được làm giống như của người bao gồm ít nhất là CDR hoặc HVL của kháng thể không phải người, được chèn vào giữa các FR của miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của người.

Sáng chế mô tả các kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người chứa các CDR có nguồn gốc từ đoạn dẫn đầu D003 của chuột được chèn vào giữa các FR của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của trình tự dòng mầm của người. Cần phải hiểu rằng các gốc FR chuột nhất định có thể là quan trọng đối với chức năng của các kháng thể được làm giống như của người và do đó, một số gốc của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của trình tự dòng mầm của người được cải biến để giống như các gốc của trình tự của chuột tương ứng.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người về cơ bản là bao gồm ít nhất một, và điển hình là hai, miền biến đổi (như có trong, ví dụ, các đoạn Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, và Fv) trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người, và cụ thể ở đây, các CDR là các trình tự của đoạn dẫn đầu D003 của chuột, và các FR là các FR của trình tự liên ứng hoặc dòng mầm globulin miễn dịch của người. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người còn

bao gồm ít nhất một phần của vùng Fc globulin miễn dịch, điển hình là một phần của vùng Fc globulin miễn dịch của người. Thông thường, kháng thể sẽ chứa cả chuỗi nhẹ cũng như ít nhất là miền biến đổi của chuỗi nặng. Kháng thể này còn có thể bao gồm một hoặc nhiều vùng CH1, bản lề, CH2, CH3, và/hoặc CH4 của chuỗi nặng, nếu thích hợp.

Kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người có thể được chọn từ nhóm bất kỳ trong số các globulin miễn dịch, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và isotyp bất kỳ, bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2. Ví dụ, miền không đổi có thể là miền không đổi cố định hỗ trợ trong đó mong muốn rằng kháng thể được làm giống như của người thể hiện hoạt tính gây độc tế bào, và isotyp điển hình là IgG1. Khi hoạt tính gây độc tế bào là không mong muốn, miền không đổi có thể thuộc isotyp khác, ví dụ, IgG2. Kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người theo cách khác có thể bao gồm các trình tự từ nhiều hơn một nhóm globulin miễn dịch hoặc isotyp, và việc lựa chọn các miền không đổi cụ thể để tối ưu hóa các chức năng tác động mong muốn nằm trong hiểu biết của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể là các kháng thể IgG1 và đặc biệt hơn, là các kháng thể IgG1 trong đó có sự loại bỏ các chức năng tác động.

Các FR và CDR, hoặc HVL, của kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người không cần tương ứng chính xác với các trình tự bố mẹ. Ví dụ, một hoặc nhiều gốc trong CDR nhập khẩu, hoặc HVL, hoặc trình tự FR liên ứng hoặc dòng mầm có thể được thay đổi (ví dụ, bị đột biến) bằng cách thay thế, chèn hoặc xóa bỏ sao cho gốc axit amin thu được không còn giống với gốc ban đầu ở vị trí tương ứng trong trình tự bố mẹ nhưng tuy nhiên kháng thể vẫn giữ chức năng gắn kết với TrkB. Thay đổi như vậy thường sẽ không rộng và sẽ là những thay đổi bảo toàn. Thông thường, ít nhất 75% các gốc của kháng thể được làm giống như của người sẽ tương ứng với các gốc của các trình tự CDR nhập khẩu và FR liên ứng hoặc dòng mầm của bố mẹ, thông thường hơn là ít nhất 90%, và thông thường nhất là lớn hơn 95%, hoặc lớn hơn 98% hoặc lớn hơn 99%.

Các gốc globulin miễn dịch ảnh hưởng đến giao diện giữa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ("giao diện VL-VH") là các gốc ảnh hưởng đến sự tiếp cận hoặc định hướng của hai chuỗi đối với nhau. Các gốc nhất định có thể liên quan

đến sự tương tác liên chuỗi bao gồm các gốc VL 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, và 98 và các gốc VH 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100, và 103 (sử dụng hệ đánh số được nêu trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). Patent Mỹ số 6,407,213 cũng thảo luận rằng các gốc như các gốc VL 43 và 85, và các gốc VH 43 và 60 cũng có thể liên quan đến sự tương tác này. Trong khi các gốc này chỉ được chỉ định cho IgG người, song chúng có thể được áp dụng trên các loài. Các gốc kháng thể quan trọng được mong đợi một cách hợp lý có liên quan đến tương tác liên chuỗi được chọn để thay thế vào trình tự liên ứng.

Các thuật ngữ "trình tự liên ứng" và "kháng thể liên ứng" dùng để chỉ trình tự axit amin bao gồm gốc axit amin tồn tại thường xuyên nhất ở mỗi vị trí trong tất cả các globulin miễn dịch thuộc loại, isotyp, hoặc cấu trúc dưới đơn vị cụ thể bất kỳ, ví dụ, miễn biến đổi của globulin miễn dịch của người. Trình tự liên ứng có thể dựa trên globulin miễn dịch của một loài cụ thể hoặc của nhiều loài. Trình tự, cấu trúc hoặc kháng thể "liên ứng" được hiểu là bao gồm trình tự liên ứng của người như được mô tả trong các phương án nhất định, và để chỉ trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin tồn tại thường xuyên nhất ở mỗi vị trí trong tất cả các globulin miễn dịch người thuộc loại, isotyp, hoặc cấu trúc dưới đơn vị cụ thể bất kỳ. Do đó, trình tự liên ứng chứa trình tự axit amin có ở mỗi vị trí một axit amin có mặt trong một hoặc nhiều globulin miễn dịch đã biết, nhưng có thể không nhân đôi chính xác toàn bộ trình tự axit amin của globulin miễn dịch riêng lẻ bất kỳ. Trình tự liên ứng vùng biến đổi không thu được từ globulin miễn dịch hoặc kháng thể được sản xuất tự nhiên bất kỳ. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., và các biến thể của chúng. Các FR của trình tự liên ứng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và các biến thể của chúng, tạo ra các trình tự hữu ích cho việc điều chế các kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người. Ví dụ, xem patent Mỹ số 6,037,454 và 6,054,297.

Các trình tự dòng mầm của người được thấy trong tự nhiên ở quần thể người. Tổ hợp của các gen dòng mầm đó tạo thành tính đa dạng kháng thể. Các trình tự kháng thể dòng mầm cho chuỗi nhẹ của kháng thể đến từ gen j và gen v kappa hoặc lambda dòng mầm được bảo toàn của người. Tương tự, các trình tự chuỗi nặng đến từ các gen

v, d và j dòng mầm (LeFranc, M-P, and LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể đã được nhận dạng và tách và/hoặc thu hồi từ thành phần trong môi trường tự nhiên của nó. Các thành phần nhiễm tạp trong môi trường tự nhiên của kháng thể là các vật liệu mà có thể cản trở việc ứng dụng trong chẩn đoán hoặc điều trị của kháng thể, và có thể là các enzym, hormon, hoặc các chất hòa tan có bản chất protein hoặc không protein. Theo một khía cạnh, kháng thể sẽ được tinh chế để phân lập ít nhất là trên 95% khối lượng của kháng thể.

Kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể ở vị trí bình thường trong các tế bào tái tổ hợp trong đó nó được tạo ra, khi ít nhất một thành phần trong môi trường tự nhiên của kháng thể này không có mặt. Tuy nhiên, thông thường, kháng thể được phân lập sẽ được điều chế bằng ít nhất một bước tinh chế trong đó vật liệu tế bào tái tổ hợp được loại bỏ.

Thuật ngữ "hiệu suất kháng thể" dùng để chỉ các yếu tố/đặc tính góp phần nhận biết kháng thể của kháng nguyên hoặc hiệu quả của kháng thể in vivo. Sự thay đổi trình tự axit amin của kháng thể có thể ảnh hưởng đến các đặc tính của kháng thể như gấp nếp, và có thể ảnh hưởng đến các yếu tố vật lý như tốc độ ban đầu của sự gắn kết kháng thể với kháng nguyên (ka), hằng số phân ly của kháng thể từ kháng nguyên (kd), hằng số ái lực của kháng thể cho kháng nguyên (Kd), cấu tạo của kháng thể, tính ổn định của protein, và thời gian bán hủy của kháng thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đồng nhất" hoặc "phần trăm đồng nhất", trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit nucleic hoặc polypeptit, đề cập đến hai hoặc nhiều trình tự hoặc phân trình tự là giống nhau hoặc có mức phần trăm đã định các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống nhau, khi được so sánh và sắp xếp thẳng hàng để có sự tương ứng tối đa. Để xác định phần trăm đồng nhất, các trình tự được sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào trong trình tự của trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ nhất để sắp xếp thẳng hàng tối ưu với trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ hai). Các gốc axit amin hoặc các nucleotit tại các vị trí axit amin hoặc các vị trí nucleotit tương ứng sau đó được so sánh. Khi một vị trí trong trình tự thứ nhất được chiếm chỗ bởi gốc axit amin hoặc nucleotit giống như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, thì các phân tử là đồng

nhất tại vị trí đó. Phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự là hàm số của số lượng vị trí đồng nhất chia đều cho các trình tự (tức là, % đồng nhất = số lượng vị trí đồng nhất/tổng số lượng các vị trí (ví dụ, các vị trí chồng chập) $\times 100$ ). Theo một số phương án, hai trình tự mà được so sánh là có độ dài giống nhau sau khi các khoảng trống được đưa vào trong các trình tự này, nếu thích hợp (ví dụ, ngoại trừ trình tự bổ sung kéo dài vượt qua các trình tự được so sánh). Ví dụ, nếu các trình tự vùng biến đổi được so sánh, các trình tự dẫn đầu và/hoặc các trình tự của miền cố định không được xem xét. Đối với việc so sánh trình tự giữa hai trình tự, CDR “tương ứng” đề cập đến CDR ở vị trí giống nhau trong cả hai trình tự (ví dụ, CDR-H1 của mỗi trình tự).

Việc xác định phần trăm đồng nhất hoặc phần trăm tương tự giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán toán học. Ví dụ không giới hạn, được ưu tiên về thuật toán toán học được sử dụng để so sánh hai trình tự là thuật toán của Karlin và Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, được cải biến như trong bài viết của Karlin và Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Thuật toán này được kết hợp vào các chương trình NBLAST và XBLAST của Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Các tra cứu nucleotit BLAST có thể được thực hiện với chương trình NBLAST, điểm ghi=100, độ dài từ=12, để thu được các trình tự nucleotit đồng nhất với axit nucleic mã hóa protein cần quan tâm. Các tra cứu protein BLAST có thể được thực hiện với chương trình XBLAST, điểm ghi = 50, độ dài từ = 3, để thu được các trình tự axit amin đồng nhất với protein cần quan tâm. Để thu được sự sắp xếp thẳng hàng có chỗ trống nhằm các mục đích so sánh, chương trình Gapped BLAST có thể được sử dụng như được mô tả trong tài liệu của Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Theo cách khác, PSI-Blast có thể được sử dụng để thực hiện việc tra cứu lặp để phát hiện các mối quan hệ xa cách giữa các phân tử (Id.). Khi sử dụng các chương trình BLAST, Gapped BLAST, và PSI-Blast, các thông số đặt trước của các chương trình tương ứng (ví dụ, XBLAST và NBLAST) có thể được sử dụng. Ví dụ không giới hạn, được ưu tiên về thuật toán toán học được sử dụng để so sánh các trình tự là thuật toán của Myers và Miller, CABIOS (1989). Thuật toán này được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0) mà là một phần của gói phần mềm sắp xếp thẳng hàng trình tự GCG. Khi sử dụng chương trình ALIGN để so sánh các trình tự axit amin, bảng gốc khối lượng PAM120, mức phạt độ dài khoảng trống là 12, và mức phạt khoảng trống là 4 có thể được sử dụng. Các thuật

toán bổ sung để phân tích trình tự đã được biết đến trong lĩnh vực này và bao gồm ADVANCE và ADAM như được mô tả trong Torellis and Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; và FASTA được mô tả trong Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. Trong FASTA, ktup là lựa chọn đối chứng, lựa chọn này cài đặt độ nhạy và tốc độ của việc tra cứu. Nếu ktup=2, các vùng tương tự trong hai trình tự được so sánh được phát hiện bằng cách nhìn vào các cặp gốc được sắp xếp thẳng hàng; nếu ktup=1, các axit amin đơn được sắp xếp thẳng hàng được kiểm tra. ktup có thể được cài đặt bằng 2 hoặc 1 đối với các trình tự protein, hoặc từ 1 đến 6 đối với các trình tự ADN. Nếu ktup không được quy định thì chế độ tự động là 2 đối với các protein và 6 đối với ADN. Theo cách khác, sự sắp xếp thẳng hàng trình tự protein có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán CLUSTAL W, như được mô tả bởi Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

Trình tự axit nucleic là "được liên kết theo kiểu hoạt động được" khi nó được đặt trong mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, một tiền trình tự axit nucleic hoặc trình tự dẫn đầu để tiết được liên kết theo kiểu hoạt động được với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu nó được biểu hiện ở dạng tiền protein tham gia vào việc tiết polypeptit; trình tự khởi đầu hoặc trình tự tăng cường được liên kết theo kiểu hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của trình tự; hoặc vị trí gắn kết ribosom được liên kết theo kiểu hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó được định vị để tạo điều kiện cho việc dịch mã. Nói chung, "được liên kết theo kiểu hoạt động được" có nghĩa là các trình tự ADN được liên kết là tiếp giáp nhau, và trong trường hợp trình tự dẫn đầu để tiết, là tiếp giáp nhau và trong khung đọc. Tuy nhiên, các trình tự tăng cường tùy ý tiếp giáp nhau. Liên kết có thể được thực hiện bằng cách thất tại các vị trí giới hạn thuận tiện. Nếu các vị trí này không tồn tại, trình tự liên kết hoặc tiếp hợp oligonucleotit tổng hợp có thể được sử dụng.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "tế bào", "dòng tế bào", và "môi trường nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các thuật ngữ như vậy bao gồm cả thể hệ sau của chúng. Do đó, "thể biến nạp" và "tế bào được biến nạp" bao gồm tế bào đối tượng sơ cấp và môi trường nuôi cấy có nguồn gốc từ đó mà không quan tâm đến số lần chuyển nhiễm.

Thuật ngữ “động vật có vú” đối với các mục đích điều trị chỉ động vật được phân loại vào động vật có vú, bao gồm người, động vật nuôi trong nhà và ở trang trại, và động vật trong vườn thú, động vật thể thao, hoặc thú nuôi, như chó, ngựa, mèo, bò, và các động vật tương tự. Tốt hơn, nếu động vật có vú là người.

"Rối loạn", như được sử dụng ở đây, là tình trạng bệnh bất kỳ có lợi khi điều trị bằng kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người được mô tả trong tài liệu này. Rối loạn bao gồm rối loạn hoặc bệnh mạn tính và cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh lý mà làm cho động vật có vú mắc rối loạn bị nghi ngờ. Các ví dụ hoặc các rối loạn không giới hạn được điều trị ở đây bao gồm các rối loạn về mắt hoặc võng mạc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "rối loạn liên quan đến TrkB" hoặc "bệnh liên quan đến TrkB" dùng để chỉ tình trạng trong đó sự cải biến hoặc hoạt hóa các tế bào biểu hiện TrkB được chỉ định. Rối loạn liên quan đến TrkB bao gồm các bệnh và rối loạn như thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng mạn tính tiến triển, bệnh võng mạc do đái tháo đường, phù hoàng điểm do đái tháo đường, viêm võng mạc sắc tố, loạn dưỡng võng mạc do di truyền, loạn dưỡng điểm vàng do di truyền, bệnh thoái hóa do cận thị, tắc tĩnh mạch võng mạc, tắc động mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng bồ đào, phù hoàng điểm, màng tân mạch màng mạch thứ phát đối với bệnh võng mạc bất kỳ, bệnh thần kinh thị giác, bệnh tăng nhãn áp, bong võng mạc, bệnh võng mạc do nhiễm độc, bệnh võng mạc do phóng xạ và bệnh lý võng mạc do chấn thương cũng như bệnh Alzheimer tiền triệu chứng và nhẹ đến trung bình, làm chậm tiến triển bệnh của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer, bệnh Huntington, bệnh Parkinson, rối loạn trầm cảm chính, bệnh tâm thần phân liệt, suy giảm nhận thức liên quan đến bệnh tâm thần phân liệt, phòng ngừa rối loạn tâm thần giai đoạn đầu ở những người mắc hội chứng rối loạn tâm thần suy giảm, phòng ngừa tái phát ở bệnh nhân tâm thần phân liệt, trầm cảm kháng trị, và các bệnh chuyển hóa như ăn nhiều, béo phì hoặc hội chứng chuyển hóa.

Thuật ngữ “tiêm trong dịch kính” có ý nghĩa bình thường của nó trong lĩnh vực này và dùng để chỉ việc đưa kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng vào dịch kính của bệnh nhân.

Thuật ngữ "sử dụng dưới da" dùng để chỉ việc đưa kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng vào dưới da của động vật hoặc bệnh nhân người, ưu tiên trong túi nằm giữa da và mô bên dưới, bằng cách phân phối tương đối chậm, duy trì từ đồ chứa thuốc. Véo hoặc kéo da lên và ra khỏi mô bên dưới có thể tạo ra túi này.

Thuật ngữ "truyền dưới da" dùng để chỉ việc đưa thuốc vào dưới da của động vật hoặc bệnh nhân người, tốt hơn là trong túi nằm giữa da và mô bên dưới, bằng cách phân phối tương đối chậm, duy trì từ đồ chứa thuốc trong một khoảng thời gian bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 30 phút hoặc ít hơn, hoặc 90 phút hoặc ít hơn. Tùy chọn, việc truyền có thể được thực hiện bằng cách cấy dưới da một bơm phân phối thuốc được cấy dưới da của động vật hoặc bệnh nhân người, trong đó bơm này phân phối một lượng thuốc được xác định trước trong một khoảng thời gian xác định trước, như 30 phút, 90 phút, hoặc một khoảng thời gian kéo dài thời gian của phác đồ điều trị.

Thuật ngữ "tiêm liều cao (bolus) dưới da" dùng để chỉ việc sử dụng thuốc dưới da của động vật hoặc bệnh nhân người, trong đó việc phân phối thuốc tiêm liều cao là ít hơn khoảng 15 phút; theo một khía cạnh khác, ít hơn 5 phút, và theo một khía cạnh khác nữa, ít hơn 60 giây. Theo một khía cạnh khác nữa, việc sử dụng là trong túi nằm giữa da và mô bên dưới, nơi túi có thể được tạo ra bằng cách véo hoặc kéo da lên và ra khỏi mô bên dưới.

Thuật ngữ "lượng có hiệu lực điều trị" được sử dụng để chỉ lượng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng mà sẽ làm giảm hoặc giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn được điều trị. Đó là lượng mà có kết quả có lợi cho bệnh nhân. Theo một khía cạnh, lượng có hiệu lực điều trị có tác dụng bảo vệ thần kinh hoặc phục hồi thần kinh. Theo một khía cạnh khác, lượng có hiệu lực điều trị đề cập đến nồng độ trong huyết thanh đích đã được chứng minh là có hiệu quả, ví dụ, trong việc làm chậm tiến triển bệnh. Hiệu quả có thể được xác định theo những cách thông thường, tùy thuộc vào tình trạng được điều trị. Ví dụ, trong các bệnh hoặc các rối loạn về mắt/võng mạc đặc trưng bởi các tế bào biểu hiện TrkB, hiệu quả có thể được xác định bằng cách xác định tỷ lệ đáp ứng, ví dụ, phục hồi thị lực hoặc bằng cách đánh giá thời gian trì hoãn cho đến khi bệnh tiến triển.

Các thuật ngữ "điều trị" và "trị liệu" và tương tự, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là bao gồm các biện pháp điều trị cũng như phòng ngừa, hoặc các biện pháp ức chế đối với bệnh hoặc rối loạn dẫn đến tác dụng lâm sàng mong muốn hoặc có lợi bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở việc giảm bớt hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng, sự thoái lui, làm chậm hoặc chấm dứt tiến triển của bệnh hoặc rối loạn. Do đó, ví dụ, thuật ngữ điều trị bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng trước hoặc sau khi khởi phát triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn do đó phòng ngừa hoặc loại bỏ một hoặc nhiều dấu hiệu của bệnh hoặc rối loạn. Một ví dụ khác, thuật ngữ này bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng sau khi có biểu hiện lâm sàng của bệnh để chống lại các triệu chứng của bệnh. Hơn nữa, việc sử dụng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng sau khi khởi phát và sau khi các triệu chứng lâm sàng đã phát triển trong đó việc sử dụng ảnh hưởng đến các thông số lâm sàng của bệnh hoặc rối loạn, như mức độ tổn thương mô hoặc số lượng hoặc mức độ di căn, cho dù việc điều trị có dẫn đến cải thiện bệnh hay không, bao gồm "điều trị" hoặc "trị liệu" như được sử dụng ở đây. Ngoài ra, miễn là các chế phẩm của sáng chế ở dạng riêng lẻ hoặc kết hợp với tác nhân điều trị khác làm giảm bớt hoặc cải thiện ít nhất một triệu chứng của rối loạn được điều trị so với triệu chứng đó khi không sử dụng chế phẩm kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng, kết quả nên được coi là điều trị hiệu quả rối loạn cơ bản bất kể tất cả các triệu chứng của rối loạn có giảm bớt hay không.

Thuật ngữ "tờ rời trong bao gói" được sử dụng để chỉ hướng dẫn thường được bao gồm trong các gói sản phẩm điều trị trên thị trường, có chứa thông tin về chỉ định, cách sử dụng, đường dùng, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo về việc sử dụng các sản phẩm điều trị đó.

#### Kháng thể

Được mô tả và được bộc lộ ở đây là các kháng thể kháng TrkB, đặc biệt là các kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người cũng như chế phẩm và các vật phẩm để sản xuất bao gồm các kháng thể kháng TrkB theo sáng chế. Cũng được mô tả là các đoạn gắn kết kháng nguyên của kháng thể kháng TrkB. Các kháng thể kháng TrkB và các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng để điều trị

nhiều bệnh hoặc rối loạn được đặc trưng bởi hoạt động của con đường TrkB giảm. Kháng thể kháng TrkB và đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mỗi loại bao gồm ít nhất một phần mà nhận biết đặc hiệu epitop TrkB.

Trong đặc tính ban đầu, đoạn dẫn đầu D003 của chuột kháng TrkB được chọn dựa vào hiệu suất kháng thể vượt trội của nó. Thư viện gồm các biến thể được tạo ra bằng cách thay thế các CDR của đoạn dẫn đầu của chuột vào các FR của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên ứng của người và ngoài ra bằng cách thao tác di truyền các FR với các thay thế khác nhau.

Điều này dẫn đến các trình tự biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm giống như của người khác nhau như được thể hiện dưới đây:

Các trình tự VL

D003\_VL (đoạn dẫn đầu của chuột), chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO: 1

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ  
SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCQQYYSY  
TFGGGTKLEIK

277-gr\_VL, (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO: 2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ  
PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSY  
TFGQGTKLEIK

277-33\_VL: (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

3

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP  
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSY  
PTFGGGGTKLEIK

277-35\_VL: (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

4

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP  
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSY  
PTFGGGGTKLEIK

277-42\_VL, (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

5

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ  
PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSSYPY  
TFGGGTKLEIK

277-44\_VL, (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

6

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ  
SPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSSYPY  
TFGQGTKLEIK

277-48\_VL, (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

7

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ  
PPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSSYPY  
TFGQGTKLEIK

277-51\_VL, (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

8

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP  
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSSYPYT  
FGGGGTKLEIK

277-64\_VL, (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

9

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQP  
PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSSYPYT  
FGQGTKLEIK

277-67\_VL, (được làm giống như của người) chuỗi nhẹ biến đổi, SEQ ID NO:

10

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ  
 SPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPY  
TFGQGTKLEIK

Các trình tự VH

D003\_VH, (đoạn dẫn đầu của chuột) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO: 11

QVQLVQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTGYWMHWVKQRPGQGLE  
 WIGYINPSTDYTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARS  
RTGNYWGQGTTTLTVSS

277-gr\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:  
 12

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLE  
 WMGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR  
SRTGNYWGQGTTLTVSS

277-33\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:  
 13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLE  
 WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLTSEDTAVYYCARS  
RTGNYWGQGTTLTVSS

277-35\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:  
 14

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLE  
 WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARS  
RTGNYWGQGTTLTVSS

277-42\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:  
 15

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLE  
 WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARS  
RTGNYWGQGTTLTVSS

277-44\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:

16

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLE  
WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLTSED<sup>1</sup>AVYYCARS  
RTGNYWGQGTTVTVSS

277-48\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:

17

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRP<sup>1</sup>GQGLE  
WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED<sup>1</sup>AVYYCARS  
RTGNYWGQGTTVTVSS

277-51\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:

18

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQRP<sup>1</sup>GQGLE  
WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRATL<sup>1</sup>TRDTSTSTVYMELSSLRSED<sup>1</sup>AVYYCARS  
RTGNYWGQGTTVTVSS

277-64\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:

19

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLE  
WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED<sup>1</sup>AVYYCARS  
RTGNYWGQGTTVTVSS

277-67\_VH, (được làm giống như của người) chuỗi nặng biến đổi, SEQ ID NO:

20

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWMHWVRQAPGQGLE  
WIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED<sup>1</sup>AVYYCARS  
RTGNYWGQGTTVTVSS

Các trình tự được gạch chân tương ứng với các vùng CDR của các vùng chuỗi nhẹ và chuỗi nặng biến đổi.

Các kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người theo sáng chế là các kháng thể có các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được nêu trong bảng dưới đây. Các đột biến IgG1-KO đã được tạo ra bằng cách đưa hai đột biến vào vùng Fc, Leu232Ala và Leu233Ala để làm giảm chức năng tác động.

