



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

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

(11)



1-0044705

(51)^{2020.01} C07K 16/18; A61K 9/00; C07K 14/47; (13) B
A61K 38/17; A61P 25/28

(21) 1-2021-07390

(22) 08/05/2020

(86) PCT/EP2020/062802 08/05/2020

(87) WO2020/225400 12/11/2020

(30) 19173454.0 09/05/2019 EP

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/05/2022 410A

(71) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)

Binger Strasse 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, Germany

(72) THOMAS, Leo (DE); BARRETT, Rachel, Rebecca (US); BOVAT, Kristin, Laura (US); GANESAN, Rajkumar (US); GUPTA, Priyanka (IN); HAN, Fei (US); LIU, Dongmei (US); PRESTLE, Juergen (DE); SINGH, Sanjaya (US); VENKATARAMANI, Sathyadevi (US); WU, Helen, Haixia (US); ZIPPEL, Nina (DE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG SEMA3A ĐỂ ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH VỀ MẮT, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG SEMA3A, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ KHÁNG SEMA3A, POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP, VECTƠ BIỂU HIỆN VÀ TẾ BÀO CHỦ CHỨA POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP

(21) 1-2021-07390

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc các mảnh của chúng mà hướng đích semaphorin 3A (Sema3A). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng Sema3A mà hữu dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng Sema3A này, phương pháp sản xuất kháng thể kháng Sema3A, polynucleotit được phân lập, vectơ biểu hiện và tế bào chủ chứa polynucleotit được phân lập này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế nói chung đề cập đến các kháng thể và các mảnh của chúng mà hướng đích semaphorin 3A (Sema3A). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng Sema3A và phương pháp sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau. Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm và kit chứa kháng thể kháng Sema3A.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh lý võng mạc thiếu máu cục bộ đặc trưng bởi sự mất hoặc rối loạn chức năng của mạch máu võng mạc, mà dẫn đến giảm lưu lượng máu và giảm oxy huyết. Chứng thiếu máu cục bộ của võng mạc dẫn đến sự điều hòa tăng của các yếu tố sinh trưởng tiền tạo mạch mà thúc đẩy sự tân tạo mạch võng mạc, mà có thể dẫn đến bị mù. Tuy nhiên, sự tái tạo mạch của võng mạc thiếu máu cục bộ không xảy ra, khi có sự tân tạo mạch bệnh lý mạnh mẽ vào trong dịch kính, một vùng của mắt thường không