Bảng 1:

| Kháng thể                    | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | SEQ ID NO: |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 277-gr (Chuỗi nhẹ, IgG1)     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK<br>NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS<br>GSGTDFLTITSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQ<br>GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                         | 21         |
| 277-gr (Chuỗi nặng, IgG1)    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQAPGQGLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRV<br>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSTRGN<br>YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 22         |
| 277-gr (Chuỗi nặng, IgG1-KO) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQAPGQGLEWMGYINPSTDYTEYNQKFKDRV<br>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSTRGN<br>YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 23         |
| 277-33<br>(Chuỗi nhẹ, IgG1)  | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK<br>NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS<br>GSGTDFLTITSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGG<br>GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                         | 24         |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 277-33<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br><u>HWVRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVT</u><br>LTRDTSTSTVYMELSSLTSED <del>A</del> VYYCAR <u>SRTGNY</u><br>WGQGT <del>T</del> TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVT <del>V</del> SWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSV <del>V</del> TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDS <del>D</del> GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 25 |
| 277-33<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br><u>HWVRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVT</u><br>LTRDTSTSTVYMELSSLTSED <del>A</del> VYYCAR <u>SRTGNY</u><br>WGQGT <del>T</del> TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVT <del>V</del> SWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSV <del>V</del> TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDS <del>D</del> GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 26 |
| 277-35<br>(Chuỗi nhẹ,<br>IgG1)     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK<br><u>NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV</u> PDRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSY <del>P</del> YTFGG<br>GTKLEIKRTVAAPS <del>V</del> FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 27 |
| 277-35<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br><u>HWVRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVT</u><br>LTRDTSTSTVYMELSSLRSED <del>A</del> VYYCAR <u>SRTGNY</u><br>WGQGT <del>T</del> TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVT <del>V</del> SWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSV <del>V</del> TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDS <del>D</del> GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 28 |
| 277-35<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br><u>HWVRQRPQGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVT</u><br>LTRDTSTSTVYMELSSLRSED <del>A</del> VYYCAR <u>SRTGNY</u><br>WGQGT <del>T</del> TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVT <del>V</del> SWNSGALTSGVHTFPAVLQSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 29 |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                                    | GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                   |    |
| 277-42<br>(Chuỗi nhẹ,<br>IgG1)     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK<br>NYLA WYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGG<br>GTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                       | 30 |
| 277-42<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVT<br>LTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTGNY<br>WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 31 |
| 277-42<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRVT<br>LTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSTGNY<br>WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 32 |
| 277-44<br>(Chuỗi nhẹ,<br>IgG1)     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK<br>NYLA WYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFSGS<br>GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGG<br>GTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                       | 33 |
| 277-44<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRV<br>TMTRDTSTSTVYMELSSLTSEDVAVYYCARSTGN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 34 |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IgG1)                              | <p><u>YWGQGT</u>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br/> LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br/> SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br/> KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK<br/> DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br/> VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br/> EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br/> SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br/> NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br/> SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>                                                                                                                                                          |    |
| 277-44<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | <p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM</u><br/> <u>HWVRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKF</u><u>KDRV</u><br/> TMTRDTSTSTVYMELSSLTSED<del>TA</del>VYYCARSRTGN<br/> <u>YWGQGT</u>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br/> LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br/> SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD<br/> KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK<br/> DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br/> VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br/> EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br/> SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br/> NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<br/> SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p> | 35 |
| 277-48<br>(Chuỗi nhẹ,<br>IgG1)     | <p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK<br/> <u>NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV</u><u>PDRFSGS</u><br/> GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQ<br/> GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br/> NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br/> TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br/> KSFNRGEC</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 36 |
| 277-48<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | <p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM</u><br/> <u>HWVRQRP</u><u>GQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKF</u><u>KDRVT</u><br/> MTRDTSTSTVYMELSSLRSED<del>TA</del>VYYCARSRTGN<br/> WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br/> GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br/> GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br/> RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT<br/> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br/> HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br/> YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br/> REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br/> NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br/> CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>  | 37 |
| 277-48<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | <p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM</u><br/> <u>HWVRQRP</u><u>GQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKF</u><u>KDRVT</u><br/> MTRDTSTSTVYMELSSLRSED<del>TA</del>VYYCARSRTGN<br/> WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br/> GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br/> GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br/> RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD<br/> TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV</p>                                                                                                                                                                                                  | 38 |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                                    | HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
| 277-51<br>(Chuỗi nhẹ,<br>IgG1)     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK<br>NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS<br>GSGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGG<br>GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                        | 39 |
| 277-51<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRAT<br>LTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSRTGNY<br>WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 40 |
| 277-51<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRAT<br>LTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSRTGNY<br>WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS<br>GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<br>RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS<br>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 41 |
| 277-64<br>(Chuỗi nhẹ,<br>IgG1)     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLYSSNQK<br>NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS<br>GSGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGQ<br>GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                        | 42 |
| 277-64<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM<br>HWVRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRV<br>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARSRTGN<br>YWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA<br>LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD                                                                                                                                                                                                                                                                      | 43 |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                                    | KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
| 277-64<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM</u><br><u>HWVRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRV</u><br><u>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAR</u> <u>SRTGN</u><br><u>YWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u><br><u>LGCLVKDYFPEP</u> <u>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS</u><br><u>SGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u><br>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 44 |
| 277-67<br>(Chuỗi nhẹ,<br>IgG1)     | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQK<br>NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS<br>GSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQ<br>GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS<br>TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 45 |
| 277-67<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1)    | <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM</u><br><u>HWVRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRV</u><br><u>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAR</u> <u>SRTGN</u><br><u>YWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u><br><u>LGCLVKDYFPEP</u> <u>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS</u><br><u>SGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u><br>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE<br>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 46 |
| 277-67<br>(Chuỗi nặng,<br>IgG1-KO) | <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYWM</u><br><u>HWVRQAPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKDRV</u><br><u>TMTRDTSTSTVYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAR</u> <u>SRTGN</u><br><u>YWGQGT</u> <u>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA</u><br><u>LGCLVKDYFPEP</u> <u>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS</u><br><u>SGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</u><br>KRVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE                                                                                                                                                                                        | 47 |

|                         |                                                                                                                                                                                      |    |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                         | VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |    |
| 277 L-CDR1              | <b><u>KSSOSLLYSSNOKNYLA</u></b>                                                                                                                                                      | 48 |
| 277 L-CDR2              | <b><u>WASTRES</u></b>                                                                                                                                                                | 49 |
| 277 L-CDR3              | <b><u>QQYYSYPYT</u></b>                                                                                                                                                              | 50 |
| 277 H-CDR1<br>(CCG)     | <b><u>GYTFTGYWMH</u></b>                                                                                                                                                             | 51 |
| 277 H-CDR2<br>(CCG)     | <b><u>YINPSTDYTEYNQKFKD</u></b>                                                                                                                                                      | 52 |
| 277 H-CDR3<br>(CCG)     | <b><u>SRTGNY</u></b>                                                                                                                                                                 | 53 |
| 277 H-CDR1<br>(Kabat)   | <b>GYWMH</b>                                                                                                                                                                         | 55 |
| 277 H-CDR2<br>(Kabat)   | <b>YINPSTDYTEYNQKFKD</b>                                                                                                                                                             | 56 |
| 277 H-CDR3<br>(Kabat)   | <b>SRTGNY</b>                                                                                                                                                                        | 57 |
| 277 H-CDR1<br>(Chothia) | <i>GYTFTGY</i>                                                                                                                                                                       | 58 |
| 277 H-CDR2<br>(Chothia) | <i>NPSTDY</i>                                                                                                                                                                        | 59 |
| 277 H-CDR3<br>(Chothia) | <i>SRTGNY</i>                                                                                                                                                                        | 60 |

Các CDR nêu trên theo cách đánh số của nhóm tính toán hóa học (Chemical Computing Group-CCG) được gạch chân (Almagro et al., Proteins 2011; 79:3050-

3066 và Maier et al, Proteins 2014; 82:1599-1610). Việc đánh số Kabat đối với các trình tự được biểu thị bằng ký tự in đậm và hệ đánh số Chothia bằng ký tự in nghiêng.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gắn kết với TrkB người với  $KD < 10$  nM. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gắn kết với TrkB người với  $KD < 5$  nM. Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gắn kết với TrkB người với  $KD$  khoảng 1 nM. Ái lực gắn kết của kháng thể kháng TrkB có thể được xác định theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 6.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gây ra sự phosphoryl hóa và/hoặc hoạt hóa TrkB với hiệu lực cao. Theo một khía cạnh, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế phosphoryl hóa TrkB người với  $EC_{50} < 100$  pM. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế phosphoryl hóa TrkB người với  $EC_{50} < 50$  pM. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế phosphoryl hóa TrkB người với  $EC_{50} < 40$  pM. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế phosphoryl hóa TrkB người với  $EC_{50} < 30$  pM. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế phosphoryl hóa TrkB người với  $EC_{50}$  khoảng 20 pM.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế là hữu hiệu hơn trong việc gây ra sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu xuôi dòng TrkB so với BDNF phối tử TrkB tự nhiên. Hiệu quả của các kháng thể kháng TrkB có thể được xác định ở các tế bào SH-SY5Y đã biệt hóa theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 8.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế gây ra sự biểu hiện gen tương đương với BDNF phối tử TrkB tự nhiên. Kích thích với kháng thể kháng TrkB chủ vận làm tăng sự biểu hiện mRNA của ARC, VGF, EGR1 là các dấu hiệu cho tính dẻo synap tăng và do đó các chỉ số cho thấy kháng thể kháng TrkB hoạt động giống như BDNF phối tử tự nhiên trong việc điều hòa chức năng tế bào thần kinh, tức là làm tăng khả năng sống sót của tế bào thần kinh và/hoặc tính dẻo synap. Mô hình biểu hiện gen có thể được xác định theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 10.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế bảo vệ tế bào thần kinh, tế bào thần kinh đệm và/hoặc đơn vị thần kinh mạch trong võng mạc

của bệnh nhân mắc, ví dụ, thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi, thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính hoặc bệnh võng mạc do đái tháo đường bằng cách kích thích các con đường truyền tín hiệu sống sót phụ thuộc TrkB và do đó đem lại sự bảo vệ thần kinh.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế tái tạo các axon/sợi nhánh và/hoặc các synap ở võng mạc sau khi phát bệnh trong, ví dụ, bệnh thoái hóa điểm vàng liên quan đến tuổi, thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính hoặc bệnh võng mạc do đái tháo đường và do đó dẫn đến thoái hóa thần kinh.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế có nguy cơ gây miễn dịch thấp và gánh nặng trình tự thấp đối với trình tự CDR của nó. Khả năng miễn dịch và không đồng nhất là hai khía cạnh quan trọng của kháng thể trị liệu. Việc xác định các khía cạnh này có thể được thực hiện bằng các phương pháp như được mô tả trong các ví dụ 4 và 5. Các kháng thể theo sáng chế đã được thao tác di truyền cẩn thận để có khả năng miễn dịch và/hoặc không đồng nhất tối thiểu hoặc không có.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế không làm giảm sự phosphoryl hóa ERK do BDNF gây ra. Đối với mục đích này, sự phosphoryl hóa ERK có thể được xác định, ví dụ, trong các tế bào CHO biểu hiện TrkB của người như được mô tả trong Ví dụ 13. Điều này có thể có nghĩa là sự phosphoryl hóa ERK gây ra bởi BDNF biểu hiện nội sinh không bị giảm khi sử dụng kháng thể kháng TrkB theo sáng chế. Điều này cũng có nghĩa là kháng thể kháng TrkB theo sáng chế không làm giảm quá trình phosphoryl hóa ERK khi được sử dụng trước, đồng thời hoặc sau khi sử dụng BDNF ngoại sinh. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng TrkB không cạnh tranh với hoặc làm giảm mức độ phosphoryl hóa ERK do BDNF gây ra so với một mình BDNF gây ra.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế là đặc hiệu đối với sự phosphoryl hóa và/hoặc hoạt hóa TrkB và không phosphoryl hóa và/hoặc hoạt hóa TrkA hoặc TrkC không đặc hiệu.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB không gắn kết không đặc hiệu với VEGF của người và/hoặc VEGF của chuột. Sự gắn kết không đặc hiệu trong bối cảnh này có nghĩa là kháng thể kháng TrkB theo sáng chế không gắn kết với VEGF của người, như được xác định, ví dụ, trong ELISA như được mô tả trong Ví dụ 14.

Theo một phương án, việc thiếu gắn kết không đặc hiệu của kháng thể kháng TrkB có thể được xác định bằng cách xác định sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ví dụ, thử nghiệm t không ghép cặp,  $p < 0,05$ ) trong gắn kết với VEGF của người giữa kháng thể kháng TrkB và kháng thể đối chứng isotyp IgG thích hợp. Cụ thể, sự thiếu gắn kết không đặc hiệu của kháng thể kháng TrkB theo sáng chế có thể được xác định bằng cách xác định sự khác biệt bất kỳ trong gắn kết với VEGF của người giữa kháng thể kháng TrkB và kháng thể đối chứng isotyp IgG1. Kháng thể kháng TrkB theo sáng chế sẽ không khác biệt đáng kể khi thiếu gắn kết với VEGF của người so với kháng thể đối chứng isotyp IgG1 có nồng độ tương đương với nồng độ khoảng 0,3 nM, 0,4 nM, 0,5 nM, 0,6 nM, 0,7 nM, 0,8 nM, 0,9 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 110 nM, 120 nM, 130 nM, 140 nM, 150 nM, 160 nM, 170 nM, 180 nM, 190 nM hoặc 200 nM. Theo một phương án khác, việc thiếu gắn kết không đặc hiệu của kháng thể kháng TrkB theo sáng chế có thể được xác định bằng cách xác định giá trị gắn kết IC<sub>50</sub> của kháng thể kháng TrkB với một trong số VEGF người hoặc chuột. Cụ thể là, kháng thể kháng TrkB theo sáng chế sẽ biểu thị giá trị gắn kết IC<sub>50</sub> với VEGF người hoặc chuột lớn hơn 0,9  $\mu$ M, tốt hơn là lớn hơn 1  $\mu$ M, lớn hơn 2  $\mu$ M, lớn hơn 3  $\mu$ M, lớn hơn 5  $\mu$ M, lớn hơn 10  $\mu$ M, lớn hơn 20  $\mu$ M, lớn hơn 30  $\mu$ M, lớn hơn 40  $\mu$ M, lớn hơn 50  $\mu$ M, lớn hơn 100  $\mu$ M, lớn hơn 150  $\mu$ M, lớn hơn 200  $\mu$ M, lớn hơn 250  $\mu$ M, lớn hơn 300  $\mu$ M, lớn hơn 350  $\mu$ M, lớn hơn 400  $\mu$ M, lớn hơn 450  $\mu$ M, lớn hơn 500  $\mu$ M, lớn hơn 550  $\mu$ M, lớn hơn 600  $\mu$ M, lớn hơn 650  $\mu$ M, lớn hơn 700  $\mu$ M, lớn hơn 750  $\mu$ M, lớn hơn 800  $\mu$ M, lớn hơn 850  $\mu$ M, hoặc lớn hơn 900  $\mu$ M.

Quá trình làm giống như của người và các biến thể trình tự axit amin

Các kháng thể kháng TrkB biến thể và các đoạn kháng thể khác có thể được thao tác di truyền dựa trên bộ CDR được xác định trong đoạn dẫn đầu D003 của chuột. Cần phải hiểu rằng trong các kháng thể kháng TrkB biến thể và các đoạn kháng thể này, trình tự axit amin của CDR vẫn không thay đổi nhưng các khu vực xung quanh, ví dụ, vùng FR có thể được thao tác di truyền. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể kháng TrkB có thể được điều chế bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào ADN của kháng thể kháng TrkB, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các biến thể như vậy bao gồm, ví dụ, xóa bỏ, và/hoặc chèn vào và/hoặc thay thế, các gốc trong các trình tự axit amin của các kháng thể kháng TrkB trong các ví dụ trong tài liệu này. Sự

kết hợp bất kỳ của việc xóa bỏ, chèn và thay thế được thực hiện đạt được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn. Sự thay đổi axit amin cũng có thể làm thay đổi các quá trình sau dịch mã của kháng thể kháng TrkB biến thể hoặc được làm giống như của người, như thay đổi số lượng hoặc vị trí của các vị trí glycosyl hóa.

Theo một vài phương án, sáng chế bao gồm kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn kháng thể của chúng có chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi và trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi là đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và 12, hoặc 3 và 13, hoặc 4 và 14, hoặc 5 và 15, hoặc 6 và 16, hoặc 7 và 17, hoặc 8 và 18, hoặc 9 và 19, hoặc 10 và 20, tương ứng.

Theo một vài phương án, sáng chế bao gồm kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn kháng thể của chúng có chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và trình tự axit amin của chuỗi nặng là đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và 22 hoặc 23; 24 và 25 hoặc 26; 27 và 28 hoặc 29; 30 và 31 hoặc 32; 33 và 34 hoặc 35; 36 và 37 hoặc 38; 39 và 40 hoặc 41; 42 và 43 hoặc 44; 45 và 46 hoặc 47, tương ứng.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB cạnh tranh để gắn kết với TrkB với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể sau đây:

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 hoặc 23,

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 hoặc 26,

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28 hoặc 29,

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31 hoặc 32,

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 34 hoặc 35,

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 hoặc 38,

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 40 hoặc 41,

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 hoặc 44, hoặc

Kháng thể có chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46 hoặc 47.

Một loại biến thể axit amin khác của kháng thể liên quan đến việc thay đổi kiểu glycosyl hóa ban đầu của kháng thể. Thuật ngữ "thay đổi" trong bối cảnh này có nghĩa là xóa bỏ một hoặc nhiều nhóm hydrat cacbon được thấy trong kháng thể, và/hoặc thêm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa mà trước đây không có trong kháng thể.

Theo một số khía cạnh, sáng chế bao gồm các phân tử axit nucleic mã hóa các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể kháng TrkB được mô tả trong tài liệu này. Các phân tử axit nucleic mã hóa các biến thể trình tự axit amin của kháng thể kháng TrkB được điều chế bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở việc phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp các biến thể trình tự axit amin tồn tại tự nhiên) hoặc điều chế bằng phương pháp gây đột biến qua trung gian oligonucleotit (hoặc định hướng vị trí), gây đột biến PCR, và gây đột biến cat-xet biến thể được chuẩn bị trước hoặc phiên bản phi biến thể của kháng thể kháng TrkB.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TrkB là đoạn kháng thể. Có những kỹ thuật đã được phát triển để sản xuất các đoạn kháng thể. Các đoạn có thể thu được thông qua việc phân giải protein các kháng thể nguyên vẹn (xem, ví dụ, Morimoto et al., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; và Brennan et al., 1985, *Science* 229:81). Theo cách khác, các đoạn này có thể được tạo ra trực tiếp trong các tế bào chủ tái tổ hợp. Ví dụ, các đoạn Fab'-SH có thể thu hồi trực tiếp từ *E. coli* và được nối hóa học để tạo thành các đoạn F(ab')<sub>2</sub> (xem, ví dụ, Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167). Bằng cách tiếp cận khác, các đoạn F(ab')<sub>2</sub> có thể được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Các

kỹ thuật khác để sản xuất các đoạn kháng thể sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Các kháng thể kháng TrkB và các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể bao gồm các cải biến.

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn sử dụng đoạn kháng thể kháng TrkB, thay vì sử dụng một kháng thể nguyên vẹn. Có thể mong muốn cải biến đoạn kháng thể để tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách kết hợp một epitop liên kết với thụ thể dự phòng vào đoạn kháng thể. Theo một phương pháp, khu vực thích hợp của đoạn kháng thể có thể bị thay đổi (ví dụ, bị đột biến), hoặc epitop có thể được kết hợp vào thể peptit mà sau đó được dung hợp với đoạn kháng thể ở đầu hoặc ở giữa, ví dụ, bằng cách tổng hợp ADN hoặc peptit. Xem, ví dụ, WO 96/32478.

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm các cải biến cộng hóa trị của các kháng thể kháng TrkB. Các cải biến cộng hóa trị bao gồm cải biến các gốc xysteinyl, các gốc histidyl, các gốc lysinyl và đầu amin, các gốc arginyl, các gốc tyrosyl, các nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl), các gốc glutaminyl và asparaginyl, hoặc seryl, hoặc các gốc threonyl. Một loại cải biến cộng hóa trị khác liên quan đến sự nối hóa học hoặc bằng enzym glycosit với kháng thể. Các cải biến như vậy có thể được thực hiện bằng cách tổng hợp hóa học hoặc bằng cách phân cắt kháng thể bằng enzym hoặc hóa học, nếu thích hợp. Các loại cải biến cộng hóa trị khác của kháng thể có thể được đưa vào phân tử bằng cách cho các gốc axit amin được nhắm đích của kháng thể phản ứng với một tác nhân tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng phản ứng với các chuỗi bên được chọn hoặc các gốc đầu amin hoặc carboxy.

Việc loại bỏ các nhóm hydrat cacbon bất kỳ có mặt trên kháng thể có thể được thực hiện bằng hóa học hoặc bằng enzym. Việc deglycosyl hóa học được mô tả bởi Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 và bởi Edge et al., 1981, Anal. Biochem., 118:131. Việc phân cắt bằng enzym các nhóm hydrat cacbon trên kháng thể có thể được thực hiện bằng việc sử dụng nhiều loại nội glycosidaza và ngoại glycosidaza như được mô tả bởi Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

Loại khác của cải biến cộng hóa trị hữu ích bao gồm liên kết kháng thể với một trong số nhiều polyme không có protein, ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol,

hoặc polyoxyalkylen, theo cách được nêu trong một hoặc nhiều trong số patent Mỹ số 4,640,835, patent Mỹ số 4,496,689, patent Mỹ số 4,301,144, patent Mỹ số 4,670,417, patent Mỹ số 4,791,192 và patent Mỹ số 4,179,337.

#### Sự gắn kết epitop

Các kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với TrkB người tái tổ hợp hoặc tự nhiên. Các kháng thể theo sáng chế nhận biết "epitop kháng nguyên TrkB" và "epitop TrkB" đặc hiệu. Cụ thể, các kháng thể theo sáng chế gắn kết với epitop trong miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Miền ngoại bào của TrkB người về cơ bản gồm trình tự sau đây (SEQ ID NO.54):

CPTSCCKCSASRIWCSDPSPGIVAFPRLEPNSVDPENITEIFIANQKRLEIINE  
DDVEAYVGLRNLTIVDSGLKFVAHKAFLKNSNLQHINFTRNKLTSLSRKHFRH  
LDLSELILVGNPFTCSCDIMWIKTLQEAKSSPDTQDLYCLNESSKNIPLANLQIP  
NCGLPSANLAAPNLTVEEGKSITLSCSVAGDPVPMYWDVGNLVSKHMNETS  
HTQGLRITNISSDDSGKQISCVAENLVGEDQDSVNLTVHFAPTITFLESPTS DH  
HWCIPFTVKGNPKPALQWFYNGAILNESKYICTKIHVTNHTTEYHGCLQLDNPT  
HMNNGDYTLIAKNEYGKDEKQISAHFMGWPGIDDGANPNYPDVIYEDYGTA  
ANDIGDTTNRSEIPSTDVTDKTGREH

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “epitop kháng nguyên TrkB” và “epitop TrkB” đề cập đến phân tử (ví dụ, peptit) hoặc một đoạn của phân tử có khả năng gắn kết với kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó. Các thuật ngữ này còn bao gồm, ví dụ, yếu tố quyết định kháng nguyên TrkB được nhận biết bởi kháng thể bất kỳ hoặc đoạn kháng thể bất kỳ theo sáng chế, mà có tổ hợp CDR của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được chọn từ các CDR của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 48 đến 50 và các CDR của chuỗi nặng của SEQ ID NO: 51 đến 53.

Các epitop kháng nguyên TrkB có thể được bao gồm trong các protein, các đoạn protein, các peptit hoặc tương tự. Các epitop phổ biến nhất là các protein, oligopeptit ngắn, dạng bất chức oligopeptit (tức là, các hợp chất hữu cơ bất chức các đặc tính gắn kết kháng thể của kháng nguyên TrkB), hoặc các tổ hợp của chúng.

Đã phát hiện được rằng các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể theo sáng chế gắn kết với các epitop duy nhất trong miền ngoại bào của TrkB người. Tốt hơn, nếu kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112, 130-143 và/hoặc 205-219 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112 và 130-143; hoặc 92-112 và 205-219; hoặc 130-143 và 205-219; hoặc 92-112 và 130-143 và 205-219 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong tổ hợp bất kỳ trong số các tổ hợp gồm các vùng axit amin nêu trên và ngoài ra còn gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 313-330 và/hoặc 348-367 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 và 348-367 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Do đó, trong ngữ cảnh gắn kết epitop, nhóm từ “gắn kết trong các vùng axit amin X-Y...” nghĩa là kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong vùng axit amin được nêu trong trình tự.

Ví dụ, nếu kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112 hoặc 130-143, điều này có nghĩa là kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112 hoặc 130-143.

Trong một ví dụ khác, nếu kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112 và 130-143, điều này có nghĩa là kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng

nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong vùng axit amin 92-112 và còn gắn kết với ít nhất một gốc axit amin nằm trong vùng axit amin 130-143 của SEQ ID NO: 54.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112, 130-143 và/hoặc 205-219 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112 và 130-143; hoặc 92-112 và 205-219; hoặc 130-143 và 205-219; hoặc 92-112 và 130-143 và 205-219 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% gốc axit amin nằm trong tổ hợp bất kỳ trong số các tổ hợp gồm các vùng axit amin nêu trên và còn gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 313-330 và/hoặc 348-367 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112, 130-143, 205-219, 313-330 và 348-367 của miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54.

Ví dụ, nếu kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112 hoặc 130-143, điều này có nghĩa là kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong vùng axit amin 92-112 hoặc gắn kết với ít nhất 10%, 20%,

30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong vùng axit amin 130-143.

Trong một ví dụ khác, nếu kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong các vùng axit amin 92-112 và 130-143, điều này có nghĩa là kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong vùng axit amin 92-112 và còn gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% các gốc axit amin nằm trong vùng axit amin 130-143.

Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, cho rằng do sự gắn kết với các epitop mới, kháng thể TrkB phát huy tác dụng vượt trội của nó trong việc hoạt hóa TrkB.

Polynucleotit, vectơ, tế bào chủ, và phương pháp tái tổ hợp

Các phương án khác bao gồm các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa kháng thể kháng TrkB, các vectơ và các tế bào chủ bao gồm các polynucleotit, và các kỹ thuật tái tổ hợp để sản xuất kháng thể. Các polynucleotit được phân lập có thể mã hóa dạng kháng thể kháng TrkB mong muốn bất kỳ, bao gồm, ví dụ, các kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ, các đoạn Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, và Fv, các diabody, các kháng thể thẳng, các phân tử kháng thể đơn chuỗi, và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể.

(Các) polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn hoặc chuỗi của chúng có thể được dung hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa hoặc đối chứng, như đã biết trong lĩnh vực này, và có thể có trong vectơ biểu hiện hoặc tế bào chủ thích hợp như đã biết trong lĩnh vực này. Mỗi phân tử polynucleotit mã hóa các miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có thể được dung hợp độc lập với trình tự polynucleotit mã hóa miền không đổi, như miền không đổi của người, cho phép sản xuất các kháng thể nguyên vẹn. Ngoài ra, các polynucleotit, hoặc các phần của chúng, có thể được dung hợp với nhau, tạo ra khuôn mẫu để sản xuất kháng thể chuỗi đơn.

Để sản xuất tái tổ hợp, polynucleotit mã hóa kháng thể được lồng vào vector sao chép được dễ tách dòng (khuếch đại ADN) hoặc dễ biểu hiện. Nhiều vector thích hợp để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp là có sẵn. Các thành phần vector thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều thành phần sau: trình tự tín hiệu, điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, đoạn khởi đầu, và trình tự kết thúc phiên mã.

Các kháng thể kháng TrkB cũng có thể được sản xuất dưới dạng polypeptit dung hợp, trong đó kháng thể được dung hợp với polypeptit khác loại, như trình tự tín hiệu hoặc polypeptit khác có vị trí phân cắt cụ thể ở đầu amin của protein hoặc polypeptit thành thực. Trình tự tín hiệu khác loại được chọn thường là trình tự được nhận biết và xử lý (ví dụ, được phân cắt bởi peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Đối với các tế bào chủ nhân rai rác không nhận biết và xử lý trình tự tín hiệu kháng thể kháng TrkB, trình tự tín hiệu có thể được thay thế bằng trình tự tín hiệu nhân rai rác. Trình tự tín hiệu này có thể là, ví dụ, phosphatasa kiềm, penicillinaza, lipoprotein, trình tự dẫn đầu độc tố ruột II bền nhiệt, và tương tự. Đối với sự bài tiết của nấm men, trình tự tín hiệu tự nhiên có thể được thay thế, ví dụ, bằng trình tự dẫn đầu thu được từ yếu tố alpha invertaza của nấm men (bao gồm các trình tự dẫn đầu yếu tố  $\alpha$  của *Saccharomyces* và *Kluyveromyces*), phosphatasa axit, *C. albicans* glucoamylaza, hoặc tín hiệu được mô tả trong WO90/13646. Trong các tế bào động vật có vú, các trình tự tín hiệu của động vật có vú cũng như các trình tự dẫn đầu tiết virus, ví dụ, tín hiệu herpes simplex gD, có thể được sử dụng. ADN cho vùng tiền chất như vậy được ghép với ADN mã hóa kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người trong khung đọc.

Vector biểu hiện và tách dòng chứa trình tự axit nucleic mà làm cho vector sao chép trong một hoặc nhiều tế bào chủ được chọn. Thông thường, trong các vector tách dòng, trình tự này là trình tự làm cho vector sao chép độc lập trong ADN nhiễm sắc thể chủ, và bao gồm các điểm khởi đầu sao chép hoặc trình tự sao chép tự động. Các trình tự như vậy đã được biết rõ ở nhiều loại vi khuẩn, nấm men, và virus. Điểm khởi đầu sao chép từ plasmid pBR322 thích hợp đối với hầu hết các vi khuẩn gram âm, điểm khởi đầu sao chép 2- $\nu$ . của plasmid thích hợp đối với nấm men, và nhiều điểm khởi đầu sao chép của virus khác nhau (SV40, polyoma, adenovirus, VSV, và BPV) hữu dụng trong các vector tách dòng ở tế bào động vật có vú. Thông thường, thành phần

điểm khởi đầu sao chép không cần đối với các vector biểu hiện động vật có vú (điểm khởi đầu sao chép SV40 thường có thể được dùng vì nó chứa đoạn khởi đầu sớm).

Các vector biểu hiện và tách dòng có thể chứa một gen mã hóa chất đánh dấu có thể chọn lọc để tạo điều kiện cho việc xác định sự biểu hiện. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc thông thường mã hóa các protein mà tạo ra tính kháng kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampicilin, neomycin, methotrexat, hoặc tetracyclin, hoặc theo cách khác, bổ sung cho các thiếu hụt khuyết dưỡng, hoặc theo cách khác, cung cấp chất dinh dưỡng đặc trưng không có trong môi trường phức tạp, ví dụ, gen mã hóa D-alanine racemase cho *Bacilli*.

Một ví dụ về mục đích chọn lọc sử dụng thuốc để làm ngừng sự sinh trưởng của tế bào chủ. Các tế bào mà được biến nạp thành công với gen khác loại tạo ra protein kháng thuốc và do đó sống sót trong chế độ dinh dưỡng chọn lọc. Ví dụ về các phương pháp chọn lọc ưu thế sử dụng các thuốc neomycin, axit mycophenolic, và hygromycin. Các chất đánh dấu có thể chọn lọc phổ biến cho các tế bào động vật có vú là các chất cho phép xác định các tế bào có khả năng hấp thụ axit nucleic mã hóa kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người, như DHFR (dihydrofolate reductase), thymidine kinase, metallothionein-I và -II (như các gen metallothionein của động vật linh trưởng), adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, và tương tự. Các tế bào được biến nạp với gen chọn lọc DHFR đầu tiên được nhận dạng bằng cách nuôi cấy tất cả các thể biến nạp trong môi trường nuôi cấy chứa methotrexate (Mtx), chất đối kháng cạnh tranh của DHFR. Tế bào chủ thích hợp khi sử dụng DHFR kiểu đại là dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary-CHO) thiếu hoạt tính của DHFR (ví dụ, DG44).

Theo cách khác, các tế bào chủ (cụ thể là các tế bào chủ kiểu đại chứa DHFR nội sinh) được biến nạp hoặc cùng biến nạp với các trình tự ADN mã hóa kháng thể kháng TrkB, protein DHFR kiểu đại, và chất đánh dấu chọn lọc khác như aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) có thể được chọn bằng cách nuôi tế bào trong môi trường chứa tác nhân chọn lọc đối với chất đánh dấu chọn lọc được như kháng sinh aminoglycosidic, ví dụ, kanamycin, neomycin, hoặc G418. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,965,199.

Khi việc sản xuất tái tổ hợp được thực hiện trong tế bào nấm men làm tế bào chủ, gen TRP1 có trong plasmit YRp7 của nấm men (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) có thể được sử dụng làm chất đánh dấu chọn lọc. Ví dụ, gen TRP1 tạo ra chất đánh dấu chọn lọc cho chủng nấm men đột biến thiếu khả năng phát triển trong tryptophan, ví dụ, ATCC số 44076 hoặc PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Sự có mặt của *trp1* trong hệ gen tế bào chủ nấm men khi đó tạo ra môi trường hữu hiệu để phát hiện biến nạp nhờ sự sinh trưởng khi không có tryptophan. Tương tự, các chủng nấm men thiếu hụt *Leu2p* như ATCC 20,622 hoặc 38,626 được bổ sung các plasmit đã biết là mang gen LEU2.

Ngoài ra, các vector thu được từ plasmit vòng pKD1 1,6  $\mu$ m có thể được sử dụng để biến nạp nấm men *Kluyveromyces*. Theo cách khác, hệ biểu hiện để sản xuất chymosin bê tái tổ hợp quy mô lớn được báo cáo đối với *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). Các vector biểu hiện nhiều bản sao ổn định để tiết albumin huyết thanh người tái tổ hợp trưởng thành nhờ các chủng công nghiệp *Kluyveromyces* cũng đã được bộc lộ (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

Các vector biểu hiện và tách dòng thường chứa đoạn khởi đầu mà được nhận biết bởi sinh vật chủ và được liên kết theo kiểu hoạt động với phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng TrkB hoặc chuỗi peptit của chúng. Các đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng với tế bào chủ nhân rải rác bao gồm đoạn khởi đầu *phoA*, hệ thống đoạn khởi đầu  $\beta$ -lactamaza và lactoza, đoạn khởi đầu phosphataza kiềm, hệ thống đoạn khởi đầu tryptophan (*trp*), và các đoạn khởi đầu lai như đoạn khởi đầu *tac*. Các đoạn khởi đầu vi khuẩn đã biết khác cũng là thích hợp. Các đoạn khởi đầu để sử dụng trong hệ thống vi khuẩn cũng chứa trình tự Shine-Dalgarno (S.D.) được liên kết theo kiểu hoạt động với ADN mã hóa kháng thể kháng TrkB được làm giống như của người.

Nhiều trình tự khởi đầu nhân điển hình là đã biết. Hầu như tất cả các gen của tế bào nhân điển hình có vùng giàu AT nằm ở khoảng 25 đến 30 bazơ phía trước vị trí khởi đầu phiên mã. Một trình tự khác được phát hiện ở 70 đến 80 bazơ phía trước vị trí khởi đầu phiên mã của nhiều gen là vùng CNCAAT trong đó N có thể là nucleotit bất kỳ. Đầu 3' của hầu hết các gen thuộc tế bào nhân điển hình là trình tự AATAAA mà có thể là tín hiệu để bổ sung đuôi poly A vào đầu 3' của trình tự mã hóa. Tất cả các trình tự này thích hợp để lồng vào vector biểu hiện của tế bào nhân điển hình.

Ví dụ về các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng với tế bào chủ nấm men bao gồm các đoạn khởi đầu cho 3-phosphoglyxerat kinaza hoặc các enzym đường phân khác, như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza, và glucokinaza.

Các đoạn khởi đầu cảm ứng có lợi thế bổ sung của sự phiên mã được kiểm soát bởi các điều kiện tăng trưởng. Chúng bao gồm các vùng dẫn đầu của nấm men cho rượu dehydrogenaza 2, isocytochrom C, phosphataza axit, enzym dẫn xuất liên quan đến chuyển hóa nitơ, metallothionein, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza và enzym chịu trách nhiệm cho việc sử dụng maltoza và galactoza. Các vector và đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng trong biểu hiện bằng nấm men được mô tả tiếp trong EP 73,657. Các yếu tố tăng cường của nấm men cũng được sử dụng một cách có lợi với các đoạn khởi đầu nấm men.

Việc phiên mã kháng thể kháng TrkB từ các vector trong tế bào chủ động vật có vú được kiểm soát, ví dụ, bằng các đoạn khởi đầu thu được từ hệ gen virus như virus polyoma, virus đậu gà, adenovirus (như Adenovirus 2), virus papilloma bò, virus sarcoma chim, xytomegalovirus, retrovirus, virus viêm gan B, virus Simian 40 (SV40), từ các đoạn khởi đầu động vật có vú khác loại, ví dụ, đoạn khởi đầu actin hoặc đoạn khởi đầu globulin miễn dịch, hoặc từ các đoạn khởi đầu sốc nhiệt, miễn là các đoạn khởi đầu này tương hợp với hệ thống tế bào chủ.

Các đoạn khởi đầu sớm và muộn của virus SV40 thu được một cách thuận tiện dưới dạng đoạn giới hạn SV40 mà cũng chứa điểm khởi đầu sao chép của virus SV40. Đoạn khởi đầu sớm tức thì của xytomegalovirus ở người thu được một cách thuận tiện dưới dạng mảnh giới hạn HindIII E. Hệ biểu hiện ADN ở tế bào chủ động vật có vú sử dụng virus papilloma bò làm vector được bộc lộ trong patent Mỹ 4,419,446. Cải biến của hệ này được mô tả trong patent Mỹ số 4,601,978. Tương tự, xem tài liệu Reyes et al., 1982, Nature 297:598-601, mô tả sự biểu hiện cADN p-interferon người ở tế bào chuột với sự điều khiển của đoạn khởi đầu thymidin kinaza từ virus herpes simplex. Theo cách khác, đoạn lặp đầu tận cùng dài của virus sarcoma rous có thể được sử dụng làm đoạn khởi đầu.

Yếu tố hữu ích khác có thể được sử dụng trong vector biểu hiện tái tổ hợp là trình tự tăng cường, trình tự này được sử dụng để làm tăng sự phiên mã ADN mã hóa một kháng thể kháng TrkB bởi các sinh vật nhân điển hình cao hơn. Nhiều trình tự tăng cường hiện đã biết từ gen của động vật có vú (ví dụ, globin, elastaza, albumin,  $\alpha$ -fetoprotein, và insulin). Tuy nhiên, thông thường sẽ sử dụng trình tự tăng cường từ virut ở tế bào nhân điển hình. Các ví dụ bao gồm trình tự tăng cường SV40 ở phía sau của điểm khởi đầu sao chép (bp 100-270), trình tự tăng cường đoạn khởi đầu sớm của cytomegalovirut, trình tự tăng cường của polyoma ở phía sau của điểm khởi đầu sao chép, và trình tự tăng cường của adenovirut. Tương tự, xem tài liệu Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 mô tả về các yếu tố tăng cường để hoạt hóa các đoạn khởi đầu của tế bào nhân điển hình. Trình tự tăng cường có thể được ghép vào vector ở vị trí 5' hoặc 3' so với trình tự mã hóa kháng thể kháng TrkB, nhưng tốt hơn là nằm ở vị trí 5' tính từ đoạn khởi đầu.

Các vector biểu hiện được sử dụng trong tế bào chủ nhân điển hình (nấm men, nấm mốc, côn trùng, thực vật, động vật, người, hoặc tế bào có nhân từ các sinh vật đa bào khác) cũng sẽ chứa các trình tự cần để kết thúc sự phiên mã và để ổn định mRNA. Các trình tự như vậy thường có ở đầu 5' và, đôi khi ở đầu 3', các vùng không được dịch mã của ADN hoặc cADN của sinh vật nhân điển hình hoặc virut. Các vùng này chứa các đoạn nucleotit được phiên mã dưới dạng mảnh polyadenyl hóa trong phần không được dịch mã của mRNA mã hóa kháng thể kháng TrkB. Một thành phần kết thúc phiên mã hữu dụng là vùng polyadenyl hóa hormon sinh trưởng của bò. Xem WO94/11026 và vector biểu hiện được bộc lộ trong tài liệu này. Theo một vài phương án, kháng thể kháng TrkB có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ CHEF. (Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,888,809; phần mô tả của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.)

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện ADN trong các vector ở đây là tế bào nhân rải rác, nấm men, hoặc tế bào nhân điển hình bậc cao hơn được mô tả trên đây. Các sinh vật nhân rải rác thích hợp cho mục đích này bao gồm vi khuẩn thật, như các sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ, Enterobacteriaceae như *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, ví dụ, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ, *Serratia marcescans*, và *Shigella*, cũng như Bacilli như *B. subtilis* và *B. licheniformis* (ví dụ, *B. licheniformis* 41P được bộc

lộ trong DD 266,710 công bố ngày 12/04/1989), *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, và *Streptomyces*. Một tế bào chủ tách dòng *E. coli* được ưu tiên là *E. coli* 294 (ATCC 31,446), mặc dù các chủng khác như *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), và *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) là thích hợp. Các ví dụ này minh họa chứ không hạn chế.

Ngoài các tế bào nhân rải rác, các vi khuẩn nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện đối với các vector mã hóa kháng thể kháng TrkB. *Saccharomyces cerevisiae*, hay thường gọi là nấm men bánh mỳ, là vi sinh vật thường dùng nhất trong số các vi sinh vật chủ nhân điển hình bậc thấp hơn. Tuy nhiên, một số chi, loài, và chủng thường có sẵn và hữu dụng ở đây, như *Schizosaccharomyces pombe*; vật chủ *Kluyveromyces* như, ví dụ, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis*; và nấm sợi như, ví dụ, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, và vật chủ *Aspergillus* như *A. nidulans* và *A. niger*.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể kháng TrkB được glycosyl hóa cũng thu được từ các sinh vật đa bào. Các ví dụ về các tế bào động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng, bao gồm, ví dụ, nhiều chủng *Baculovirus* và biến thể và các tế bào chủ côn trùng chấp nhận được tương ứng từ vật chủ như *Spodoptera frugiperda* (sâu bướm), *Aedes aegypti* (muỗi), *Aedes albopictus* (muỗi), *Drosophila melanogaster* (ruồi giấm), và *Bombyx mori* (con tằm). Nhiều chủng virus để chuyển nhiễm là sẵn có chung, ví dụ, biến thể L-1 của *Autographa californica* NPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV, và các virus như vậy có thể được sử dụng, đặc biệt để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Giống nuôi cấy tế bào thực vật của cây bông, ngô, khoai tây, đậu nành, dứa, yên thảo, cà chua, và thuốc lá cũng có thể được sử dụng làm vật chủ.

Các kháng thể kháng TrkB theo sáng chế hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng cũng có thể được kết hợp trong các vector virus, tức là polynucleotit mã hóa cho kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được đưa vào

trong vectơ virus và sau đó được biểu hiện trong cơ thể của bệnh nhân sau khi bị nhiễm virus.

Theo một khía cạnh khác, việc biểu hiện kháng TrkB được thực hiện trong các tế bào động vật có xương sống. Việc nhân giống các tế bào động vật có xương sống trong nuôi cấy (nuôi cấy mô) đã trở thành quy trình thường quy và các kỹ thuật được phổ biến rộng rãi. Ví dụ về các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu dụng là dòng tế bào thận khỉ CV1 được biến nạp bởi SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), dòng tế bào thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293 được tách dòng phụ để nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy huyền phù, (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), tế bào thận chuột đồng con (BHK, ATCC CCL 10), tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc/-DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; ví dụ, DG44), tế bào sertoli chuột (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), tế bào thận khỉ (CV1 ATCC CCL 70), tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1587), tế bào caxinom cổ tử cung người (HELA, ATCC CCL 2), tế bào thận chó (MDCK, ATCC CCL 34), tế bào gan chuột cống buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), tế bào phổi người (W138, ATCC CCL 75), tế bào gan người (Hep G2, HB 8065), tế bào khối u vú chuột nhắt (MMT 060562, ATCC CCL51), tế bào TR1 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), tế bào MRC 5, tế bào FS4, và dòng tế bào ung thư gan người (Hep G2).

Các tế bào chủ được biến nạp với các vectơ biểu hiện hoặc tách dòng được mô tả trên đây để sản xuất kháng thể kháng TrkB và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến nếu thích hợp để cảm ứng các đoạn khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp, hoặc khuếch đại các gen mã hóa các trình tự mong muốn.

Các tế bào chủ được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng TrkB được mô tả ở đây có thể được nuôi cấy trong nhiều môi trường khác nhau. Các môi trường có bán trên thị trường như Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), môi trường thiết yếu tối thiểu ((Minimal Essential Medium - MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), và môi trường Dulbecco's Modified Eagle's ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) là thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ. Ngoài ra, môi trường bất kỳ được mô tả trong một hoặc nhiều tài liệu Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, patent Mỹ số 4,767,704, patent Mỹ số 4,657,866,

patent Mỹ số 4,927,762, patent Mỹ số 4,560,655, patent Mỹ số 5,122,469, WO 90/103430, và WO 87/00195 có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cho tế bào chủ. Môi trường bất kỳ trong số các môi trường này có thể được bổ sung nếu cần các hormon và/hoặc các yếu tố sinh trưởng khác (như insulin, transferrin, hoặc yếu tố sinh trưởng biểu bì), muối (như natri clorua, canxi, magie, và phosphat), các dung dịch đệm (như HEPES), các nucleotit (như adenosin và thymidin), các chất kháng sinh (như gentamixin), các nguyên tố vi lượng (được xác định là các hợp chất vô cơ thường có mặt ở nồng độ cuối trong phạm vi micromol), và glucoza hoặc nguồn năng lượng tương đương. Các chất bổ sung khác cũng có thể được đưa vào với nồng độ thích hợp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, độ pH, và tương tự, là các điều kiện trước đó đã được sử dụng với tế bào chủ được chọn để biểu hiện, và sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

Khi sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, kháng thể có thể được sản xuất nội bào, trong khoang chu chất, hoặc được tiết trực tiếp vào môi trường. Nếu kháng thể được sản xuất nội bào, các tế bào có thể bị phá vỡ để giải phóng protein ở bước thứ nhất. Các mảnh vụn dạng hạt, hoặc tế bào chủ hoặc mảnh được dung giải, có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 mô tả quy trình tách kháng thể mà được tiết vào khoang chu chất của *E. coli*. Tóm lại, hồ tế bào được làm tan giá với sự có mặt của natri axetat (độ pH=3,5), EDTA, và phenylmetylsulfonylflorua (PMSF) trong khoảng 30 phút. Các mảnh vụn tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm. Nếu kháng thể được tiết vào môi trường, dịch nổi từ hệ biểu hiện như vậy đầu tiên thường được cô đặc bằng cách sử dụng bộ lọc cô protein có bán trên thị trường, ví dụ, bộ siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Chất ức chế proteaza như PMSF có thể được đưa vào ở bước bất kỳ trên đây để ức chế sự thủy phân protein và chất kháng sinh có thể được đưa vào để ngăn ngừa sự sinh trưởng của sinh vật nhiễm tạp ngẫu nhiên. Nhiều phương pháp khác nhau có thể được sử dụng để tách kháng thể khỏi tế bào chủ.

Chế phẩm chứa kháng thể được bào chế từ các tế bào có thể được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách, và phương pháp sắc ký ái lực, trong đó phương pháp sắc ký ái lực là kỹ thuật tinh chế thông thường. Sự thích hợp của protein A làm phối tử ái lực tùy thuộc vào loài và lớp

phụ kháng thể của vùng Fc globulin miễn dịch mà có trong kháng thể. Protein A có thể được sử dụng để tinh chế kháng thể mà dựa trên các chuỗi nặng  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ , hoặc  $\gamma_4$  của người (xem, ví dụ, Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Protein G được khuyến nghị đối với tất cả isotyp của chuột và đối với  $\gamma_3$  của người (xem, ví dụ, Guss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Nền mà phối tử ái lực gắn vào phổ biến nhất là agarosa, nhưng các nền khác là sẵn có. Các nền ổn định về mặt cơ học như thủy tinh xốp có điều chỉnh hoặc poly(styrenedivinyl)benzen cho phép tốc độ dòng nhanh hơn và thời gian xử lý ngắn hơn so với có thể đạt được bằng agarosa. Khi kháng thể chứa miền CH3, nhựa Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) là hữu dụng để tinh chế. Các kỹ thuật khác để tinh chế protein như phân đoạn trên cột trao đổi ion, kết tủa etanol, HPLC đảo pha, sắc ký trên silic oxit, sắc ký trên heparin SEPHAROSE™ sắc ký trên nhựa trao đổi anion hoặc cation (như cột axit polyaspartic), sắc ký điểm đẳng điện, SDS-PAGE, và kết tủa bằng amoni sulfat cũng sẵn có tùy thuộc vào kháng thể cần thu hồi.

Sau (các) bước tinh chế sơ bộ bất kỳ, hỗn hợp chứa kháng thể quan tâm và các tạp chất có thể được cho sắc ký tương tác kỵ nước pH thấp bằng cách sử dụng dung dịch đệm rửa giải ở pH trong khoảng 2,5-4,5, thường được thực hiện ở nồng độ muối thấp (ví dụ, khoảng muối 0-0,25M).

Cũng được bao gồm là các axit nucleic lai trong các điều kiện nghiêm ngặt thấp, trung bình và cao, như được định nghĩa ở đây, với tất cả hoặc một phần (ví dụ, phần mã hóa vùng biến đổi) của trình tự nucleotit được đặc trưng bởi (các) trình tự polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể TrkB hoặc đoạn kháng thể. Phần lai của axit nucleic lai thường có độ dài ít nhất là 15 (ví dụ, 20, 25, 30 hoặc 50) nucleotit. Phần lai của axit nucleic lai đồng nhất ít nhất 80%, ví dụ, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 98%, với trình tự của một phần hoặc tất cả axit nucleic mã hóa polypeptit kháng TrkB (ví dụ, vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ), hoặc phần hỗ trợ của nó. Có thể sử dụng các axit nucleic lai thuộc loại được mô tả trong tài liệu này, ví dụ, như mẫu dò tách dòng, đoạn mồi, ví dụ, đoạn mồi PCR, hoặc mẫu dò chẩn đoán.

Theo một vài phương án, sáng chế bao gồm (các) polynucleotit phân lập bao gồm các trình tự mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi và trình tự axit

amin của chuỗi nặng biến đổi là đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và 12, hoặc 3 và 13, hoặc 4 và 14, hoặc 5 và 15, hoặc 6 và 16, hoặc 7 và 17, hoặc 8 và 18, hoặc 9 và 19, hoặc 10 và 20, tương ứng.

Theo một vài phương án, sáng chế bao gồm (các) polynucleotit phân lập bao gồm các trình tự mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể có chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và trình tự axit amin của chuỗi nặng là đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và 22 hoặc 23; 24 và 25 hoặc 26; 27 và 28 hoặc 29; 30 và 31 hoặc 32; 33 và 34 hoặc 35; 36 và 37 hoặc 38; 39 và 40 hoặc 41; 42 và 43 hoặc 44; 45 và 46 hoặc 47, tương ứng.

Cần phải hiểu rằng trong các kháng thể kháng TrkB và đoạn kháng thể này, trình tự axit nucleic mã hóa cho CDR vẫn không thay đổi (không thay đổi đối với axit amin mà chúng mã hóa, dạng tương đương của trình tự ADN do sự thoái hóa của các codon là có thể) nhưng các khu vực xung quanh, ví dụ, các vùng FR có thể được thao tác di truyền.

#### Ứng dụng không trị liệu

Các kháng thể được mô tả ở đây là hữu ích làm tác nhân tinh chế ái lực. Trong quá trình này, các kháng thể được cố định trên pha rắn như nhựa Protein A, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này. Kháng thể cố định được cho tiếp xúc với mẫu chứa protein TrkB (hoặc đoạn của chúng) để được tinh chế, và sau đó nên được rửa bằng dung môi thích hợp sẽ loại bỏ đáng kể tất cả các nguyên liệu trong mẫu ngoại trừ protein TrkB, được liên kết với kháng thể cố định. Cuối cùng, nên được rửa bằng một dung môi thích hợp khác sẽ giải phóng protein TrkB khỏi kháng thể.

Kháng thể kháng TrkB cũng là hữu ích trong các xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện và/hoặc định lượng protein TrkB, ví dụ, phát hiện sự biểu hiện TrkB trong các tế bào, mô hoặc huyết thanh cụ thể.

Sẽ là lợi thế trong một số phương án, ví dụ, cho mục đích chẩn đoán để đánh dấu kháng thể bằng nhóm có thể phát hiện được. Nhiều chất đánh dấu có thể phát hiện là có sẵn, bao gồm các đồng vị phóng xạ, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu nền enzym và các loại tương tự. Chất đánh dấu này có thể được liên hợp gián tiếp với

kháng thể bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết khác nhau. Ví dụ, kháng thể có thể được liên hợp với biotin và loại bất kỳ trong số ba loại chất đánh dấu rộng được đề cập ở trên có thể được liên hợp với avidin hoặc ngược lại. Biotin liên kết chọn lọc với avidin và do đó, chất đánh dấu này có thể được liên hợp với kháng thể theo cách gián tiếp này. Ngoài ra, để đạt được sự liên hợp gián tiếp của chất đánh dấu với kháng thể, kháng thể có thể được liên hợp với hapten nhỏ (như digoxin) và một trong các loại chất đánh dấu khác nhau được đề cập ở trên được liên hợp với kháng thể kháng hapten (ví dụ, kháng thể kháng digoxin). Do đó, sự liên hợp gián tiếp của chất đánh dấu với kháng thể có thể đạt được.

Các chất đánh dấu đồng vị phóng xạ làm ví dụ bao gồm  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ , và  $^{131}\text{I}$ . Kháng thể có thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong, ví dụ, *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. Hoạt tính phóng xạ có thể được xác định, ví dụ, bằng cách đếm nhấp nháy.

Các chất đánh dấu huỳnh quang làm ví dụ bao gồm các chất đánh dấu có nguồn gốc từ chelat đất hiếm (europi chelat) hoặc fluorescein và các dẫn xuất của nó, rhodamine và các dẫn xuất của nó, dansyl, Lissamine, phycoerythrin và Texas Red là có sẵn. Các chất đánh dấu huỳnh quang có thể được liên hợp với kháng thể thông qua các kỹ thuật đã biết, như các chất đánh dấu được bộc lộ trong *Current Protocols in Immunology*, trên đây chẳng hạn. Sự phát huỳnh quang có thể được định lượng bằng cách sử dụng huỳnh quang kế.

Có nhiều chất đánh dấu enzym-chất nền đặc trưng khác nhau được biết đến trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,275,149 để đánh giá). Enzym thường xúc tác cho sự thay đổi hóa học của chất nền sinh màu có thể được đo bằng các kỹ thuật khác nhau. Ví dụ, sự thay đổi có thể là sự thay đổi màu sắc trong chất nền có thể được đo bằng phổ quang kế. Ngoài ra, enzym có thể thay đổi sự phát huỳnh quang hoặc hóa phát quang của chất nền. Các kỹ thuật để định lượng sự thay đổi về phát huỳnh quang được mô tả ở trên. Chất nền hóa phát quang trở nên bị kích thích điện tử bởi phản ứng hóa học và sau đó có thể phát ra ánh sáng có thể đo được, ví dụ, bằng cách sử dụng máy đo hóa phát quang, hoặc cho năng lượng cho thiết bị nhận huỳnh quang.

Ví dụ về chất đánh dấu enzym bao gồm luciferaza như đom đóm luciferaza và luciferaza vi khuẩn (patent Mỹ số 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazindion, malat dehydrogenaza, ureaza, peroxidaza như peroxidaza cây cải ngựa (HRPO), phosphataza kiềm,  $\beta$ -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza (như glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza), oxidaza dị vòng (như uricaza và xanthin oxidaza), lactoperoxidaza, microperoxidaza, và các loại tương tự. Các kỹ thuật để liên hợp enzym với kháng thể được mô tả, ví dụ, trong O'Sullivan et al., 1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

Các ví dụ về tổ hợp enzym-chất nền bao gồm, ví dụ: Peroxidaza cây cải ngựa (HRPO) với hydro peroxidaza làm chất nền, trong đó hydro peroxidaza oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như orthophenylen diamin (OPD) hoặc 3,3',5,5'-tetrametyl benzidin hydroclorua (TMB); phosphataza kiềm (AP) với para-Nitrophenyl phosphat làm chất nền sinh màu; và  $\beta$ -D-galactosidaza ( $\beta$ -D-Gal) với chất nền sinh màu như p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosidaza hoặc chất nền sinh huỳnh quang 4-metylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosidaza.

Nhiều tổ hợp enzym-chất nền khác là có sẵn đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Để đánh giá chung về chúng, xem patent Mỹ số 4,275,149 và patent Mỹ số 4,318,980.

Theo một phương án khác, kháng thể kháng TrkB được sử dụng không được đánh dấu và được phát hiện bằng kháng thể được đánh dấu mà gắn kết với kháng thể kháng TrkB.

Các kháng thể được mô tả trong tài liệu này có thể được sử dụng trong phương pháp thử nghiệm bất kỳ đã biết, như thử nghiệm liên kết cạnh tranh, thử nghiệm bán kếp trực tiếp và gián tiếp, và thử nghiệm kết tủa miễn dịch. Xem, ví dụ, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

#### Kit chẩn đoán

Kháng thể kháng TrkB có thể được sử dụng trong kit chẩn đoán, tức là, tổ hợp đóng gói của thuốc thử với các lượng được xác định trước với các hướng dẫn để thực

hiện thử nghiệm chẩn đoán. Trong trường hợp kháng thể được đánh dấu bằng enzym, kit có thể bao gồm các chất nền và đồng yếu tố được yêu cầu bởi enzym như tiền chất nền để tạo ra nhóm mang màu hoặc nhóm mang huỳnh quang có thể phát hiện được. Ngoài ra, các chất phụ gia khác có thể được bao gồm như chất ổn định, chất đệm (ví dụ, đệm khối hoặc đệm dung giải), và các chất tương tự. Lượng tương đối của các thuốc thử khác nhau có thể được thay đổi nhiều để tạo ra các nồng độ trong dung dịch thuốc thử tối ưu hóa đáng kể độ nhạy của thử nghiệm. Các thuốc thử có thể được cung cấp dưới dạng bột khô, thường được làm đông khô, bao gồm các tá dược mà khi hòa tan sẽ cung cấp dung dịch thuốc thử có nồng độ thích hợp.

#### Ứng dụng trị liệu & các rối loạn liên quan đến TrkB

Theo một phương án khác, kháng thể kháng TrkB (hoặc đoạn chức năng của chúng) được bộc lộ ở đây là hữu ích trong việc điều trị các rối loạn khác nhau liên quan đến sự biểu hiện của TrkB như được mô tả trong tài liệu này.

Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được sử dụng bằng đường thích hợp bất kỳ, bao gồm trong dịch kính, đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong màng bụng, trong phổi, và trong mũi. Truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm sử dụng trong bắp, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Ngoài ra, kháng thể kháng TrkB được sử dụng thích hợp bằng cách truyền từng đợt, đặc biệt với các liệu kháng thể giảm dần. Theo một khía cạnh, liệu được dùng bằng cách tiêm, tốt nhất là tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tùy thuộc một phần vào việc dùng thuốc ngắn ngày hay mạn tính. Tốt hơn, nếu kháng thể kháng TrkB được dùng bằng cách tiêm trong dịch kính vào mắt.

Để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, liều dùng thích hợp của kháng thể sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loại bệnh được điều trị, như được xác định ở trên, mức độ nặng và diễn biến của bệnh, kháng thể được dùng cho các mục đích phòng ngừa hay chữa bệnh, liệu pháp điều trị trước đây, tiền sử lâm sàng và sự đáp ứng với kháng thể của bệnh nhân, và sự xem xét của bác sĩ điều trị. Kháng thể được dùng một cách thích hợp đối với bệnh nhân ở một thời điểm hoặc trong nhiều lần điều trị.

Thuật ngữ “sự chặn” được sử dụng ở đây trong cùng bối cảnh với “sự cải thiện” và “sự giảm nhẹ” có nghĩa là làm giảm hoặc giảm bớt một hoặc nhiều đặc điểm của bệnh.

Chế phẩm kháng thể sẽ được bào chế, định lượng, và sử dụng theo cách phù hợp với thực hành y tế tốt. Các yếu tố cần xem xét trong bối cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể đang được điều trị, động vật có vú cụ thể đang được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối tác nhân, phương pháp sử dụng, phác đồ sử dụng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sĩ. "Lượng có hiệu lực điều trị" của kháng thể được sử dụng sẽ bị chi phối bởi những cân nhắc đó, và là lượng tối thiểu cần thiết để ngăn ngừa, cải thiện, hoặc điều trị rối loạn liên quan đến sự biểu hiện TrkB.

Kháng thể không cần phải, nhưng có thể tùy ý, được bào chế với một hoặc nhiều tác nhân hiện được dùng để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn liên quan. Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác như vậy phụ thuộc vào lượng kháng thể kháng TrkB có trong công thức bào chế, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận ở trên. Các chất này thường được dùng với liều giống như và với các kiểu đường dùng như được sử dụng ở đây hoặc từ khoảng 1 đến 99% liều được dùng nêu trên.

Các kháng thể kháng TrkB chủ vận theo sáng chế kích thích việc truyền tín hiệu TrkB. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, cho rằng việc truyền tín hiệu TrkB có lợi để bảo vệ các tế bào cảm quang, các tế bào thần kinh võng mạc khác bao gồm các tế bào hạch và tế bào biểu mô sắc tố võng mạc khỏi sự chết tế bào ở võng mạc. Do đó, các kháng thể kháng TrkB chủ vận có thể bảo vệ các tế bào thần kinh võng mạc như tế bào cảm quang khỏi sự thoái hóa, tức là ngăn ngừa thoái hóa thần kinh, và cũng làm tăng sự sống và/hoặc tính dẻo của tế bào thần kinh, cuối cùng chống lại sự suy giảm thị lực liên quan đến hoạt tính của TrkB giảm và/hoặc sự căng thẳng tế bào hoặc hoạt tính chết tế bào tăng. Do đó, các kháng thể này là hữu ích để điều trị các bệnh về mắt hoặc võng mạc, đặc biệt là các bệnh về mắt hoặc võng mạc do thoái hóa thần kinh. Các bệnh này bao gồm nhưng không giới hạn ở thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng mạn tính tiến triển, bệnh võng mạc do đái tháo đường, phù hoàng điểm do đái tháo đường, viêm võng mạc sắc tố, loạn dưỡng võng mạc do di truyền, loạn dưỡng điểm vàng do di truyền, bệnh thoái hóa do cận thị, tắc tĩnh mạch võng mạc, tắc động mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng bồ đào, phù hoàng điểm, màng tân mạch màng mạch thứ phát sau bệnh võng mạc bất kỳ, bệnh thần kinh thị giác, bệnh tăng nhãn áp, bong võng mạc, bệnh võng mạc do nhiễm độc, bệnh võng mạc do phóng xạ, và bệnh lý võng mạc do chấn thương.

Các kháng thể này còn hữu ích để điều trị các bệnh thuộc hệ thần kinh trung ương như bệnh Alzheimer tiền triệu chứng và nhẹ đến trung bình, làm chậm tiến triển bệnh của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer, bệnh Huntington, bệnh Parkinson, rối loạn trầm cảm chính, bệnh tâm thần phân liệt, suy giảm nhận thức liên quan đến bệnh tâm thần phân liệt, phòng ngừa rối loạn tâm thần giai đoạn đầu ở những người mắc hội chứng rối loạn tâm thần suy giảm, phòng ngừa tái phát ở bệnh nhân tâm thần phân liệt hoặc trầm cảm kháng trị.

Theo một phương án khác, các kháng thể có thể hữu ích trong điều trị mất thính lực, đặc biệt là đối với mất thính lực do cis platin cũng như mất thính lực liên quan đến tiếng ồn và tuổi tác.

Đặc biệt, các kháng thể kháng TrkB chủ vận theo sáng chế được chỉ định để điều trị bệnh vồng mạc do đái tháo đường không tăng sinh và/hoặc tăng sinh và/hoặc phù hoàng điểm do đái tháo đường ngoài tiêu chuẩn chăm sóc: Rối loạn chức năng của các tế bào thần kinh vồng mạc và thoái hóa thần kinh là một trong những sự kiện bệnh lý chính trong bệnh vồng mạc do đái tháo đường và phù hoàng điểm đái tháo đường (ở tất cả các giai đoạn của bệnh) mà cuối cùng gây ra mất thị lực và rối loạn chức năng thị giác. Hoạt hóa TrkB sẽ chống lại sự mất và suy giảm chức năng của các tế bào thần kinh vồng mạc và do đó giúp duy trì thị lực bình thường, giảm sự mất chức năng thị giác trong bệnh và có khả năng giúp lấy lại chức năng thị giác.

Hơn nữa, có khả năng sử dụng sự hoạt hóa TrkB như một phần bổ sung để điều trị kháng VEGF, điều này sẽ giúp tăng cường đáng kể lợi ích điều trị sau này vì thuốc kháng VEGF chỉ nhắm vào rối loạn chức năng mạch máu trong mắt chứ không phải hệ thống tế bào thần kinh/thần kinh đệm; ngoài ra, điều trị kháng VEGF lâu dài có thể gây ra tác dụng phụ thoái hóa thần kinh. Cách tiếp cận hoạt hóa TrkB như một phần bổ sung cho kháng VEGF sẽ làm giảm tác dụng phụ thoái hóa thần kinh như vậy.

Các kháng thể kháng TrkB hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng đặc biệt hữu ích để điều trị hoặc ngăn ngừa các rối loạn vồng mạc, như bệnh vồng mạc do đái tháo đường, phù hoàng điểm đái tháo đường, thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính và bệnh tăng nhãn áp.

Theo một khía cạnh khác, các kháng thể kháng TrkB hoặc các đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng cũng hữu ích trong điều trị các bệnh chuyển hóa như chứng ăn nhiều, béo phì và hội chứng chuyển hóa.

Theo một khía cạnh khác, các kháng thể TrkB theo sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa rối loạn liên quan đến TrkB, đặc biệt là bệnh thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính, bao gồm việc sử dụng lượng có hiệu lực điều trị của kháng thể TrkB theo sáng chế cho cá nhân bị bệnh thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính, nhờ đó cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính.

Theo một khía cạnh khác nữa, các kháng thể TrkB chủ vận có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa bệnh thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính, bao gồm việc sử dụng lượng có hiệu lực điều trị của kháng thể TrkB chủ vận cho cá nhân bị bệnh thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính, nhờ đó cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh thoái hóa điểm vàng tiến triển mạn tính.

#### Dược phẩm và cách dùng

Chế phẩm chứa kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng cho đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh về mắt hoặc võng mạc. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng để sản xuất thuốc để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh TrkB. Thuật ngữ "đối tượng" như được sử dụng ở đây nghĩa là động vật có vú bất kỳ mà kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng cho, bao gồm, ví dụ, động vật có vú là người và không phải người, như động vật linh trưởng, loài gặm nhấm và chó. Các đối tượng được dự định cụ thể để điều trị bằng các phương pháp được mô tả trong tài liệu này bao gồm người. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chế phẩm khác.

Các kháng thể được ưu tiên sử dụng trong các dược phẩm này là các kháng thể bao gồm các đoạn kháng thể hoặc kháng thể được làm giống như của người có chuỗi nhẹ biến đổi và trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi của SEQ ID NO: 2 và 12, hoặc 3 và 13, hoặc 4 và 14, hoặc 5 và 15, hoặc 6 và 16, hoặc 7 và 17, hoặc 8 và 18, hoặc 9 và 19, hoặc 10 và 20, tương ứng.

Cũng được dự tính là các kháng thể để sử dụng trong các dược phẩm bao gồm các đoạn kháng thể hoặc kháng thể được làm giống như của người có chuỗi nhẹ biến đổi và trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và 12, hoặc 3 và 13, hoặc 4 và 14, hoặc 5 và 15, hoặc 6 và 16, hoặc 7 và 17, hoặc 8 và 18, hoặc 9 và 19, hoặc 10 và 20, tương ứng.

Các kháng thể được ưu tiên khác để sử dụng trong các dược phẩm này là các kháng thể bao gồm các đoạn kháng thể hoặc kháng thể được làm giống như của người có chuỗi nhẹ và trình tự axit amin của chuỗi nặng của SEQ ID NO: 21 và 22 hoặc 23, 24 và 25 hoặc 26; 27 và 28 hoặc 29; 30 và 31 hoặc 32; 33 và 34 hoặc 35; 36 và 37 hoặc 38; 39 và 40 hoặc 41; 42 và 43 hoặc 44; 45 và 46 hoặc 47, tương ứng.

Các kháng thể được ưu tiên khác để sử dụng trong các dược phẩm bao gồm các đoạn kháng thể hoặc kháng thể được làm giống như của người có chuỗi nhẹ và trình tự axit amin của chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và 22 hoặc 23, 24 và 25 hoặc 26; 27 và 28 hoặc 29; 30 và 31 hoặc 32; 33 và 34 hoặc 35; 36 và 37 hoặc 38; 39 và 40 hoặc 41; 42 và 43 hoặc 44; 45 và 46 hoặc 47, tương ứng.

Cần phải hiểu rằng trong các kháng thể kháng TrkB và các đoạn kháng thể nói trên, trình tự axit amin của CDR vẫn không thay đổi nhưng các vùng xung quanh, ví dụ, các vùng FR có thể được thao tác di truyền.

Các hệ thống phân phối khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để phân phối kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng. Các phương pháp để đưa vào bao gồm nhưng không giới hạn ở, trong dịch kính, thuốc nhỏ mắt, trong da, trong bắp, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, ngoài màng cứng và đường uống. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách truyền, tiêm liều cao hoặc tiêm, và có thể được sử dụng cùng với các hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ. Theo các phương án được ưu tiên, việc sử dụng là bằng cách tiêm trong dịch kính. Các chế phẩm phối chế cho việc tiêm như vậy có thể được chuẩn bị, ví dụ, trong ống tiêm đã được nạp sẵn.

Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng ở dạng dược phẩm chứa lượng có hiệu lực điều trị của kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và một hoặc nhiều thành phần tương thích về mặt dược.

Theo các phương án thông thường, dược phẩm được phối chế theo các quy trình thông thường ở dạng dược phẩm thích hợp để dùng theo đường tĩnh mạch hoặc dưới da cho người. Điển hình, chế phẩm để dùng theo đường tĩnh mạch là dung dịch trong dung dịch nước đệm đẳng trương vô khuẩn. Khi cần, dược phẩm cũng có thể bao gồm các chất hòa tan và chất gây tê cục bộ như lignocain để làm giảm đau ở vị trí tiêm. Thông thường, các thành phần được cung cấp riêng biệt hoặc kết hợp cùng nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ, ở dạng bột đông khô hoặc dạng cô đặc không chứa nước trong đồ chứa gắn kín như ống nhỏ hoặc gói chỉ rõ lượng hoạt chất. Trường hợp dược phẩm cần được dùng theo đường truyền, nó có thể được phân tán trong chai truyền chứa nước hoặc nước muối loại dược dụng vô khuẩn. Trường hợp dược phẩm được dùng theo đường tiêm, ống nhỏ chứa nước để tiêm vô khuẩn hoặc nước muối có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được kết hợp trước khi dùng.

Hơn nữa, dược phẩm có thể được cung cấp dưới dạng một bộ kit dược bao gồm (a) đồ chứa có chứa kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng ở dạng đông khô và (b) đồ chứa thứ hai có chứa chất pha loãng dược dụng (ví dụ, nước vô trùng) để tiêm. Chất pha loãng dược dụng có thể được sử dụng để hoàn nguyên hoặc pha loãng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng đã được đông khô. Tùy ý kèm theo (các) vật chứa như vậy có thể là chú ý ở dạng yêu cầu bởi cơ quan quản lý quy định việc bào chế, sử dụng hoặc bán các sản phẩm dược hoặc sinh học, mà chú ý này thể hiện sự phê chuẩn của cơ quan về việc sản xuất, sử dụng hoặc bán để dùng cho người.

Lượng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng là hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa rối loạn liên quan đến TrkB có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng chuẩn. Ngoài ra, các thử nghiệm in vitro có thể được sử dụng tùy ý để giúp xác định khoảng liều lượng tối ưu. Liều chính xác được sử dụng trong chế phẩm phối chế cũng sẽ phụ thuộc vào đường dùng và giai đoạn rối loạn, và nên được quyết định theo phán đoán của bác sĩ và từng trường hợp của bệnh nhân. Các

liều hữu hiệu có thể được ngoại suy từ các đường cong đáp ứng liều có nguồn gốc từ các hệ thống thử nghiệm mô hình in vitro hoặc động vật.

Ví dụ, độc tính và hiệu quả điều trị của kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn kháng nguyên của chúng có thể được xác định trong nuôi cấy tế bào hoặc động vật thí nghiệm bằng các quy trình được tiêu chuẩn để xác định ED50 (liều có hiệu lực điều trị trong 50% quần thể). Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng thể hiện chỉ số điều trị lớn là được ưu tiên.

Số liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu trên động vật có thể được sử dụng trong việc phối chế khoảng liều để sử dụng cho người. Liều lượng của kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng thường nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn bao gồm ED50 với ít hoặc không có độc tính. Liều lượng này có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liều lượng được sử dụng và cách dùng. Đối với kháng thể kháng TrkB bất kỳ hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được sử dụng trong phương pháp này, liều có hiệu lực điều trị có thể được ước tính ban đầu từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều có thể được phối chế trong các mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ trong huyết tương tuần hoàn bao gồm IC50 (tức là, nồng độ của hợp chất thử nghiệm đạt được sự ức chế các triệu chứng bán tối đa) như được xác định trong nuôi cấy tế bào. Thông tin này có thể được sử dụng để xác định một cách chính xác hơn các liều hữu dụng ở người. Các mức trong huyết tương có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sắc ký lỏng tính năng cao, ELISA và tương tự.

Để tiêm trong dịch kính kháng thể TrkB, thường thì khoảng thời gian dài hơn giữa các lần điều trị là được ưu tiên. Do hiệu lực được cải thiện, các kháng thể TrkB của sáng chế có thể được sử dụng trong khoảng thời gian dài hơn.

Theo một phương án, kháng thể TrkB được sử dụng 6 tuần một lần, tốt hơn là 7 tuần một lần, cũng được ưu tiên là 8 tuần một lần, được ưu tiên hơn là 9 tuần một lần, được ưu tiên hơn là 10 tuần một lần, được ưu tiên hơn nữa là 11 tuần một lần và được ưu tiên hơn là 12 tuần một lần. Theo một phương án được ưu tiên khác, kháng thể TrkB được sử dụng 3 tháng một lần.

Theo một phương án, kháng thể TrkB được sử dụng cho đối tượng có nhu cầu điều trị với liều ban đầu là 1-2000 mg. Theo một phương án khác, tùy ý sử dụng một hoặc nhiều liều tiếp theo, mỗi liều bao gồm 1-2000 mg kháng thể TrkB.

Vì thể tích có thể được sử dụng cho mắt bị hạn chế nghiêm ngặt, điều rất quan trọng là kháng thể kháng TrkB có thể được phối chế ở nồng độ cao. Hơn nữa, hiệu lực của kháng thể kháng TrkB có tầm quan trọng lớn vì kháng thể hữu hiệu có thể phát huy tác dụng của nó ở liều thấp hơn và do đó kéo dài hoạt tính và cả khoảng thời gian giữa các lần điều trị.

Kháng thể theo sáng chế có thể được phối chế ở các liều rất cao mà bao gồm, nhưng không giới hạn ở 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, hoặc 100 mg/ml.

Liều thông thường có thể được sử dụng cho bệnh nhân là khoảng 3 mg/mắt. Các thành phần đệm điển hình có thể được sử dụng cho chế phẩm phối chế như vậy bao gồm, ví dụ, Natri Axetat, PS20 và Trehaloza Dihydrat.

Theo một phương án, kháng thể kháng TrkB được phối chế với đệm histidin 10 mM, sucroza 240 mM, 0,02% khối lượng/thể tích polysorbat 20 ở độ pH 5,5 với nồng độ protein cuối là 60 mg/mL.

Theo một số phương án, các dược phẩm bao gồm kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng còn có thể bao gồm tác nhân trị liệu, liên hợp hoặc không liên hợp với tác nhân liên kết. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng có thể được dùng đồng thời kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến TrkB. Ví dụ, liệu pháp kết hợp có thể bao gồm kháng-VEGF, kháng-PDGF, hoặc kháng-ANG2.

Việc sử dụng liệu pháp kết hợp như vậy có thể có tác dụng phụ hoặc hiệp đồng đối với các thông số bệnh (ví dụ, mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, số lượng triệu chứng, hoặc tần suất tái phát).

Đối với các phác đồ trị liệu cho việc sử dụng phối hợp, theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng được sử dụng đồng thời với một tác nhân trị liệu. Theo một phương án cụ thể khác, tác nhân trị liệu được sử dụng trước hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết

kháng nguyên của chúng, ít nhất một giờ và đến vài tháng, ví dụ ít nhất một giờ, năm giờ, 12 giờ, một ngày, một tuần, một tháng hoặc ba tháng, trước hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

#### Vật phẩm sản xuất

Theo một khía cạnh khác, vật phẩm sản xuất có chứa các vật liệu hữu ích để điều trị các rối loạn được mô tả ở trên được bao gồm. Vật phẩm sản xuất bao gồm đồ chứa và nhãn. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi lanh, và ống nghiệm. Các đồ chứa có thể được tạo ra từ nhiều vật liệu như thủy tinh hoặc chất dẻo. Đồ chứa giữ chế phẩm hữu hiệu để điều trị tình trạng bệnh và có thể có lỗ nạp vô trùng. Ví dụ, đồ chứa có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút mà có thể chọc thủng được bằng kim tiêm dưới da. Các hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng. Nhãn ở trên hoặc được kết hợp với đồ chứa chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lựa chọn. Vật phẩm sản xuất có thể bao gồm thêm đồ chứa thứ hai bao gồm dung dịch đệm được dùng, như nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Vật phẩm sản xuất có thể bao gồm thêm các nguyên liệu khác theo nhu cầu thương mại hoặc của người dùng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, chất độn, kim, xi lanh, và tờ rời trong bao gói với hướng dẫn sử dụng.

Sáng chế được mô tả thêm bằng các ví dụ sau, các ví dụ này không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế.

#### Ví dụ thực hiện sáng chế

##### 1. Tạo kháng thể (tạo miễn dịch)

Các tế bào B từ chuột thông qua chiến dịch tiêm chủng đã được sàng lọc bằng công nghệ nền tảng tế bào B đơn phát triển nội bộ. Chất kết dính kháng TrkB được thu hẹp tiếp sau khi thử nghiệm về hoạt tính, hiệu quả và hiệu lực trong xét nghiệm phosphoryl hóa in vitro TrkB.

##### 2. Sản xuất các kháng thể được làm giống như của người

Đoạn dẫn đầu D003 của chuột được chọn để tối ưu hóa hơn nữa. Đoạn dẫn đầu của chuột có chuỗi nhẹ biến đổi tương ứng với ID SEQ NO: 1 và chuỗi nặng biến đổi tương ứng với SEQ ID NO: 11.

Để tối ưu hóa trình tự đoạn dẫn đầu D003 của chuột TrkB, các trình tự kháng thể dòng mầm tương tự nhất của người được chọn, IGKV4-1\*01, KJ2 cho chuỗi nhẹ và IGHV1-46\*03, HJ6 cho chuỗi nặng. Một thư viện các biến thể đã được tạo ra. Điều này dẫn đến các trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ được làm giống như của người của SEQ ID NO: 2-10 và trình tự biến đổi của chuỗi nặng của SEQ ID NO: 12-20.

Bảng 2:

|                                                               |               |
|---------------------------------------------------------------|---------------|
| 277-gr_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 2  |
| 277-33_VL: chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 3  |
| 277-35_VL: chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 4  |
| 277-42_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 5  |
| 277-44_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 6  |
| 277-48_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 7  |
| 277-51_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 8  |
| 277-64_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 9  |
| 277-67_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)  | SEQ ID NO: 10 |
| 277-gr_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 12 |
| 277-33_VH: chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 13 |
| 277-35_VH: chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 14 |
| 277-42_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 15 |
| 277-44_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 16 |
| 277-48_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 17 |
| 277-51_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 18 |
| 277-64_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 19 |
| 277-67_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người) | SEQ ID NO: 20 |

Các kháng thể được làm giống như của người làm ví dụ theo sáng chế là các kháng thể có các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được nêu trong bảng dưới đây. IgG1-KO có hai đột biến trong vùng Fc, Leu234Ala và Leu235Ala để làm giảm chức năng tác động.

Bảng 3:

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 277-gr (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 21 |
| 277-gr (chuỗi nặng, IgG1)    | 22 |
| 277-gr (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 23 |
| 277-33 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 24 |
| 277-33 (chuỗi nặng, IgG1)    | 25 |
| 277-33 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 26 |
| 277-35 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 27 |
| 277-35 (chuỗi nặng, IgG1)    | 28 |
| 277-35 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 29 |
| 277-42 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 30 |
| 277-42 (chuỗi nặng, IgG1)    | 31 |
| 277-42 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 32 |
| 277-44 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 33 |
| 277-44 (chuỗi nặng, IgG1)    | 34 |
| 277-44 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 35 |
| 277-48 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 36 |
| 277-48 (chuỗi nặng, IgG1)    | 37 |
| 277-48 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 38 |
| 277-51 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 39 |
| 277-51 (chuỗi nặng, IgG1)    | 40 |
| 277-51 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 41 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 277-64 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 42 |
| 277-64 (chuỗi nặng, IgG1)    | 43 |
| 277-64 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 44 |
| 277-67 (chuỗi nhẹ, IgG1)     | 45 |
| 277-67 (chuỗi nặng, IgG1)    | 46 |
| 277-67 (chuỗi nặng, IgG1-KO) | 47 |
| 277 L-CDR1                   | 48 |
| 277 L-CDR2                   | 49 |
| 277 L-CDR3                   | 50 |
| 277 H-CDR1                   | 51 |
| 277 H-CDR2                   | 52 |
| 277 H-CDR3                   | 53 |

### 3. Thông tin epitop

#### Nguyên liệu

Nước (Sigma Aldrich, P/N 37877-4L)

Axetonitril (Sigma Aldrich, P/N 34998-4L)

Axit formic (Fluka, P/N 94318)

Ure (Sigma Aldrich, P/N 51456-500G)

TCEP-HCl – 10 g (Thermo Scientific - Pierce, P/N 20491)

Natri hydrophosphat (Sigma Aldrich, P/N S7907-100G)

Natri dihydrophosphat (Sigma Aldrich, P/N S8282 – 500G)

Tiền cột ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 5 mm (Waters Technologies Corp, 186003975)

Cột pepsin được cố định bằng Poroszyme®, 2,1 mm x 30 mm (Life Technologies Corp, 2313100)

Cột Acquity UPLC BEH C18 1,7um, 1mm X 50 mm (Waters, 186002344)

Dung môi A: 0,1% Axit formic /99% nước /1% Axetonitril

Dung môi B: 0,1% Axit formic /5% nước /95% Axetonitril

Dung dịch đệm nước: H<sub>2</sub>O 10 mM natri phosphat pH 7,4

Dung dịch đệm đơteri: D<sub>2</sub>O 10 mM natri phosphat pH 7,4

Dung dịch đệm làm ngừng: nước 8 M Ure, 0,4M TCEP-HCl

Trong các mẫu đối chứng lập bản đồ epitop, kháng nguyên được chạy cùng hoặc không cùng kháng thể. Để xác định danh sách peptit kháng nguyên, đầu tiên quy trình này được chạy bằng cách sử dụng dung dịch đệm nước thay cho dung dịch đệm đơteri. 4 uL mẫu được trộn với 40 uL dung dịch đệm đơteri. Hỗn hợp này được ủ ở 20°C trong nhiều thời điểm (1, 2, và 4 phút). Sau đó, 40 uL hỗn hợp được chuyển vào 40 uL dung dịch đệm làm ngừng 4°C (4M Ure, 0,4M Tcep-HCl) và trộn. 60 uL protein làm ngừng được tiêm, trong đó nó được tiêu thụ trên cột pepsin trong 2 phút nhờ dòng chảy 200 uL/mL dung môi A: 0,1% Axit formic /99% nước /1% Axetonitril. Các peptit tiếp theo được khử muối trên tiền cột Vanguard trong 3 phút. Các peptit tiêu hóa được gửi đến cột pha đảo BEH C18 bên trong khoang kiểm soát nhiệt độ cột/van. Hệ dung môi gradien gồm dung môi A: 0,1% Axit formic /99% nước /1% Axetonitril và dung môi B: 0,1% Axit formic /5% nước /95% Axetonitril được sử dụng. Tỷ lệ phần trăm của dung môi B được tăng từ 10% đến 15% với 5,1 phút, đến 50% với 11 phút, đến 90% với 11,5 phút được giữ đến 12,5 phút, đến 0% B với 13 phút được giữ đến 14 phút. Sự phân tách sắc ký diễn ra ở 4°C với tốc độ dòng 180 µl/phút. Sau khi tách sắc ký, mẫu được đưa vào quang phổ kế khối lượng Thermo Science Orbitrap Fusion hoạt động ở chế độ ion hóa phun điện tử dương. Phương pháp được sử dụng bao gồm các loại hoạt hóa CID và ETD khi xác định các peptit đối chứng, sử dụng độ phân giải 120.000, tín hiệu tối thiểu 10.000, độ rộng tách là 1.0 và năng lượng va chạm được chuẩn hóa là 35,0V. Mức RF của ống kính S được đặt ở mức 60%. Đối với loại thu thập dữ liệu peptit đối chứng là profin cho toàn bộ quét MS và centroid cho dữ liệu CID MS/MS. Đối với các mẫu đơteri hóa, không có MS/MS được thu thập. Dữ liệu được thu thập trong phạm vi khối lượng 280-1800 Da. Để phân tích dữ liệu phân mảnh LC-MS/MS thô, các mẫu đối chứng (với CID và ETD MS/MS) được phân tích bằng

Proteome Discover 1.4 (Thermo Science) và PMi Byonic (Protein Metrics) theo trình tự đã cho để tạo danh sách các peptit và thời gian lưu giữ. Các tệp dữ liệu thô được xử lý trước và chuyển đổi sang định dạng ASCII bằng phần mềm SHARC độc quyền nội bộ. Các peptit được xác định sau đó được khớp và tóm tắt bằng phần mềm SHAFT độc quyền nội bộ. Epitop được xác định bởi sự khác biệt về dịch chuyển khối lượng trung bình gây ra bởi sự gắn kết sau khi đánh dấu đoteri. Ở cấp độ peptit, sự bảo vệ lớn hơn 0,4 Da được coi là đáng kể.

Kết quả lập bản đồ epitop được thể hiện đối với BDNF, các kháng thể 277, (C2) (US20100196390), và (C20) (US20100150914) trên FIG.1. Các vị trí gắn kết đặc hiệu cho từng phân tử với miền ngoại bào của TrkB người với SEQ ID NO: 54 được đánh dấu bằng màu xám đậm. So với BDNF phối tử tự nhiên, các kháng thể 277 gắn kết với các epitop mới dễ nhận thấy.

#### 4. Gánh nặng trình tự trong các CDR

Trình tự của CDR được kiểm tra về sự có mặt đối với gánh nặng tiềm ẩn bất kỳ như các vị trí glycosyl hóa, các motif khử amit mạnh (NG, NS, NH, NA, ND, NT, NN), motif đồng phân hóa aspartat (DG), motif phân mảnh (DG, DS), xystein. Các axit amin hoặc motif này có thể trải qua phản ứng hóa học và tạo ra sự không đồng nhất không mong muốn cho sản phẩm, cùng với khả năng tác động tiêu cực đến liên kết và chức năng của mục tiêu. Vì những lý do này, ưu tiên loại bỏ các axit amin hoặc motif như vậy (nếu có) khỏi CDR.

Các CDR của các trình tự được làm giống như của người và đoạn dẫn đầu của chuỗi là không có các motif gánh nặng tiềm ẩn này.

Bảng 4

| Kháng thể | D003/277 | C2 | C20 | 29D7 hoặc TAM-163 |
|-----------|----------|----|-----|-------------------|
| Gánh nặng | 0        | 2  | 3   | 6                 |

#### 5. Tính sinh miễn dịch

Tính sinh miễn dịch của các trình tự được đánh giá in silico với thuật toán được cung cấp thông qua li-xăng của công ty Epivax. Điểm EpiMatrix Treg-adj có tính đến các epitop tế bào T và epitop Treg. Điểm sinh miễn dịch càng thấp, trình tự miễn dịch càng ít. Nhìn chung, điểm số âm tính được coi là nguy cơ miễn dịch thấp, trong khi điểm dương tính được xem là dấu hiệu cho tính sinh miễn dịch tiềm năng.

Bảng 5:

| VL        | Điểm Epivax | VH        | Điểm Epivax |
|-----------|-------------|-----------|-------------|
| 277-gr_VL | -24         | 277-gr_VH | -46         |
| 277-33_VL | -31         | 277-33_VH | -32         |
| 277-35_VL | -31         | 277-35_VH | -26         |
| 277-42_VL | -27         | 277-42_VH | -26         |
| 277-44_VL | -14         | 277-44_VH | -49         |
| 277-48_VL | -24         | 277-48_VH | -29         |
| 277-51_VL | -31         | 277-51_VH | -22         |
| 277-64_VL | -28         | 277-64_VH | -44         |
| 277-67_VL | -14         | 277-67_VH | -44         |
| C2_VL     | -2          | C2_VH     | -21         |
| C20_VL    | +9          | C20_VH    | +20         |
| TAM163_VL | -51         | TAM163_VH | -19         |

## 6. Ái lực:

Kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance-SPR) được sử dụng để xác định ái lực gắn kết của kháng thể 277, C2 (US20100196390), và C20 (US20100150914), và TAM-163 (WO2015173756) với Hu-TrkB-His. Thí nghiệm được thực hiện trên dụng cụ ProteOn XPR36.

Phương pháp: Dung dịch đệm chạy cho thí nghiệm này và tất cả các dịch pha loãng (trừ trường hợp đã nêu) được thực hiện trong PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20

[100  $\mu$ l 100% Tween20 được bổ sung vào 2L PBS-T-EDTA để tạo thành nồng độ Tween 20 cuối là 0,01%]. Chip cảm biến GLM được chuẩn hóa và được điều hòa trước theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Chip cảm biến được hoạt hóa với hỗn hợp bằng nhau của EDC/s-NHS theo hướng nằm ngang trong 300 giây với tốc độ dòng 30  $\mu$ l/phút và được làm bất động với Protein tái tổ hợp A/G (60  $\mu$ g/ml trong 10 mM axetat pH 4,5) theo hướng nằm ngang trong 300 giây với tốc độ dòng 30  $\mu$ l/phút dẫn đến  $\sim$  7100-7130 RU Protein A/G trên bề mặt. Chip cảm biến đã bị khử hoạt tính bằng 1M etanolamin HCl theo hướng nằm ngang trong 300 giây với tốc độ dòng 30  $\mu$ l/phút. Chip cảm biến được ổn định với 18 giây axit phosphoric 0,85% với tốc độ dòng 100  $\mu$ l/phút 3 lần theo chiều ngang và 3 lần theo chiều dọc. Kháng thể 277 (0,6  $\mu$ g/ml), C2 (2,1  $\mu$ g/ml), C20 (1,2  $\mu$ g/ml), và TAM-163 (5  $\mu$ g/ml) được giữ trên bề mặt Protein A/G theo chiều dọc trong 70 giây với tốc độ dòng 30  $\mu$ l/phút dẫn đến mức giữ  $\sim$ 615, 1390, 780, và 3380 RU, tương ứng. Đường cơ sở được ổn định bằng cách tiêm PBS-T-EDTA trong 60 giây với tốc độ 100  $\mu$ l/phút theo chiều ngang và sau đó tiêm lần thứ hai PBS-T-EDTA trong 60 giây với tốc độ dòng 100  $\mu$ l/phút và phân ly 120 giây theo chiều ngang. Chất phân tích (Hu-TrkB-His) được tiêm theo chiều ngang trên kháng thể bị giữ trong 600 giây với tốc độ dòng 30  $\mu$ l/phút và phân ly trong 1800 giây. Nồng độ của các chất phân tích là 0 nM, 1,23 nM, 3,7 nM, 11,11 nM, 33,33 nM, và 100 nM. Bề mặt được tái tạo bằng cách tiêm 0,85% axit phosphoric trong 18 giây với tốc độ dòng 100  $\mu$ l/phút một lần theo chiều ngang và một lần theo chiều dọc. PBS-T-EDTA được tiêm trong 60 giây với tốc độ dòng 100  $\mu$ l/phút một lần theo chiều dọc. Các interspot (tương tác với bề mặt cảm biến) và ô trống (PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20 hoặc chất phân tích 0 nM) bị trừ khỏi dữ liệu thô. Sau đó, các biểu đồ cảm biến được khớp toàn bộ với liên kết Langmuir 1: 1 để tạo ra các giá trị tốc độ kết hợp ( $k_a$ ), phân ly ( $k_d$ ) và ái lực ( $KD$ ).

Kháng thể 277 gắn kết với Hu-TrkB-His với  $k_a$  là  $1,93 \times 10^5$  1/Ms,  $k_d$  là  $3,51 \times 10^{-4}$  1/s, và  $KD$  là 1,2 nM. C2 gắn kết với Hu-TrkB-His với  $k_a$  là  $2,32 \times 10^4$  1/Ms,  $k_d$  là  $3,39 \times 10^{-4}$  1/s, và  $KD$  là 10,5 nM. C20 gắn kết với Hu-TrkB-His với  $k_a$  là  $1,29 \times 10^5$  1/Ms,  $k_d$  là  $6,13 \times 10^{-3}$  1/s, và  $KD$  là 47,7 nM. TAM-163 không gắn kết với 100 nM Hu-TrkB-His.

Bảng 6:

| mAb                                      | TrkB người             |          |         |
|------------------------------------------|------------------------|----------|---------|
|                                          | ka (1/Ms)              | kd (1/s) | KD (nM) |
| TAM-163_kháng-TrkB                       | không gắn kết ở 100 nM |          |         |
| C20_kháng-TrkB huIgG1 khâm-KO_EX00077781 | 1,29E+05               | 6,13E-03 | 47,7    |
| kháng-TrkB C2_HuIgG1ko (EX00077780)      | 2,32E+04               | 3,39E-04 | 10,5    |
| Kháng thể kháng-TRKB 277                 | 1,93E+05               | 3,51E-04 | 1,19    |

#### 7. Sự gắn kết không đặc hiệu:

Thử nghiệm gắn kết không đặc hiệu được phát triển bằng cách sử dụng công nghệ cảm biến sinh học để xác định xem các ứng cử viên thực thể sinh học mới (new biological entity-NBE) có gắn kết đáng kể với các protein tích điện không liên quan hay không. Trong thử nghiệm này, các kháng thể được chuyển qua hai bề mặt SPR, một bề mặt được phủ protein tích điện âm không liên quan và một bề mặt được phủ protein tích điện dương không liên quan. Khi một ứng cử viên NBE hiển thị sự gắn kết không đặc hiệu đáng kể với các bề mặt này, có khả năng nguyên nhân của sự gắn kết là sự có mặt của các mảng bề mặt tích điện dương hoặc âm trên ứng cử viên. Sự gắn kết không đặc hiệu của các ứng cử viên NBE có thể chuyển thành được động học (pharmacokinetic-PK) và phân phối sinh học kém và cũng có thể có tác động sản xuất phần sản phẩm ra. Kết quả của thử nghiệm này được sử dụng trong bối cảnh đánh giá rủi ro cụ thể của dự án. Mục đích của thử nghiệm là làm giảm nguy cơ PK kém, thiếu phân phối mô đích và khó khăn trong sản xuất phần sản phẩm ra.

Mục tiêu là xác định xem liệu kháng thể 277 có biểu hiện sự gắn kết không đặc hiệu hay không bằng cách thu thập các biểu đồ cảm biến gắn kết của kháng thể 277 và so sánh với các đối chứng để chỉ định một loại gắn kết không đặc hiệu là thuận lợi (màu xanh lá cây), có thể chấp nhận được (màu vàng)), hoặc không thuận lợi (màu đỏ).

Phương pháp:

Thử nghiệm được thực hiện trên Biacore T200. Việc pha loãng, chuẩn bị bề mặt, và thử nghiệm gắn kết được thực hiện ở 25°C trong 1X dung dịch đệm HBS-EP được điều chế từ 10X HBS-EP. Tốc độ dòng chảy cho cả quy trình cố định và thử nghiệm gắn kết là 5  $\mu$ L/phút.

Để chuẩn bị bề mặt cho thử nghiệm gắn kết không đặc hiệu, chất ức chế lysozym lòng trắng trứng gà và chất ức chế trypsin loại 1-S từ đậu nành được ghép thủ công nối tiếp với chip S CM5 với mật độ bề mặt 3000-5000 RU bằng cách sử dụng bộ ghép nối amin theo hướng dẫn sản xuất. FC1 và FC2 được hoạt hóa bằng cách tiêm hỗn hợp 1:1 của EDC và NHS trong 7 phút. Bề mặt lysozym lòng trắng trứng gà được chuẩn bị trên FC2 bằng cách tiêm 150  $\mu$ g/mL lysozym lòng trắng trứng gà trong NaOAc 10 mM, pH 5,5 trong 5 phút. FC1 và FC2 bị bất hoạt bằng cách tiêm 1M etanolamin-HCl trong 7 phút. FC1 được sử dụng làm bề mặt tham chiếu. FC3 được hoạt hóa bằng cách tiêm hỗn hợp 1:1 của EDC và HNS trong 7 phút. Chất ức chế trypsin loại 1-S từ bề mặt đậu nành được điều chế trên FC3 bằng cách tiêm 300  $\mu$ g/mL chất ức chế trypsin loại 1-S từ đậu nành trong 10 mM NaOAc, đệm pH 4.0 trong 20 phút, sau đó tiêm 7 phút 1M etanolamin-HCl để bất hoạt tế bào dòng chảy. Kháng thể đa dòng kháng lysozym, kháng thể kháng chất ức chế trypsin, và đối chứng âm tính BI được sử dụng làm đối chứng trong thử nghiệm. Các đối chứng và kháng thể được chuẩn bị với 1  $\mu$ M trong 1X đệm HBS-EP. Các mẫu được tiêm trên bề mặt FC1, FC2 và FC3 với sự liên kết 10 phút và phân ly 15 phút. Các bề mặt được tái tạo giữa mỗi chu kỳ gắn kết bằng cách tiêm 1 phút 0,85% axit phosphoric và 30 giây NaOH 50 mM với tốc độ dòng 50  $\mu$ L/phút, sau đó là thời gian ổn định 2 phút với 1X đệm HBS-EP chảy qua tất cả bề mặt. Kháng thể đa dòng kháng lysozym và kháng thể kháng chất ức chế trypsin được tiêm qua FC1, FC2 và FC3 khi bắt đầu và kết thúc thử nghiệm. Dữ liệu được thu thập bằng phần mềm đối chứng Biacore T200 phiên bản 2.0.1 và được phân tích bằng phần mềm đánh giá Biacore T200 phiên bản 3.0.

Các biểu đồ cảm biến gắn kết của các kháng thể được so sánh với các biểu đồ cảm biến của đối chứng âm tính BI để xác định mức độ gắn kết không đặc hiệu với lysozym lòng trắng trứng gà và chất ức chế trypsin loại 1-S từ bề mặt đậu nành.

Dữ liệu cho thấy kháng thể 277 không gắn kết đáng kể với các protein tích điện không liên quan; cụ thể là lysozym lòng trắng trứng gà và chất ức chế trypsin loại 1-S

từ đậu nành. Kháng thể 277 được phân loại là thuận lợi (màu xanh lá cây) khi so sánh đáp ứng gắn kết và hình dạng của các đường cong liên quan đến các đối chứng. Do đó, giả thuyết rằng kháng thể 277 sẽ gây ra ít rủi ro về được động học, phân phối sinh học và sản xuất dựa trên việc nhắm sai đích của các loài tích điện.

Bảng 7:

| Mẫu                      | ~4400 RU bề mặt lysozym | ~2300 RU bề mặt chất ức chế trypsin |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Kháng thể kháng-TRKB 277 | Không gắn kết           | Không gắn kết                       |

#### 8. Hiệu lực (SY5Y) và hiệu quả

Sự biệt hóa các tế bào SH-SY5Y thành kiểu hình của tế bào thần kinh

Các tế bào SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) được nuôi cấy trong DMEM:F12 (Lonza #BE12-719F) với 15% huyết thanh bào thai bò trong bình nuôi cấy mô 175 cm<sup>2</sup> (Corning #353112). Để gieo tế bào, bình được rửa một lần bằng D-PBS (Lonza #17-512Q) và các tế bào được tách bằng dung dịch Accutase được gia nhiệt sơ bộ đến 37°C (A6964 SIGMA). Sau 3 phút ủ ở nhiệt độ trong phòng, các tế bào có thể được hút bằng pipet 10 ml và chuyển sang ống Falcon 15 ml. Các tế bào được đếm và 6000 tế bào trong 100 µl DMEM:F12 với 15% FBS mỗi lỗ được gieo vào đĩa 96 lỗ được phủ collagen-I (BD Bioscience # 354407). Các tế bào được duy trì trong thiết bị ủ được làm ẩm ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau 8 giờ, 100 µl dung dịch axit retinoic 6 µM (Sigma # R2625) được thêm vào từng lỗ. Nồng độ axit retinoic cuối cùng là 3 µM. Sau 48 giờ và 96 giờ, việc kích thích thêm axit retinoic là cần thiết. Cuối cùng, 100 µl môi trường trên mỗi lỗ được loại bỏ và 100 µl môi trường tươi với axit retinoic 6 µM được thêm vào. Sau 7 ngày biệt hóa, các tế bào SH-SY5Y có kiểu hình giống tế bào sinh dopamin và sẵn sàng để dùng.

Kích thích và dung giải các tế bào SH-SY5Y đã biệt hóa

Môi trường từ các lỗ được trao đổi với 80  $\mu$ l DMEM-F12 được gia nhiệt sơ bộ với 0,2% BSA. Đã được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút. Các peptit và kháng thể được pha loãng trong DMEM-F12 với 0,2% BSA. Tất cả các dịch pha loãng được chuẩn bị bằng các đầu hút, ống và đĩa gắn kết thấp. Các tế bào được kích thích bằng cách thêm 20  $\mu$ l peptit/kháng thể tương ứng trong 45 phút ở nhiệt độ phòng. Trong thời gian ủ, dung dịch đệm dung giải tế bào được chuẩn bị trong ống Falcon 15 ml trên băng: 1 ml 10x đệm dung giải Triton X-100 8,7 ml H<sub>2</sub>O 1 viên nén complete mini, chất ức chế proteaza 100  $\mu$ l hỗn hợp chất ức chế phosphatase 2 100  $\mu$ l hỗn hợp chất ức chế phosphatase 3 100  $\mu$ l PMSF 1 mM. Sau khi kích thích tế bào, môi trường được loại bỏ và 30  $\mu$ l dung dịch đệm lạnh băng được thêm vào mỗi lỗ. Đã được đập bằng nắp phía trên và ủ trên băng trong 20 phút. Sau đó, đĩa được trộn trên máy lắc đĩa Eppendorf với 500 vòng/phút trong 5 phút.

Đối với bước này, tất cả các nguyên liệu và dung dịch được bảo quản trên băng. Đĩa 96 lỗ với các tế bào đã dung giải được ly tâm với 235 g trong 10 giây và được bảo quản trên băng. Dung dịch đệm xét nghiệm miễn dịch AlphaLISA (PerkinElmer #AL000C) được điều chế bằng cách pha loãng 260  $\mu$ l dung dịch gốc 10 x dung dịch gốc trong 2340  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Các hạt nhận pNTRK2 (PerkinElmer # CUSM81822; các hạt được phủ bằng Perkin Elmer với kháng thể từ CellSignaling CST#4621 dòng C50F3) được pha loãng trong đệm xét nghiệm miễn dịch AlphaLISA đến nồng độ cuối là 10  $\mu$ g/ml. Kháng thể biotin NTRK2 (PerkinElmer # CUSM81820; được đánh dấu bằng Perkin Elmer với kháng thể từ CellSignaling CST=#4609 dòng C17F1 ) được pha loãng trong đệm xét nghiệm miễn dịch AlphaLISA đến nồng độ cuối là 1 nM và các hạt cho Streptavidin (PerkinElmer #6760002S) được pha loãng trong đệm xét nghiệm miễn dịch AlphaLISA đến nồng độ cuối là 20  $\mu$ g/ml. 5  $\mu$ l hạt nhận pNTRK2 và 2,5  $\mu$ l dịch phân giải tế bào trên mỗi lỗ được chuyển vào đĩa thể tích nhỏ màu trắng 384 lỗ (Greiner #784075) có đáy bằng và được ly tâm với 235 g trong 10 giây và được bảo quản trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Sau khi ủ, 2,5  $\mu$ l kháng thể biotin NTRK2 trên mỗi lỗ được thêm vào và đĩa được ly tâm với 235 g trong 10 giây và được bảo quản trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Cuối cùng, thêm 2,5  $\mu$ l hạt cho Streptavidin trên mỗi lỗ và đĩa được ly tâm với 235 g trong 10 giây và được bảo quản trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Ngay sau đó,

đĩa được đo bằng máy đọc đĩa EnVision bằng quy trình AlphaScreen (bộ lọc 570nm #244 và kính #444).

#### Xác định sự phosphoryl hóa ERK1/2

Xác định sự phosphoryl hóa ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) được thực hiện với 8µl dịch phân giải tế bào theo quy trình của nhà sản xuất (AlphaScreen SureFire p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) Kit (PerkinElmer #TGRES10k)).

#### Xác định sự phosphoryl hóa AKT1/2/3

Xác định sự phosphoryl hóa Akt 1/2/3 (Thr308) được thực hiện với 8µl dịch phân giải tế bào theo quy trình của nhà sản xuất ((AlphaScreen SureFire p-Akt 1/2/3 (Thr308) kit (PerkinElmer #TGRA3S10K))).

Một số kháng thể TrkB theo sáng chế được phân tích về tiềm năng của chúng để hoạt hóa TrkB cũng như bắt đầu truyền tín hiệu xuôi dòng. Cũng bao gồm là BDNF phối tử tự nhiên và các kháng thể C2 và C20. Các kháng thể TrkB theo sáng chế trung bình hữu hiệu hơn gấp 10 lần khi hoạt hóa TrkB so với BDNF phối tử tự nhiên. So với các kháng thể C2 và C20, các kháng thể TrkB theo sáng chế trung bình hữu hiệu hơn gấp ba đến mười lăm lần. Việc truyền tín hiệu xuôi dòng P-ERK và AKT1/2/3 hoàn toàn phù hợp với các phép đo này đối với sự hoạt hóa TrkB và cho thấy khả năng cải thiện tương tự của các kháng thể TrkB theo sáng chế.

Bảng 8:

| Hợp chất         | EC <sub>50</sub> pM [trung bình ± SD] |
|------------------|---------------------------------------|
|                  | TrkB-P                                |
| BDNF             | 430 [±254]                            |
| 277-gr (IgG1)    | 39 [±18]                              |
| 277-gr (IgG1-KO) | 46 [±27]                              |
| 277-64 (IgG1)    | 53 [±41]                              |
| 277-64 (IgG1-KO) | 44 [±23]                              |
| C2               | 134 [±72]                             |
| C20              | 654 [±180]                            |

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
|                  | p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) |
| BDNF             | 301 [ $\pm$ 279]          |
| 277-gr (IgG1)    | 30 [ $\pm$ 12]            |
| 277-gr (IgG1-KO) | 47 [ $\pm$ 42]            |
| 277-64 (IgG1)    | 38 [ $\pm$ 11]            |
| 277-64 (IgG1-KO) | 56 [ $\pm$ 72]            |
| C2               | 103 [ $\pm$ 56]           |
| C20              | 238 [ $\pm$ 36]           |
|                  | AKT 1/2/3-P (T308)        |
| BDNF             | 255 [ $\pm$ 179]          |
| 277-gr (IgG1)    | 23 [ $\pm$ 0]             |
| 277-gr (IgG1-KO) | 39 [ $\pm$ 22]            |
| 277-64 (IgG1)    | 25 [ $\pm$ 3]             |
| 277-64 (IgG1-KO) | 22 [ $\pm$ 1]             |
| C2               | 132 [ $\pm$ 76]           |
| C20              | 430 [ $\pm$ 111]          |

### 9. Biểu hiện gen

Phân tích trình tự thể hệ tiếp theo (dữ liệu không được hiển thị) được thực hiện đối với các tế bào SH-SY5Y đã biệt hóa sau khi kích thích với một số chất chủ vận TrkB. Để xác thực các kết quả, các gen đã ổn định nhất được chọn liên quan đến tính dẻo của synap và sau đó các thay đổi được phân tích lại thông qua qPCR. ARC, VGF, EGR1 là các dấu hiệu đã biết về tính dẻo của synap. Tính dẻo synap là quá trình mà các mô hình hoạt động cụ thể của synap dẫn đến sự thay đổi độ bền của synap. Trên FIG.2, sự kích thích các tế bào SH-SY5Y đã biệt hóa bằng BDNF hoặc kháng thể chủ vận làm tăng lượng biểu hiện mARN ARC, VGF, EGR1 mà có thể là dấu hiệu tăng tính dẻo của synap. Biểu hiện mARN của NTRK2 không bị ảnh hưởng bởi sự kích

thích bằng BDNF hoặc kháng thể chủ vận. Những thay đổi trong mô hình biểu hiện gây ra bởi BDNF và D003 nhìn chung rất giống nhau. Những kết quả này đã xác nhận dữ liệu từ phân tích trình tự thể hệ tiếp theo.

Cụ thể, các tế bào SH-SY5Y được biệt hóa trong 7 ngày trong đĩa nuôi cấy tế bào 6 lỗ (SIGMA # Corning CLS3516). Sau khi biệt hóa, các tế bào được kích thích trong DMEM:F12 không huyết thanh với 0,2% BSA với IgG đối chứng [10nM], BDNF [10nM] và D003 [10nM] trong 6 giờ trong thiết bị ủ được làm ấm ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Sau đó, các tế bào được rửa một lần với 1x D-PBS được gia nhiệt sơ bộ và việc phân lập mARN được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Qiagen# 74104 RNeasy Mini Kit). Việc sao chép mARN sang cADN được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Qiagen# 205310 QuantiTect Rev. Transcription Kit). cADN được sử dụng cho các thử nghiệm PCR thời gian thực TaqMan dựa trên các đầu dò 5' Nucleaza (ThermoFischer Scientific) trên hệ thống PCR thời gian thực nhanh 7900HT (Applied Biosystems). Giá trị Delta CT được tính toán dựa trên giá trị CT của ACTB (CT = 18,18).

Thử nghiệm biểu hiện gen TaqMan từ ThermoFischer Scientific:

ACTB - actin beta: Hs01060665\_g1; Cat. # 4331182

NTRK2 - tyrosin kinaza thụ thể dinh dưỡng thần kinh 2: Hs00178811\_m1; Cat. #4331182

ARC - protein liên quan đến khung tế bào được điều hòa bởi hoạt động: Hs01045540\_g1; Cat. # 4331182

VEGF - yếu tố tăng trưởng thần kinh cảm ứng: Hs00705044\_s1, Cat. # 4331182

EGR1 - phản ứng tăng trưởng sớm 1: Hs00152928\_m1; Cat. # 4331182

#### 10. Nghiên cứu động học trong dịch kính (intravitreal-ivt) của thỏ

Thỏ cái trắng New Zealand (1,7 - 2 kg khối lượng cơ thể) được thích nghi > 15 ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu. Kháng thể 277 được chuẩn bị vô trùng ở mức 20 mg/mL và 1 mg (trong 50 µL dung dịch đệm: natri axetat 60 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0) được tiêm hai bên vào dịch kính của động vật đã bị gây mê. Tại các thời điểm khác nhau, 2 động vật được cho chết êm ái và các mô mắt bao gồm thủy dịch, dịch kính và võng mạc được thu thập và đông lạnh chờ phân tích. Các mẫu máu được lấy

trên các mốc thời gian khác nhau (FIG.3), ly tâm và huyết tương được đông lạnh chờ phân tích.

Việc định lượng kháng thể được thực hiện bởi ELISA. Đối với mỗi loại mô, một đường cong hiệu chỉnh của kháng thể (ba mẫu lặp lại nằm trong khoảng từ 0,5 - 100 ng/mL) đã được chuẩn bị trong cùng một dung dịch đệm như các mẫu và được bao gồm trong mỗi đĩa. Độ hấp thụ được đo ở 405nm bằng máy đo quang phổ SpectraMax 340PC-384 và phân tích dữ liệu được thực hiện bằng SoftMaxPro6.5.

Nồng độ của kháng thể 277 được mô tả trên FIG.3 cho thấy nồng độ trong các khoang mắt khác nhau như được chỉ định và huyết tương sau khi tiêm trong dịch kính 1 mg kháng thể 277 vào mắt thỏ dưới dạng hàm theo thời gian. Thời gian bán hủy ở mắt và huyết tương được tính toán được liệt kê trong Bảng dưới đây.

Bảng 9:

| t1/2 (ngày) |           |          |             |
|-------------|-----------|----------|-------------|
| Dịch kính   | Thủy dịch | Võng mạc | Huyết tương |
| 4,9         | 4,8       | 5,2      | 7,0         |

Thời gian bán hủy được tính toán lần lượt là 4,9, 4,8, 5,2 và 7,0 ngày trong dịch kính, thủy dịch, võng mạc và huyết tương. Thời gian bán hủy này tương tự như các báo cáo trong tài liệu về kháng thể IgG1 đơn dòng tái tổ hợp được làm giống như của người được sử dụng trong lâm sàng Avastin (kháng VEGF, bevacizumab, Bakri et al., Ophthalmology, 2007), kết quả này cũng đã được xác nhận trong thực nghiệm. Những kết quả này đúng như mong đợi, vì độ thanh thải trong dịch kính của IgG có chiều dài đầy đủ phụ thuộc chủ yếu vào kích thước phân tử của chúng, là tương tự với kháng thể 277 và Avastin của chúng tôi. Do đó, PK người, bao gồm thời gian bán hủy ở mắt của kháng thể 277 và Avastin được mong đợi là tương tự nhau. Thời gian bán hủy ở mắt người được báo cáo là Avastin là  $9,73 \pm 1,48$  ngày (Hutton-Smith, 2016).

#### 11. Tần số tiêm kháng thể IgG1 trong dịch kính

Dựa trên dữ liệu in vivo thu được trong nghiên cứu dược động học (Ví dụ 10) cũng như dữ liệu về hiệu lực thu được trong các tế bào SH-SY5Y, PK ở mắt người (nồng độ trong dịch kính theo thời gian) của kháng thể IgG1 được nghiên cứu và tính

toán dựa trên động học một khoang được thiết lập tốt liên quan đến độ thanh thải trong mắt của các phân tử sinh học. Để tính toán, các tham số sau được sử dụng: thời gian bán hủy ở mắt người là  $t_{1/2} = 10$  ngày như đã báo cáo đối với Avastin và cũng được hỗ trợ bởi dữ liệu in vivo được hiển thị trong ví dụ 10; khối lượng phân tử là 149 KDa như đối với các kháng thể IgG1 có chiều dài đầy đủ, và lượng kháng thể được tiêm trong dịch kính là 1 mg (xem FIG.4). Do PK ở mắt chủ yếu được gây ra bởi khối lượng phân tử, nên thu được cùng một biểu đồ PK ở mắt cho cả năm kháng thể.

Để đánh giá tần số tiêm trong dịch kính, cho rằng hiệu quả in vivo có thể được duy trì ở nồng độ trong dịch kính  $\geq EC_{50}$  của tế bào như được xác định từ các thử nghiệm phosphoryl hóa TrkB trong các tế bào SH-SY5Y (Ví dụ 8). Thời gian sau khi tiêm trong dịch kính để đạt nồng độ trong dịch kính tương đương với  $EC_{50}$  được chỉ ra bằng các mũi tên trên FIG.4. Dựa trên sự cân nhắc này, thời gian để đạt được nồng độ trong dịch kính như vậy sau khi tiêm 1 mg kháng thể được tóm tắt trong bảng sau đây cho mỗi kháng thể:

Bảng 10:

| Hợp chất         | Thời gian sau khi tiêm trong dịch kính để đạt được $C_{\text{dịch kính}} = EC_{50}$ [ngày] |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 277-gr (IgG1)    | 154                                                                                        |
| 277-gr (IgG1-KO) | 151                                                                                        |
| 277-64 (IgG1)    | 150                                                                                        |
| 277-64 (IgG1-KO) | 152                                                                                        |
| C2               | 136                                                                                        |

Ví dụ, sau khi tiêm 1 mg C2 vào mắt người, nồng độ trong dịch kính tương ứng với  $EC_{50}$  của C2 (Bảng 10) đạt được sau 136 ngày (tức là sau 136 ngày, sẽ cần tiêm trong dịch kính tiếp). Để so sánh, trong trường hợp 277-64 (IgG1), thời gian này sẽ kéo dài đến 150 ngày sau khi tiêm trong dịch kính. Trong trường hợp này, việc tiêm trong dịch kính tiếp theo sẽ cần đến 14 ngày sau đó như đối với C2. Việc nhắm đến liều hữu hiệu tối thiểu có giá trị cao gấp 10 lần so với  $EC_{50}$  sẽ làm giảm thời gian giữa các lần tiêm trong dịch kính, tuy nhiên, sự khác biệt về thời gian trong tần suất tiêm giữa C2 và các kháng thể khác được liệt kê trong Bảng 10 ở trên sẽ vẫn là như vậy.

Thể tích tiêm có thể tiêm vào mắt bị hạn chế nghiêm ngặt. Việc tiêm lặp lại cùng một thời điểm trong mắt là cần thiết để điều trị các tình trạng bệnh của mắt. Việc cải thiện thời gian bán hủy của kháng thể là một cách để kéo dài thời gian giữa các lần tiêm nhưng như đã đề cập chủ yếu là do khối lượng phân tử của phân tử. Như đã được chứng minh in vivo trong ví dụ 10 và trong các tế bào SH-SY5Y trong ví dụ 8, bằng cách tạo ra khoảng thời gian tiêm kháng thể được cải thiện và hữu hiệu hơn có thể được mở rộng phục vụ cho bệnh nhân cần tiêm thuốc ít thường xuyên hơn vào mắt.

12. Tác dụng bảo vệ thần kinh và phục hồi thần kinh của kháng thể TrkB chủ vận ở chuột bị đái tháo đường do STZ gây ra

Không có kháng thể nào trong số các kháng thể 277 là phản ứng chéo của loài gặm nhấm, do đó, các nghiên cứu về hiệu quả và chứng minh khái niệm in vivo được thực hiện với kháng thể hoạt hóa TrkB C2 ở dạng kháng thể công cụ thay thế để kiểm tra giả thuyết rằng phương pháp tiếp cận hoạt hóa TrkB i) đem lại sự bảo vệ thần kinh ('phương pháp tiếp cận bảo vệ thần kinh') và ii) tạo ra sự tái hoạt hóa các tế bào thần kinh/mạch máu rối loạn chức năng ('phương pháp tiếp cận phục hồi'). Cả hai phương pháp tiếp cận đều được đề cập trong một vài thử nghiệm. Làm mô hình bệnh ở động vật, mô hình chuột mắc bệnh đái tháo đường do streptozotocin (STZ) gây ra được sử dụng, được đặc trưng bởi sự mất tế bào beta tuyến tụy, nồng độ insulin thấp, chứng tăng đường huyết ổn định và do đó rối loạn chức năng thần kinh ở võng mạc.

Nghiên cứu trên động vật

Chuột đực nâu Na Uy (chuột BN) được lấy từ Charles River (Đức). Động vật được nhốt trong các nhóm 2 trong IVC ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm được kiểm soát, với chu kỳ sáng/tối 12 giờ (không có ánh sáng từ 6 giờ tối đến 6 giờ sáng). Chúng được cho ăn tùy ý với khẩu phần ăn dạng viên số 3438 từ Provimi Kliba (Thụy Sĩ) và uống nước máy tự do. Động vật được cho thích nghi với môi trường của chúng trong một tuần trước khi bắt đầu nghiên cứu. Tuổi của chuột là 6-8 tuần khi bắt đầu giai đoạn sống của nghiên cứu. Chứng tăng đường huyết được gây ra bằng cách tiêm STZ (65 mg/kg khối lượng cơ thể; Sigma #S0130-1G) trong màng bụng. Động vật không đáp ứng hoặc kém đáp ứng không được đưa vào nghiên cứu, tức là động vật có nồng độ glucoza trong máu <20 mM vào ngày thứ 5 sau khi dùng STZ. Khối lượng cơ thể

và lượng glucoza trong máu được kiểm tra thường xuyên. Các động vật được dùng liều bằng cách tiêm trong dịch kính liều đơn (50 µg trong 4,6 µL) hoặc kháng thể đối chứng kháng 2,4,6-trinitrophenyl (kháng TNP) (50 µg trong 4,5 µL) vào ngày 36 sau khi dùng STZ. Chức năng võng mạc được đánh giá thông qua các lần ghi điện võng mạc (electroretinography-ERG), và động vật bị giết sau lần ghi cuối bởi quá liều pentobarbital được tiêm trong màng bụng.

#### Liều lượng và tiêm trong dịch kính

Tổng quan nghiên cứu được mô tả trên FIG.5. Để tiêm trong dịch kính, chuột được gây mê bằng 2,5-3% isofluran (Forene; Abbvie). Một giọt oxybuprocainhydrochlorid 4 mg/ml (Novesine; Omnivision) đã được sử dụng như một thuốc gây tê tại chỗ. 4,6 µL dung dịch gốc C2 (10,9 mg/mL; đệm: 20 mM natri xitrat, 115 mM NaCl, pH 6,0) được tiêm trong dịch kính vào mỗi mắt của chuột bị tăng đường huyết (nhóm 3, n=24 mắt, FIG.5), dẫn đến liều tiêm ~50 µg/mắt. Làm đối chứng, 4,5 µL dung dịch gốc kháng 2,4,6-trinitrophenyl (11,2 mg/mL; dung dịch đệm natri xitrat 20 mM, NaCl 115 mM, pH 6,0) được tiêm trong dịch kính vào mắt của chuột đối chứng bị đái tháo đường hoặc không bị đái tháo đường (nhóm 1, n = 24 mắt, và nhóm 2, n = 22 mắt, FIG.5), dẫn đến liều tiêm ~50 µg/mắt. Tiêm trong dịch kính được thực hiện dưới kính hiển vi giải phẫu. Dung dịch kháng thể được phân phối bằng kim cỡ 34 (được gắn trên ống tiêm bằng thủy tinh Hamilton 10 µl) vào dịch kính ngay phía sau rìa, và chất lượng tiêm nói chung được kiểm soát bằng phương pháp soi đáy mắt (sử dụng kính hiển vi hình ảnh võng mạc Micron IV, Phoenix Research Labs).

#### Ghi điện võng mạc

Ghi điện võng mạc (ERG) là một kỹ thuật điện sinh lý không xâm lấn để đánh giá hoạt tính điện do ánh sáng gây ra của các tế bào thần kinh võng mạc khác nhau, và cho phép định lượng các khía cạnh khác nhau của chức năng võng mạc như tầm nhìn ánh sáng mờ hoặc màu. ERG được đo dưới dạng thay đổi tiềm năng giữa giác mạc và điện cực tham chiếu bằng hệ thống ghi Espion E3 ERG (chẩn đoán LLC). Trước khi ghi ERG, động vật đã thích nghi với bóng tối trong ít nhất 2 giờ, và được gây mê bằng cách tiêm ketamine trong màng bụng (Ketanest, khoảng 100 mg/kg) và xylazin (Rompun, khoảng 5 mg/kg). Các con vật được đặt trên một bàn soi nóng để duy trì nhiệt độ cơ thể không đổi ở 37°C. Đồng tử được làm giãn với 1% xyclopentolat-HCl

và 2,5% phenylephrine. Một giọt dung dịch Methocel 2% (OmniVision) được đặt trên giác mạc để ngăn mắt khỏi bị khô và phát triển bệnh đục thủy tinh thể trong quá trình ghi. Việc ghi được thực hiện đồng thời từ cả hai mắt với các điện cực vòng vàng. Điện cực tham chiếu là kẹp cá sấu không răng được làm ướt bằng Methocel và gắn vào má của con vật. Để nối đất điện, một cái kẹp được gắn vào đuôi con vật. Tín hiệu ERG được lấy mẫu ở tần số 1 kHz và được ghi lại với mức cắt tần số thấp 0,15 Hz và tần số cao 500 Hz. Các kích thích ánh sáng bao gồm các tia sáng toàn trường ngắn được phân phối bởi một bộ điốt phát sáng (thời lượng, <4 ms). Tất cả các tia sáng được tạo ra bởi bộ kích thích Ganzfeld (ColorDome; Diagnosys), trong bóng tối hoặc trên ánh sáng nền màu xanh lá cây hoặc đỏ đều đặn.

#### Quy trình ERG

Các đáp ứng ERG được ghi lần đầu từ động vật đã thích nghi với bóng tối (để cách ly các đáp ứng được gây ra bởi tế bào hình que), sau đó là ghi từ các động vật đã thích nghi với ánh sáng nền đỏ ( $50 \text{ cd/m}^2$ , để cách ly các đáp ứng ERG được gây ra bởi tế bào hình nón UV) và sau đó thích nghi với ánh sáng nền màu xanh lá cây ( $25,5 \text{ cd/m}^2$ , để cách ly các đáp ứng được gây ra bởi tế bào hình nón M). Trong trường hợp ERG thích ứng tối, các đáp ứng được kích thích bởi một loạt các tia sáng nằm trong khoảng từ  $1 \cdot 10^{-5}$  đến  $0,1 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ . Đối với các tia sáng có độ chói  $1 \cdot 10^{-5}$  và  $3 \cdot 10^{-5} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ , đáp ứng của 20 thử nghiệm được tính trung bình. Đối với các tia sáng trong khoảng từ  $1 \cdot 10^{-4}$  tới  $0,05 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ , các đáp ứng của 10 thử nghiệm được tính trung bình, và đối với tia sáng cuối cùng là  $0,1 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ , 8 thử nghiệm được tính trung bình. Khoảng thời gian giữa các tia sáng riêng lẻ được chọn để đảm bảo rằng võng mạc phục hồi hoàn toàn từ mỗi tia sáng (không có dấu hiệu giảm biên độ đáp ứng do tia sáng hoặc rút ngắn thời gian ản). Dựa trên các tiêu chí này, các khoảng thời gian giữa các tia sáng là 2 giây đối với các tia sáng  $1 \cdot 10^{-5}$  và  $3 \cdot 10^{-5} \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ , 5 giây cho các tia sáng nằm trong khoảng từ  $1 \cdot 10^{-4}$  tới  $0,05 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ , và 10 giây cho tia sáng  $0,1 \text{ cd} \cdot \text{s/m}^2$ .

Để ghi lại các đáp ứng được gây ra bởi tế bào hình nón UV, động vật được cho thích nghi với ánh sáng nền đỏ trong 2 phút. Đáp ứng ánh sáng được kích thích bởi các tia sáng UV 0,02, 0,04, 0,08, 0,17, 0,35, 0,83, 1,66, 2,90 và  $4,15 \mu\text{W/m}^2$ . Để ghi lại các đáp ứng được gây ra bởi tế bào hình nón M, động vật được cho thích nghi với ánh sáng nền màu xanh lá cây trong 2 phút. Đáp ứng ánh sáng được kích thích bởi các tia

sáng màu xanh lá cây 0,25, 0,1, 1,0, 5,0, 50 và 150  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . Đối với UV và tia sáng màu xanh lá cây, đáp ứng của 10 thử nghiệm được tính trung bình với các khoảng thời gian giữa các tia sáng là 3 giây.

#### Phân tích dữ liệu

Để xác định biên độ sóng b ERG (đáp ứng khử cực dương chủ yếu có nguồn gốc từ các tế bào lưỡng cực), dữ liệu ERG được xử lý và phân tích bằng phần mềm MATLAB (phiên bản R2014a; MathWorks). Các điện thế dao động (các sóng nhỏ tần số cao chồng lên sóng b) được loại bỏ khỏi các tín hiệu bằng cách lọc tần số thông thấp biến đổi Fourier nhanh 55 Hz vì các thể năng dao động có thể ảnh hưởng đến biên độ và vị trí của đỉnh sóng b, đặc biệt là dưới điều kiện thích nghi ánh sáng. Biên độ sóng b được tính từ đáy của đáp ứng sóng a (độ lệch âm chủ yếu xuất phát từ hoạt động của tế bào cảm quang) đến đỉnh của đỉnh sóng b. Thời gian ẩn sóng b được đo là thời gian sau khi kích thích bằng tia sáng cần thiết để đạt đến đỉnh của sóng b.

Biên độ của sóng b là hàm của cường độ kích thích được khớp bởi phương trình sau bằng cách sử dụng quy trình khớp bình phương nhỏ nhất (GraphPad Prism, Phiên bản 6.01):

$$R = \frac{R_{\max} I^n}{(I^n + I_h^n)} \quad (\text{Phương trình 1})$$

với R là biên độ đáp ứng,  $R_{\max}$  là biên độ đáp ứng bão hòa, I cường độ tia sáng,  $I_h$  cường độ tia sáng bán bão hòa và n là hệ số Hill.

Độ nhạy sáng, S, được định nghĩa là tỷ lệ giữa biên độ đáp ứng bão hòa,  $R_{\max}$  và cường độ tia sáng bán bão hòa,  $I_h$ .

Giá trị S và  $R_{\max}$  được chuẩn hóa thành giá trị trung bình của các đối chứng không đái tháo đường thu được cho tuần 5, trước khi tiêm trong dịch kính và cho tuần 7, sau khi điều trị trong dịch kính, tương ứng.

Để phân tích thời gian ẩn sóng b được gây ra bởi tế bào hình que, thời gian ẩn trung bình của động vật đối chứng không đái tháo đường được xác định đối với sóng b được kích thích bởi các tia sáng  $1\cdot 10^{-5}$ ,  $3\cdot 10^{-5}$ ,  $1\cdot 10^{-4}$  và  $2\cdot 10^{-4}$   $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  (thời gian ẩn tương ứng rất giống nhau). Đối với mỗi nhóm nghiên cứu, sự thay đổi tương đối đối

với giá trị trung bình của các đối chứng được tính cho các cường độ tia sáng ở trên và tính trung bình, tạo ra sự thay đổi tương đối trung bình trong thời gian ần sóng b.

Để phân tích thời gian ần sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV, sự thay đổi tương đối về thời gian ần đối với giá trị trung bình của các đối chứng được tính cho các đáp ứng sóng b được kích thích bởi các cường độ tia sáng 0,042, 0,083, 0,166 và 0,348  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , và tính trung bình.

Để phân tích thời gian ần sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón M, sự thay đổi tương đối về thời gian ần đối với giá trị trung bình của các đối chứng được tính cho các đáp ứng sóng b được kích thích bởi các cường độ tia sáng 1, 5, 50 và 150  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ , và tính trung bình.

Đáp ứng sóng a được gây ra bởi tế bào hình que được xác định ở đỉnh của sóng a (độ lệch tín hiệu âm ngay sau kích thích ánh sáng) được kích thích bởi tia sáng 0,1  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ .

#### Kết quả

Vào tuần thứ 5 sau khi gây ra bệnh đái tháo đường, các lần ghi ERG đường cơ sở được thực hiện để định lượng mức độ rối loạn chức năng thần kinh ở võng mạc trước khi điều trị trong dịch kính (xem thêm FIG.5). Dựa trên các kết quả ERG này, đảm bảo rằng hai nhóm bệnh đái tháo đường (tăng đường huyết) có biểu hiện phân bố rối loạn chức năng võng mạc tương tự (được điều trị trong dịch kính theo dõi với kháng 2,4,6-trinitrophenyl IgG1 đối chứng - nhóm 2 - hoặc C2 IgG1 chủ vận TrkB - nhóm 3). Nói chung, tất cả các phương pháp điều trị trong dịch kính đều được dung nạp tốt và không có tác dụng phụ nào được quan sát. Đường huyết ổn định ở mức  $\sim 5$  mM ở chuột đối chứng không đái tháo đường (nhóm 1,  $n = 12$ ) trong suốt quá trình nghiên cứu. Ở động vật mắc bệnh đái tháo đường do STZ (nhóm 2 và 3, mỗi nhóm  $n = 12$ ), nồng độ glucoza trong máu đạt mức  $>20$  mM sau  $\sim 4$  ngày sau điều trị bằng STZ, và không giảm xuống dưới 20 mM trong suốt quá trình nghiên cứu. Điều trị trong dịch kính bằng C2 hoặc kháng 2,4,6-trinitrophenyl IgG1 đối chứng không có bất kỳ ảnh hưởng nào đến mức đường huyết.

Thời gian ần sóng b được gây ra bởi tế bào hình que:

Thời gian ẩn sóng b là phép đo tốc độ của đáp ứng điện cảm ứng ánh sáng ở võng mạc (chủ yếu dựa trên mức tế bào lưỡng cực và sự truyền synap từ tế bào cảm quang đến tế bào lưỡng cực). Thời gian ẩn được định nghĩa là thời gian cần thiết để đạt được biên độ đáp ứng sau khi kích thích nhanh bằng ánh sáng. Tác dụng của tăng đường huyết và điều trị trong dịch kính được tóm tắt trên FIG.6. Những thay đổi về thời gian ẩn liên quan đến thời gian ẩn trung bình được đo từ chuột đối chứng được tính toán cho dữ liệu thu được trước khi điều trị trong dịch kính (đánh giá ERG đường cơ sở) và sau khi điều trị trong dịch kính. Có sự gia tăng mạnh mẽ về thời gian ẩn ~ 14 ms trong hai nhóm tăng đường huyết trước khi điều trị trong dịch kính, cho thấy sự chậm lại do tăng đường huyết của động lực học đáp ứng sóng b, tức là giảm tốc độ xử lý của võng mạc được gây ra bởi tế bào hình que. Việc tiêm trong dịch kính kháng 2,4,6-trinitrophenyl IgG1 đối chứng không có tác dụng đáng kể nào đối với thời gian ẩn ở nhóm đối chứng không đái tháo đường và nhóm tăng đường huyết (nhóm 1, thanh đen và nhóm 2, thanh nhiều chấm trên FIG.6, sau khi tiêm trong dịch kính, tương ứng). Tuy nhiên, việc điều trị trong dịch kính bằng C2 hoạt hóa TrkB rõ ràng dẫn đến sự trễ giảm dần trong thời gian ẩn (nhóm 3, thanh màu xám trên FIG.6, sau khi điều trị trong dịch kính). Tính trung bình, điều trị trong dịch kính bằng C2 làm tăng tốc đáng kể các đáp ứng sóng b ~ 9 ms (nghĩa là độ trễ trong thời gian ẩn được rút ngắn từ 14 ms xuống còn 5 ms).

Độ nhạy sáng sóng b được gây ra bởi tế bào hình que:

Độ nhạy sáng của đáp ứng ERG sóng b được gây ra bởi tế bào hình que là phép đo cho số lượng tế bào thần kinh tham gia vào con đường võng mạc được gây ra bởi tế bào hình que, và độ nhạy của chúng đối với kích thích ánh sáng để tạo ra đáp ứng ánh sáng khử cực. Độ nhạy sáng được chuẩn hóa thành độ nhạy sáng trung bình của chuột đối chứng (nhóm 1, trước và sau khi điều trị trong dịch kính) và được vẽ trên FIG.7. Độ nhạy sáng chuẩn hóa giảm ~40-50% ở động vật tăng đường huyết (trước khi điều trị trong dịch kính, nhóm 2 và 3). Việc tiêm trong dịch kính IgG1 đối chứng không có bất kỳ ảnh hưởng đáng kể nào đến độ nhạy sáng của chuột đối chứng (nhóm 1) hoặc chuột tăng đường huyết (nhóm 2). Điều quan trọng là, điều trị trong dịch kính bằng C2 hoạt hóa TrkB làm tăng đáng kể độ nhạy sáng lên ~30% (nhóm 3, màu xám, sau khi điều trị trong dịch kính so với trước khi điều trị).

Đáp ứng sóng a được gây ra bởi tế bào hình que:

Đáp ứng sóng a được gây ra bởi tế bào hình que là phép đo cho kích thước của các đáp ứng ánh sáng của tế bào cảm quang hình que được kích thích bởi tia sáng. Đáp ứng sóng a được gây ra bởi tế bào hình que được chuẩn hóa thành giá trị trung bình thu được từ chuột đối chứng (nhóm 1, trước và sau khi điều trị trong dịch kính) và được vẽ trên FIG.7. Biên độ đáp ứng bão hòa chuẩn hóa giảm ~17% ở động vật tăng đường huyết (nhóm 2 và 3, trước khi điều trị trong dịch kính). Việc tiêm IgG1 đối chứng trong dịch kính không có bất kỳ tác động đáng kể nào đối với đáp ứng sóng a chuẩn hóa của chuột đối chứng (nhóm 1, màu đen) hoặc chuột bị tăng đường huyết (nhóm 2, nhiều chấm), với sự biểu hiện sau đó là suy giảm thêm đáp ứng sóng a trong quá trình nghiên cứu. Tuy nhiên, việc điều trị trong dịch kính bằng C2 hoạt hóa TrkB (nhóm 3, màu xám) hoàn toàn có thể ngăn chặn việc giảm thêm các đáp ứng sóng a như quan sát thấy đối với nhóm bị tăng đường huyết 2.

Thời gian ẩn sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV và M:

Những thay đổi về thời gian ẩn liên quan đến thời gian ẩn trung bình được đo từ chuột đối chứng được tính toán cho dữ liệu thu được trước khi điều trị trong dịch kính (đánh giá ERG đường cơ sở) và sau khi điều trị trong dịch kính. Phân tích này được thực hiện đối với thời gian ẩn sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV (FIG.9) và thời gian ẩn sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón M (FIG.10). Trong trường hợp các đáp ứng được gây ra bởi tế bào hình nón UV, có sự tăng mạnh thời gian ẩn ~8 ms trong hai nhóm bị tăng đường huyết trước khi điều trị trong dịch kính, trong khi sự gia tăng thời gian ẩn được gây ra bởi tế bào hình nón M là ~5 ms trong nhóm bị tăng đường huyết. Những ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê này cho thấy sự chậm lại do tăng đường huyết của động lực đáp ứng sóng b và giảm tốc độ xử lý của võng mạc được gây ra bởi tế bào hình nón. Việc tiêm IgG1 đối chứng trong dịch kính không có bất kỳ ảnh hưởng đáng kể nào đến thời gian ẩn trong nhóm đối chứng không đái tháo đường (nhóm 1, màu đen) hoặc nhóm bị tăng đường huyết (nhóm 2, nhiều chấm), cho cả thời gian ẩn sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV và M. Điều trị trong dịch kính bằng C2 (nhóm 3, màu xám) rút ngắn thời gian ẩn ~5 ms trong trường hợp tế bào hình nón UV (tương ứng với mức chuẩn hóa ~50% động học đáp ứng sóng b), và phục hồi

gần như hoàn toàn động học đáp ứng sóng b bình thường trong trường hợp sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón M.

Độ nhạy sáng sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV:

Độ nhạy sáng của đáp ứng ERG sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV được đánh giá như được mô tả đối với ERG được gây ra bởi tế bào hình que. Độ nhạy sáng được chuẩn hóa thành độ nhạy sáng trung bình của chuột đối chứng (nhóm 1, trước và sau khi điều trị trong dịch kính) và được vẽ trên FIG.11. Độ nhạy sáng chuẩn hóa giảm ~50% ở động vật bị tăng đường huyết tại đường cơ sở (trước khi tiêm trong dịch kính). Việc tiêm IgG1 đối chứng trong dịch kính không có bất kỳ ảnh hưởng đáng kể nào đến độ nhạy sáng, trong khi điều trị bằng C2 trong dịch kính làm tăng đáng kể độ nhạy sáng đến mức quan sát thấy ở chuột đối chứng khỏe mạnh (nhóm 3, màu xám).

Biên độ đáp ứng sóng b bão hòa được gây ra bởi tế bào hình nón

Ảnh hưởng của tăng đường huyết đối với độ nhạy sáng sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón M ít rõ rệt hơn so với sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón UV (tại thời điểm nghiên cứu). Tuy nhiên, có thể thấy sự suy giảm đáng kể về biên độ đáp ứng bão hòa sóng b được gây ra bởi tế bào hình nón M ở tuần thứ 5 sau khi khởi phát bệnh tăng đường huyết (giảm ~15% so với chuột đối chứng không đái tháo đường, FIG.12). Điều trị bằng C2 trong dịch kính có thể khôi phục biên độ đáp ứng bão hòa về mức của nhóm đối chứng (nhóm 3, màu xám), trong khi điều trị bằng IgG1 đối chứng không có bất kỳ tác dụng đáng kể nào (nhóm 2, nhiều chấm).

Những phát hiện chính được tóm tắt dưới đây:

Hoạt hóa TrkB tạo ra sự bảo vệ thần kinh và bảo toàn chức năng võng mạc. Sự bảo vệ thần kinh được chứng minh trong mô hình chuột mắc bệnh đái tháo đường do STZ biểu hiện rối loạn chức năng thần kinh do tăng đường huyết gây ra. Đã chứng minh được rằng việc hoạt hóa TrkB ngăn chặn rối loạn chức năng của các tế bào cảm quang.

Hoạt hóa TrkB gây ra sự phục hồi/cải thiện chức năng tế bào thần kinh ở võng mạc trong mô hình chuột mắc bệnh đái tháo đường do STZ sau khi tăng đường huyết kéo dài, như độ trễ đáp ứng ánh sáng được cải thiện (ví dụ, thời gian ản sóng b trong

ERG được rút ngắn) hoặc cải thiện độ nhạy sáng được gây ra bởi tế bào hình que và tế bào hình nón.

Tóm lại, dữ liệu được lý cung cấp bằng chứng cho khái niệm trị liệu rằng việc hoạt hóa TrkB có thể cải thiện/phục hồi chức năng của các loại tế bào thần kinh khác nhau trong mắt trong các tình trạng bệnh khác nhau.

Việc hoạt hóa TrkB cũng bảo vệ các tế bào cảm quang và võng mạc bên ngoài như được chứng minh bằng phân tích sóng a trong ERG, phân tích này là sự phản ánh của các đáp ứng ánh sáng của tế bào cảm quang. Tương tự như kết quả thu được từ sóng a trong ERG, độ nhạy tương phản của mắt của chuột bị đái tháo đường đang giảm trong quá trình tăng đường huyết kéo dài, trong khi điều trị bằng C2 hoạt hóa TrkB trong dịch kính bảo toàn hoàn toàn độ nhạy tương phản. Hơn nữa, sự cải thiện độ nhạy sáng của sóng b trong ERG của các đáp ứng ánh sáng được gây ra bởi tế bào hình que và tế bào hình nón được mô tả ở trên (phản ánh độ nhạy sáng của việc truyền qua synap từ tế bào cảm quang đến tế bào lưỡng cực) củng cố thêm khái niệm việc hoạt hóa TrkB có thể cải thiện/bảo vệ chức năng võng mạc bên ngoài bao gồm các tế bào cảm quang.

### 13. Chức năng BDNF trong điều trị kết hợp

Nuôi cấy tế bào CHO biểu hiện thụ thể TrkB của người

Các tế bào CHO biểu hiện thụ thể TrkB của người (hTrkB) (ThermoFisher Scientific, #K1491) được nuôi cấy trong DMEM (Lonza, #BE12-604F) được bổ sung với 10% huyết thanh bào thai bò, glutamax, axit amin không thiết yếu, HEPES 20 mM, 5 µg/ml blasticidin và 200 µg/ml zeocin. Hai mươi tư giờ trước khi kích thích, 5000 tế bào (30 µl) được gieo vào từng khoang của đĩa nuôi cấy mô sạch 384 lỗ (BD Falcon, # 353963) và được ủ trong thiết bị ủ được tạo ẩm ở 37°C và 5% CO<sub>2</sub>.

Phân tích quá trình phosphoryl hóa ERK trong các tế bào CHO với thụ thể hTrkB

Hai mươi tư giờ sau khi gieo, dịch nổi trên bề mặt của các tế bào CHO/hTrkB được thay thế bằng 40 µl DMEM ở nhiệt độ trong phòng với 0,1% BSA nhưng không có chất bổ sung khác. Sau 15 phút, 10 µl DMEM/0,1% BSA với các nồng độ BDNF

tăng dần (1E-13 đến 3E-8 mol/l), kháng thể 277 (1E-13 đến 2,025E-8 mol/l), hoặc kháng thể C2 (1E-13 đến 2,025E-8 mol/l) một mình hoặc tổ hợp gồm BDNF 1 nM với các nồng độ tăng dần của kháng thể 277 hoặc C2 (cả hai đều từ 1E-13 đến 2,025E-8 mol/l) được bổ sung theo ba mẫu lặp lại để kích thích sự phosphoryl hóa ERK. Sau khi ủ trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng, dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và các tế bào được dung giải trong 20 phút trên băng ướt trong 20  $\mu$ l dung dịch đệm dung giải trên mỗi lỗ (1x dung dịch đệm dung giải Tryton (CellSignaling # 9803-S), được bổ sung viên nén chất ức chế proteaza complete mini (Roche # 04693124001) và hỗn hợp chất ức chế phosphatase 2 (Sigma # P5726) và 3 (Sigma # P0044) và 1 mM PMSF (Sigma # 93482)). Năm microlit của dịch phân giải thu được được sử dụng để định lượng sự phosphoryl hóa ERK1/2 tại T202/Y204 bằng cách sử dụng thử nghiệm có sẵn trên thị trường (Perkin Elmer # TGRES500), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự phát xạ ánh sáng của các hạt nhận, phản ánh quá trình phosphoryl hóa ERK, được ghi lại ở bước sóng 570 nm trên máy đọc khay vi thể Perkin Elmer EnVision và được chuẩn bị để trình diễn với GraphPad Prism (phiên bản 7), bao gồm dữ liệu thô (trung bình  $\pm$  SEM) và hồi quy phi tuyến tính (log(chất chủ vận) so với đáp ứng (ba tham số)).

Như được thể hiện trên Fig.13, kháng thể 277 không làm giảm quá trình phosphoryl hóa ERK do BDNF gây ra. Nồng độ tăng của kháng thể C2 dẫn đến giảm sự phosphoryl hóa ERK do BDNF gây ra xuống đến mức độ phosphoryl hóa ERK do C2 gây ra. Điều này có thể có tác động đáng kể đến việc sử dụng kháng thể kháng Trkb trong mắt nơi các kháng thể được sử dụng ở nồng độ bão hòa cao để kéo dài thời gian cho đến khi cần dùng thuốc tiếp theo. Kháng thể 277 có thể được sử dụng với liều lượng cao mà không can thiệp vào quá trình phosphoryl hóa ERK do BDNF có sẵn trong khi kháng thể C2 làm giảm sự phosphoryl hóa ERK do BDNF có sẵn xuống mức của kháng thể.

#### 14. Liên kết với VEGF của người trong thử nghiệm ELISA in vitro

Đối với thử nghiệm liên kết in vitro, các đĩa 96 lỗ MaxiSorp 96 (Nunc #437111) được phủ qua đêm ở 4°C bằng 500 ng/ml VEGF người (R&D Systems #293-VE-050) hoặc VEGF chuột (R&D Systems #564-RV-050) trong dung dịch đệm cacbonat/bicacbonat (3,03 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> và 6,00 g/l NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). Các đĩa được rửa

ba lần bằng PBS-T (nước muối đệm phosphat (Invitrogen #70011-036) với 0,05% Tween20 (Sigma #P7949)) và sau đó được ủ với 1% BSA (Sigma #A3059) trong PBS-T trong ba giờ ở nhiệt độ trong phòng để chặn sự liên kết không đặc hiệu. Các đĩa được rửa ba lần bằng PBS-T và sau đó được ủ với dịch pha loãng theo dãy 1:4 của Avastin 1 $\mu$ M (Roche clinic package), kháng thể C2, kháng thể 277 hoặc kháng thể đối chứng isotyp IgG1 của người trong PBS-T qua đêm ở 4°C. Các đĩa được rửa ba lần bằng PBS-T và sau đó được ủ với dịch pha loãng 1:2000 kháng thể đê kháng IgG người Alexa fluor 647 (Invitrogen #A21445) trong hai giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau ba lần rửa tiếp với PBS-T, sự phát sáng ở 647nm (phản ánh sự gắn kết kháng thể với VEGF) được ghi lại trên máy đọc khay vi thể Perking Elmer EnVision. Dữ liệu được chuẩn bị để trình diện với GraphPad Prism (phiên bản 7), bao gồm dữ liệu thô (trung bình  $\pm$  SEM) và hồi quy phi tuyến tính (log(chất chủ vận) so với đáp ứng (ba tham số)).

Như được thể hiện trên Fig.14, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về sự gắn kết với VEGF người giữa kháng thể kháng TrkB 277 và kháng thể đối chứng isotyp IgG1 ở các nồng độ kháng thể lên tới 0,25  $\mu$ M (thử nghiệm t không ghép cặp,  $p > 0,05$ ). Ngược lại, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về sự gắn kết với VEGF người giữa C2 và kháng thể đối chứng isotyp được quan sát thấy ở nồng độ kháng thể 0,24 nM (thử nghiệm t không ghép cặp, \*\*  $p < 0,01$ ).

Sự gắn kết không đặc hiệu với VEGF như vậy có thể gây ra, ví dụ, tác dụng phụ không mong muốn, gây khó khăn cho việc kiểm soát liều lượng để hoạt hóa TrkB, hoặc làm tăng lượng kháng thể cần thiết để đạt được hiệu quả mong muốn.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:
  - a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
  - b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
  - c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
  - d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3).
  
2. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:
  - a. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12,
  - b. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13,
  - c. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất

- 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14,
- d. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15,
- e. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16,
- f. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17,
- g. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18,
- h. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, hoặc
- i. chuỗi nhẹ biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20.

3. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:

- a. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 hoặc 23,
- b. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 hoặc 26,
- c. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28 hoặc 29,
- d. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31 hoặc 32,
- e. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 34 hoặc 35,
- f. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 hoặc 38,

- g. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 40 hoặc 41,
  - h. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 hoặc 44,
  - i. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46 hoặc 47.
4. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:
- a. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 12, tương ứng,
  - b. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 13, tương ứng,
  - c. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 14, tương ứng,
  - d. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 15, tương ứng,
  - e. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 16, tương ứng,
  - f. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 17, tương ứng,
  - g. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 18, tương ứng,

- h. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 19, tương ứng, hoặc
- i. chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 20, tương ứng.

5. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:

- a. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 hoặc 23,
- b. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 hoặc 26,
- c. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28 hoặc 29,
- d. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31 hoặc 32,
- e. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 34 hoặc 35,
- f. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 hoặc 38,
- g. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 40 hoặc 41,
- h. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 hoặc 44, hoặc
- i. chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46 hoặc 47, tương ứng.

6. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 hoặc 23.

7. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 hoặc 26.

8. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:  
chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và chuỗi nặng bao gồm trình  
tự axit amin của SEQ ID NO: 28 hoặc 29.
9. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:  
chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và chuỗi nặng bao gồm trình  
tự axit amin của SEQ ID NO: 31 hoặc 32.
10. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:  
chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33 và chuỗi nặng bao gồm trình  
tự axit amin của SEQ ID NO: 34 hoặc 35.
11. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:  
chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và chuỗi nặng bao gồm trình  
tự axit amin của SEQ ID NO: 37 hoặc 38.
12. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:  
chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39 và chuỗi nặng bao gồm trình  
tự axit amin của SEQ ID NO: 40 hoặc 41.
13. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:  
chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42 và chuỗi nặng bao gồm trình  
tự axit amin của SEQ ID NO: 43 hoặc 44.
14. Kháng thể kháng TrkB theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:  
chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và chuỗi nặng bao gồm trình  
tự axit amin của SEQ ID NO: 46 hoặc 47.
15. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm  
1 và chất mang dược dụng.

16. Polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng và chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng theo điểm 1.
17. Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit được phân lập theo điểm 16.
18. Vector virus bao gồm polynucleotit được phân lập theo điểm 16.
19. Tế bào chủ được nuôi cấy bao gồm polynucleotit được phân lập theo điểm 16.
20. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm các bước:
- thu được tế bào chủ theo điểm 19; và
  - nuôi cấy tế bào chủ.
21. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:
- vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
  - vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
  - vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
  - vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);
- trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:
- chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 12.

22. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 13.

23. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 14.

24. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 15.

25. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc

- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 16.

26. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 17.

27. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc

- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
  - d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);
- trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm: chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 18.

28. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm: chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 19.

29. Kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và

- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
  - c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
  - d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);
- trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm: chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 20.

30. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 hoặc 23.

31. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 hoặc 26.

32. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 và

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28 hoặc 29.

33. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31 hoặc 32.

34. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 33 và

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 34 hoặc 35.

35. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 36 và

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 hoặc 38.

36. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 39 và

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 40 hoặc 41.

37. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc
- d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42 và

chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 43 hoặc 44.

38. Kháng thể kháng TrkB bao gồm:

- a. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 48 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 49 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 50 (L-CDR3); và
- b. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53 (H-CDR3), hoặc
- c. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 55 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57 (H-CDR3), hoặc

d. vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 60 (H-CDR3);

trong đó kháng thể bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 45 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 46 hoặc 47.

|    |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 2  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 3  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 4  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 5  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 6  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 7  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 8  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 9  | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 10 | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 11 | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 12 | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 13 | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 14 | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 15 | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK | NS | NL | QH | IN |
| 16 | CPT | CK | CS | AS | RI | WC | SD | PS | GI | VA | FR | LE | PN | SV | DP | NI | TE | FI | AN | QK | RL | EI | NE | DD | VE | AY | VL | GR | NL | TI | VS | DG | LK | FA | HK | AF | LK |    |    |    |    |

FIG.2

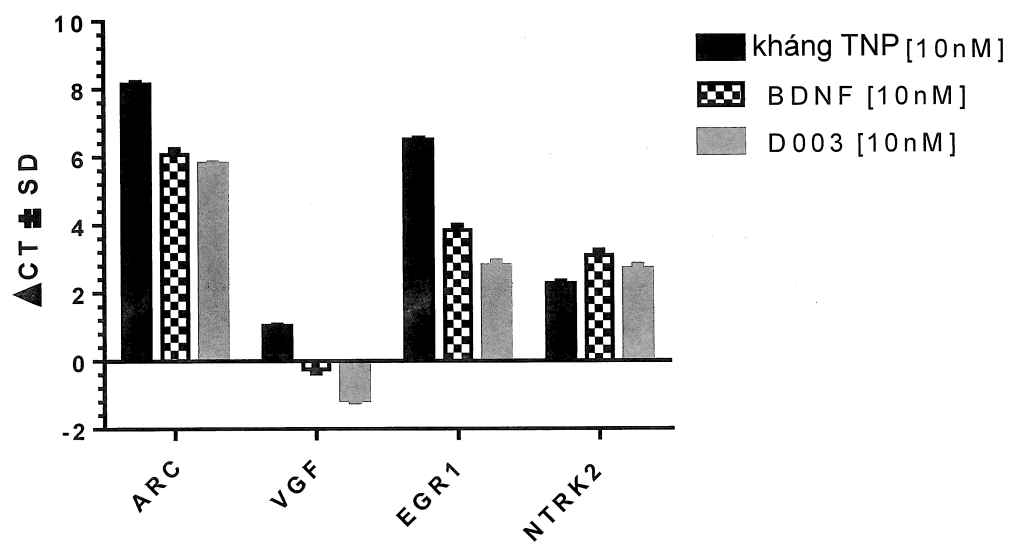


FIG.3

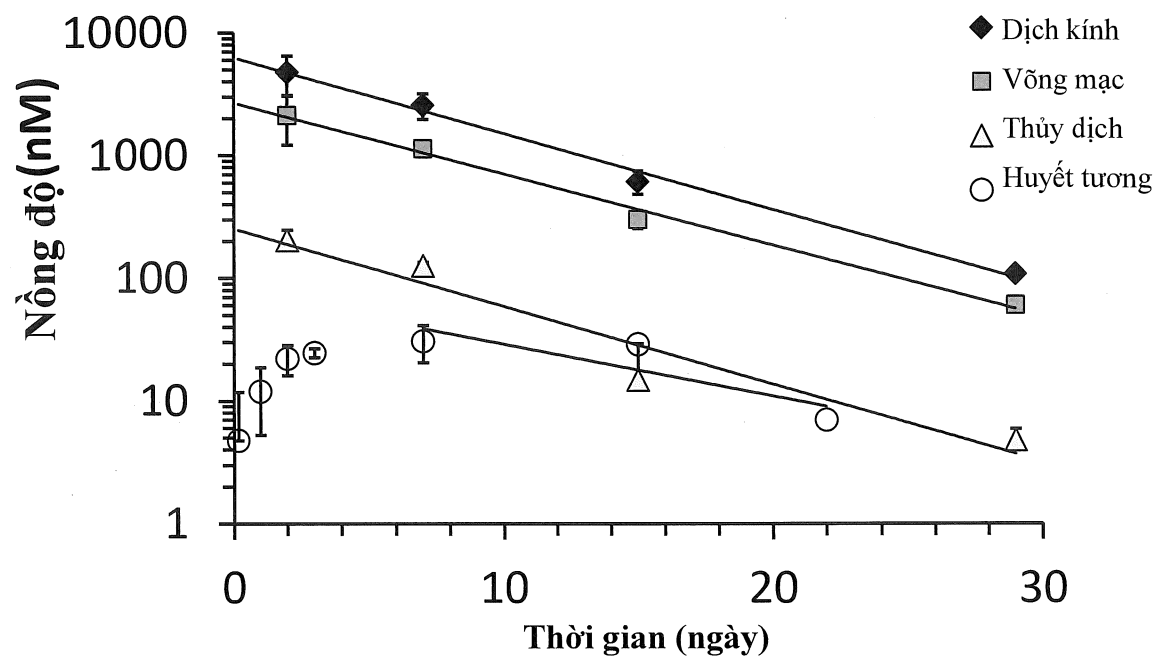


FIG.4

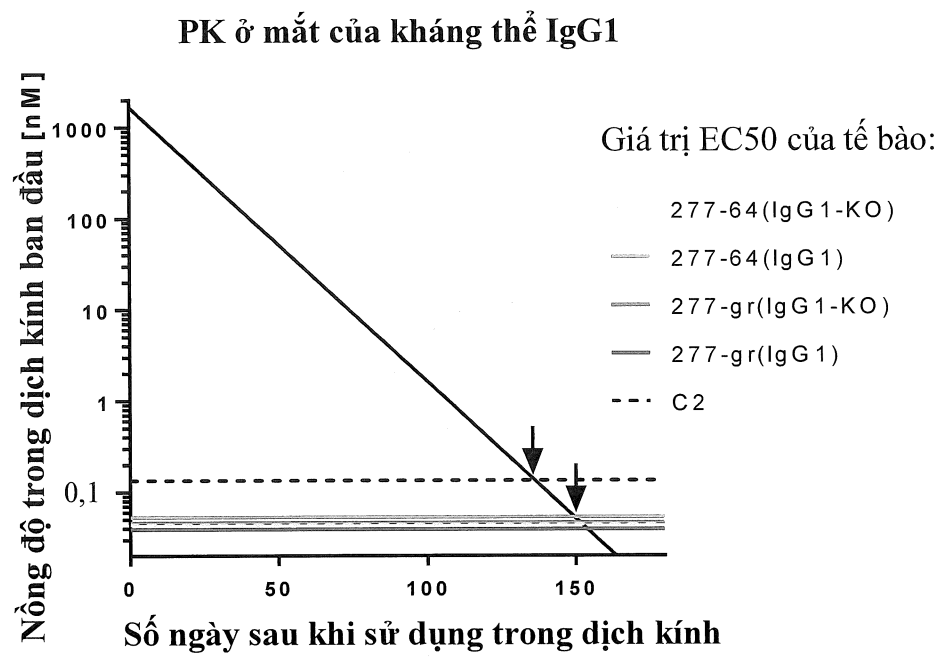
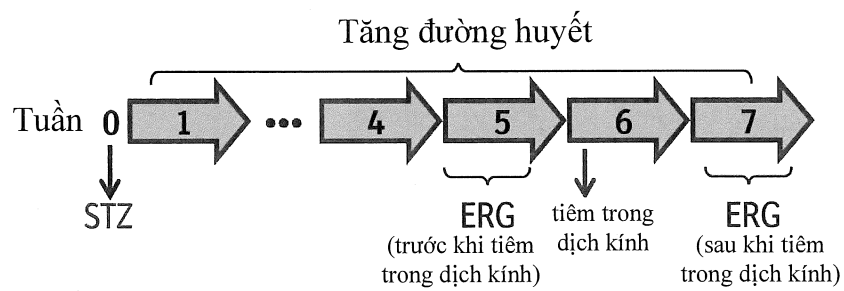


FIG.5



- Nhóm 1: Đối chứng (không đái tháo đường),  
tiêm trong dịch kính: 50 $\mu$ g kháng TNP (IgG1 đối chứng)
- Nhóm 2: Tăng đường huyết (đái tháo đường),  
tiêm trong dịch kính: 50 $\mu$ g kháng TNP (IgG1 đối chứng)
- Nhóm 3: Tăng đường huyết (đái tháo đường),  
tiêm trong dịch kính: 50 $\mu$ g C2 (kháng TrkB)

FIG.6

**Thay đổi thời gian ẩn sáng b  
được gây ra bởi tế bào hình que**

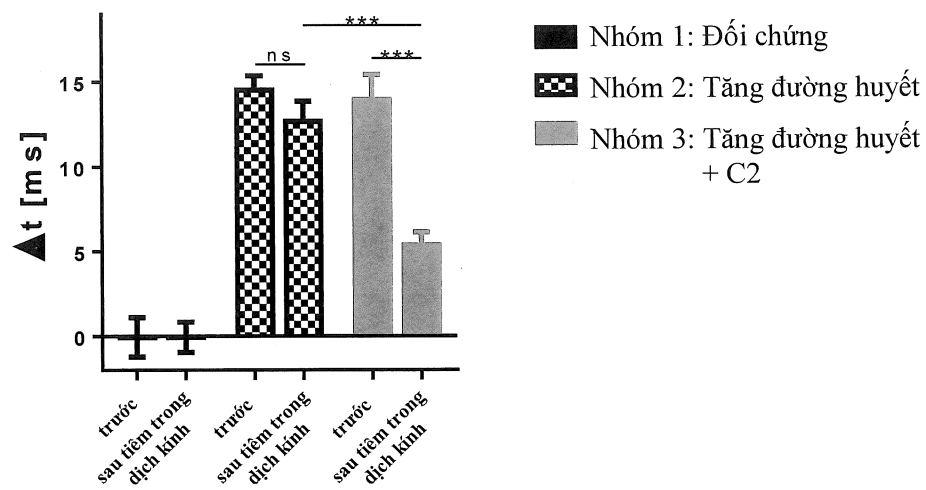


FIG.7

**Độ nhạy sáng sóng b được gây ra  
bởi tế bào hình que**

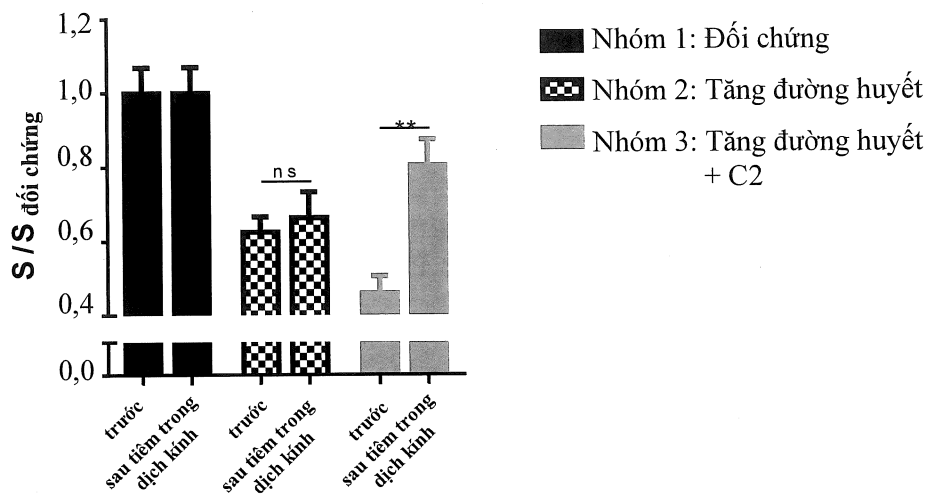


FIG.8

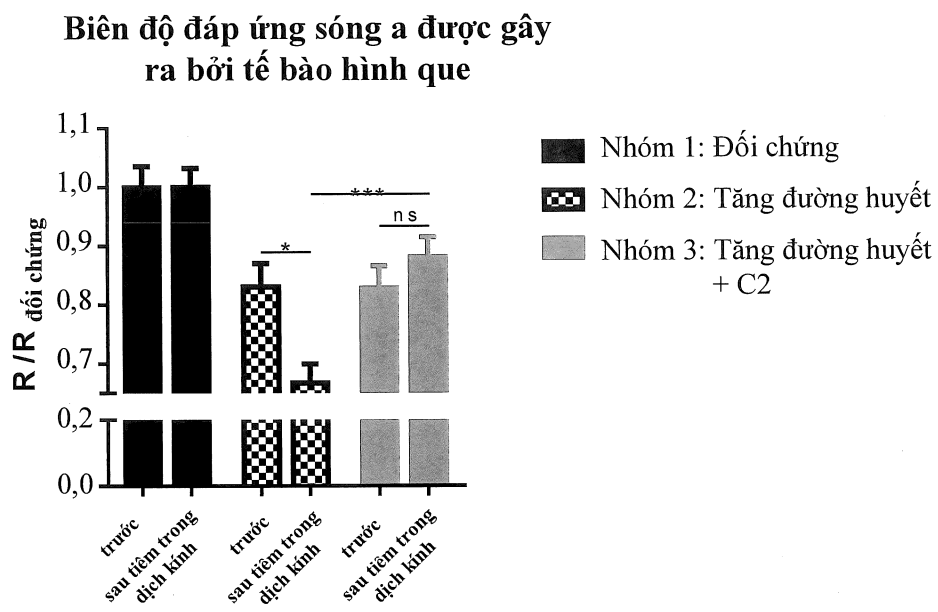


FIG.9

Thay đổi thời gian ẩn sáng b được gây  
ra bởi tế bào hình nón UV

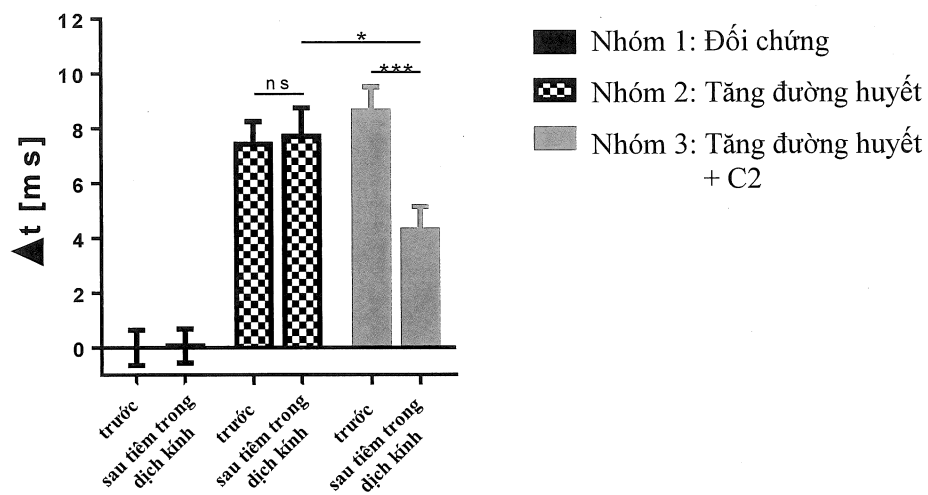


FIG.10

Thay đổi thời gian ẩn sóng b được gây  
ra bởi tế bào hình nón M

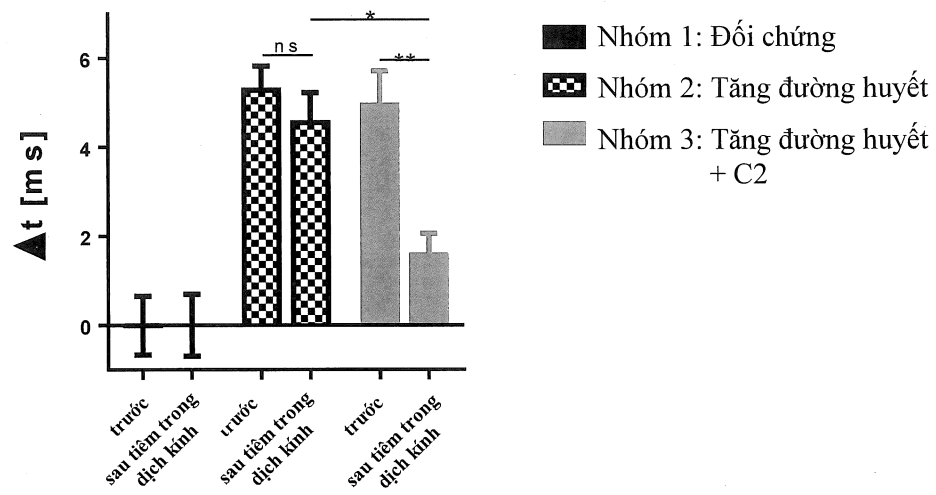


FIG.11

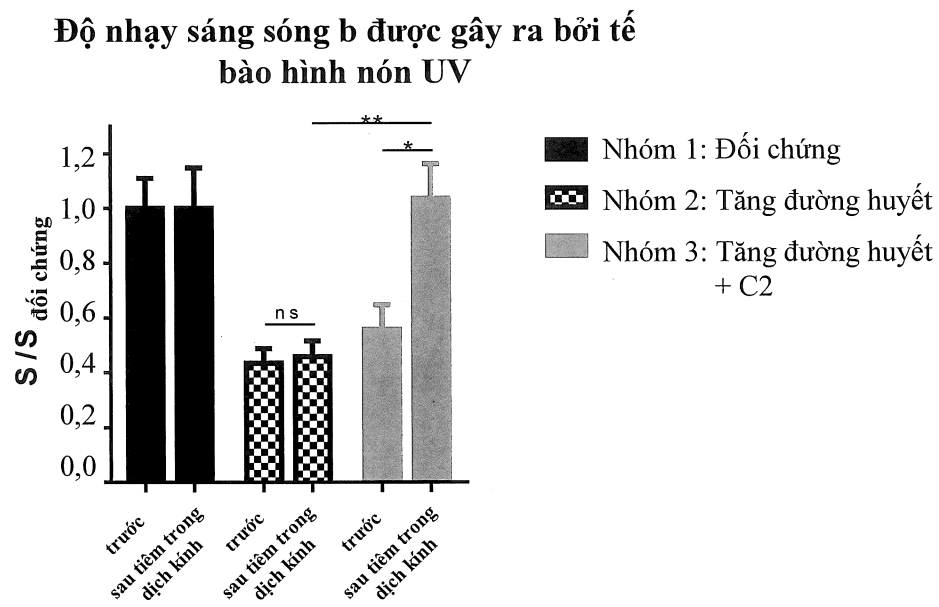


FIG.12

**Biên độ bão hòa sóng b được gây ra bởi  
tế bào hình nón M**

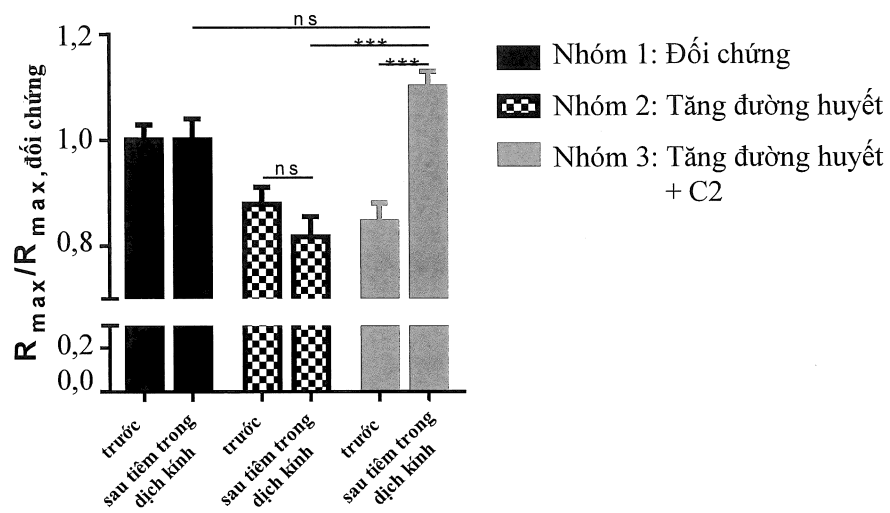


FIG.13 A &amp; B

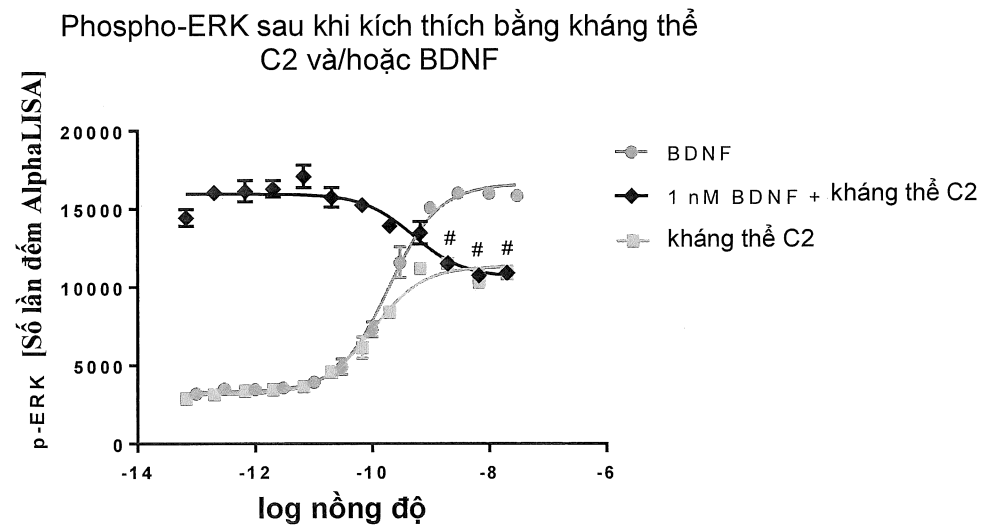
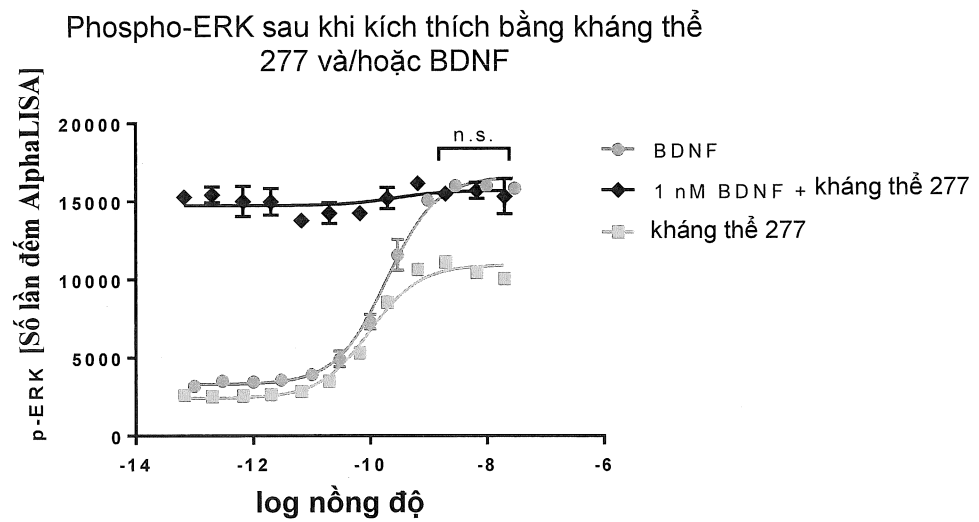
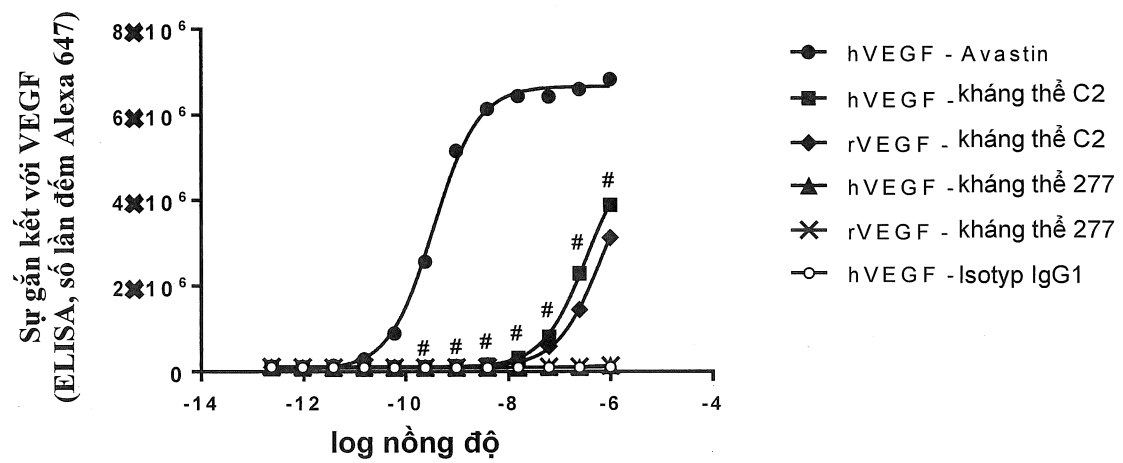


FIG.14

Sự gắn kết in vitro của kháng thể C2 hoặc 277  
với VEGF người hoặc chuột



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Kháng thể kháng TrkB, dược phẩm chứa kháng thể này và phương pháp sản xuất kháng thể

<130> 01-3274

<160> 60

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus <chuột, loài>

<220>

<223> D003\_VL (đoạn dẫn đầu của chuột), chuỗi nhẹ biến đổi

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Met | Ser | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Lys | Val | Thr | Met | Ser | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Tyr | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | Asn | Gln | 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 | Lys | Ala | Glu | Asp | Leu | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Tyr | Tyr | Ser | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Lys |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-gr\_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống nhu của người)

<400> 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 | Tyr | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | Asn | Gln | Lys | Asn | Tyr | Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Pro | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | Trp | Ala | Ser | Thr | Arg | Glu | Ser | Gly | Val |

```

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

```

<210> 3  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-33\_VL: chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)

```

<400> 3
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1              5              10              15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
      20              25              30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35              40              45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50              55              60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85              90              95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100              105              110
Lys

```

<210> 4  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-35\_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)

```

<400> 4
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1              5              10              15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
      20              25              30
Ser Asn Gln 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

```

[illegible]

```
<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> 277-42 VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)

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

```
<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> 277-44 VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống nhu của người)

|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 6 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 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 | Tyr | Ser |
|         |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser     | Asn | Gln | 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 | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr |
| 65      |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Ile     | Ser | Ser | Leu | Gln | Ala | Glu | Asp | Val | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln |
|         |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr     | Tyr | Ser | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile |

Lys 100 105 110

<210> 7  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-48\_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)

<400> 7  
 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 Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln 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 Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys

<210> 8  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-51\_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)

<400> 8  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys

<210> 9  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-64\_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)

<400> 9  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln 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 Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys

<210> 10  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-67\_VL, chuỗi nhẹ biến đổi (được làm giống như của người)

<400> 10  
 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 Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln 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 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys

<210> 11  
 <211> 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus &lt;chuột, loài&gt;

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D003\_VH, (đoạn dẫn đầu của chuột) chuỗi nặng biến đổi

&lt;400&gt; 11

```

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

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-gr\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

&lt;400&gt; 12

```

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

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-33\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

&lt;400&gt; 13

```

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

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-35\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

&lt;400&gt; 14

```

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

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-42\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

&lt;400&gt; 15

```

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

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-44\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

&lt;400&gt; 16

```

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

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-48\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

&lt;400&gt; 17

```

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

```

<210> 18  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-51\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

```

<400> 18
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 Tyr
                20           25           30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                35           40           45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
                50           55           60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85           90           95
Ala Arg Ser Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
                100           105           110
Val Ser Ser
                115

```

<210> 19  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-64\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

```

<400> 19
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 Tyr
                20           25           30

```

```

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

```

<210> 20  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-67\_VH, chuỗi nặng biến đổi (được làm giống như của người)

```

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

```

<210> 21  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-gr (chuỗi nhẹ, IgG1)

```

<400> 21
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 Tyr Ser
      20              25              30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35              40              45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

```

```

      50              55              60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65              70              75              80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85              90              95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100             105             110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
      115             120             125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
      130             135             140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145             150             155             160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
      165             170             175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
      180             185             190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
      195             200             205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210             215             220

```

<210> 22

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-gr (chuỗi nặng, IgG1)

<400> 22

```

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

```

```

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

```

<210> 23

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-gr (chuỗi nặng, IgG1-KO)

<400> 23

```

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

```

```

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

```

<210> 24

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-33 (chuỗi nhẹ, IgG1)

<400> 24

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1              5              10              15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
      20              25              30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

```

```

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

```

<210> 25

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-33 (chuỗi nặng, IgG1)

<400> 25

```

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

```

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

```
<210> 26
<211> 444
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> 277-33 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

|          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 26 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 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 | Tyr |
|          |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Trp      | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|          |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly      | Tyr | Ile | Asn | Pro | Ser | Thr | Asp | Tyr | Thr | Glu | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |
|          | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys      | Asp | Arg | Val | Thr | Leu | Thr | Arg | Asp | Thr | Ser | Thr | Ser | Thr | Val | Tyr |
| 65       |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Met      | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|          |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ala      | Arg | Ser | Arg | Thr | Gly | Asn | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr |

```

      100              105              110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
      115              120              125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
      130              135              140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145              150              155              160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
      165              170              175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
      180              185              190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
      195              200              205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
      210              215              220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225              230              235              240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
      245              250              255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
      260              265              270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      275              280              285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      290              295              300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305              310              315              320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325              330              335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
      340              345              350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
      355              360              365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
      370              375              380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385              390              395              400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      405              410              415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      420              425              430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      435              440

```

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 220

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-35 (chuỗi nhẹ, IgG1)

&lt;400&gt; 27

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1              5              10              15
Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

```

```

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

```

<210> 28

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-35 (chuỗi nặng, IgG1)

<400> 28

```

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 Tyr
                20                25                30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                35                40                45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50                55                60
Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                70                75                80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95
Ala Arg Ser Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
                100                105                110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
                115                120                125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130                135                140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                150                155                160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

```

```

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

```

<210> 29

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-35 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

<400> 29

```

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

```

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

```
<210> 30
<211> 220
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> 277-42 (chuỗi nhẹ, IgG1)

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

```

<210> 31

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit tổng hợp

<400> 31

```

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 Tyr
                20                25                30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
                35                40                45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
                50                55                60
Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                70                75                80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95
Ala Arg Ser Arg Thr Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
                100                105                110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
                115                120                125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
                130                135                140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

```

```

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

```

<210> 32

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-42 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

<400> 32

```

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

```

```

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

```

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 220

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-44 (chuỗi nhẹ, IgG1)

&lt;400&gt; 33

```

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 Tyr Ser
          20           25           30
Ser Asn Gln 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 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
          100          105          110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
          130          135          140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145          150          155          160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          165          170          175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          180          185          190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          195          200          205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215          220

```

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-44 (chuỗi nặng, IgG1)

&lt;400&gt; 34

```

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

```

```

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

```

<210> 35

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-44 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

<400> 35

```

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

```

```

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

```

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 220

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> 277-48 (chuỗi nhẹ, IgG1)

<400> 36

```

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

```

<210> 37

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-48 (chuỗi nặng, IgG1)

<400> 37

```

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

```

```

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

```

<210> 38

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-48 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

<400> 38

```

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 Tyr
      20              25              30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

```

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

```
<210> 39
<211> 220
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-51 (chuỗi nhẹ, IgG1)

&lt;400&gt; 39

```

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

```

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-51 (chuỗi nặng, IgG1)

&lt;400&gt; 40

```

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

```

```

      100              105              110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
      115              120              125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
      130              135              140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145              150              155              160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
      165              170              175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
      180              185              190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
      195              200              205
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
      210              215              220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225              230              235              240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
      245              250              255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
      260              265              270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      275              280              285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      290              295              300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305              310              315              320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325              330              335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
      340              345              350
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
      355              360              365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
      370              375              380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385              390              395              400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      405              410              415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      420              425              430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      435              440

```

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 444

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 277-51 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

&lt;400&gt; 41

```

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 Tyr

```

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

|       |     |
|-------|-----|
| <210> | 42  |
| <211> | 220 |
| <212> | PRT |

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-64 (chuỗi nhẹ, IgG1)

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-64 (chuỗi nặng, IgG1)

<400> 43

```

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

```

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

<210> 44

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> 277-64 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

<400> 44

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

```

&lt;210&gt; 45

<211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-67 (chuỗi nhẹ, IgG1)

<400> 45  
 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 Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln 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 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 180 185 190  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 195 200 205  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220

<210> 46  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> 277-67 (chuỗi nặng, IgG1)

<400> 46  
 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 Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

```

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

```

<210> 47

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 277-67 (chuỗi nặng, IgG1-KO)

&lt;400&gt; 47

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

<210> 48  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 L-CDR1

<400> 48  
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Ala

<210> 49  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 L-CDR2

<400> 49  
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

<210> 50  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 L-CDR3

<400> 50  
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 51  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 H-CDR1

<400> 51  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Trp Met His  
 1 5 10

<210> 52  
 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus <chuột, loài>

<220>

<223> 277 H-CDR2

<400> 52

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asn | Pro | Ser | Thr | Asp | Tyr | Thr | Glu | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Asp

<210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus <chuột, loài>

<220>

<223> 277 H-CDR3

<400> 53

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Arg | Thr | Gly | Asn | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |

<210> 54

<211> 399

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Miền ngoại bào của TrkB người

<400> 54

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |  |
| Val | Glu | Glu | Gly | Lys | Ser | Ile | Thr | Leu | Ser | Cys | Ser | Val | Ala | Gly | Asp |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Pro | Val | Pro | Asn | Met | Tyr | Trp | Asp | Val | Gly | Asn | Leu | Val | Ser | Lys | His |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Met | Asn | Glu | Thr | Ser | His | Thr | Gln | Gly | Ser | Leu | Arg | Ile | Thr | Asn | Ile |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Ser | Ser | Asp | Asp | Ser | Gly | Lys | Gln | Ile | Ser | Cys | Val | Ala | Glu | Asn | Leu |  |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Val | Gly | Glu | Asp | Gln | Asp | Ser | Val | Asn | Leu | Thr | Val | His | Phe | Ala | Pro |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Thr | Ile | Thr | Phe | Leu | Glu | Ser | Pro | Thr | Ser | Asp | His | His | Trp | Cys | Ile |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Pro | Phe | Thr | Val | Lys | Gly | Asn | Pro | Lys | Pro | Ala | Leu | Gln | Trp | Phe | Tyr |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Asn | Gly | Ala | Ile | Leu | Asn | Glu | Ser | Lys | Tyr | Ile | Cys | Thr | Lys | Ile | His |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Val | Thr | Asn | His | Thr | Glu | Tyr | His | Gly | Cys | Leu | Gln | Leu | Asp | Asn | Pro |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |     |     | 320 |  |
| Thr | His | Met | Asn | Asn | Gly | Asp | Tyr | Thr | Leu | Ile | Ala | Lys | Asn | Glu | Tyr |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Gly | Lys | Asp | Glu | Lys | Gln | Ile | Ser | Ala | His | Phe | Met | Gly | Trp | Pro | Gly |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Ile | Asp | Asp | Gly | Ala | Asn | Pro | Asn | Tyr | Pro | Asp | Val | Ile | Tyr | Glu | Asp |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Tyr | Gly | Thr | Ala | Ala | Asn | Asp | Ile | Gly | Asp | Thr | Thr | Asn | Arg | Ser | Asn |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Glu | Ile | Pro | Ser | Thr | Asp | Val | Thr | Asp | Lys | Thr | Gly | Arg | Glu | His |     |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     |     |  |

```
<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 55  
Gly Tyr Trp Met His  
1 5

```
<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus <chuột, loài>
```

<220>  
<223> 277 H-CDR2

```
<400> 56
Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Asp Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1          5          10          15
Asp
```

|                       |    |
|-----------------------|----|
| $\langle 210 \rangle$ | 57 |
| $\langle 211 \rangle$ | 6  |

<212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 H-CDR3

<400> 57  
 Ser Arg Thr Gly Asn Tyr  
 1 5

<210> 58  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 H-CDR1

<400> 58  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 1 5

<210> 59  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 H-CDR2

<400> 59  
 Asn Pro Ser Thr Asp Tyr  
 1 5

<210> 60  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus <chuột, loài>

<220>  
 <223> 277 H-CDR3 Chothia

<400> 60  
 Ser Arg Thr Gly Asn Tyr  
 1 5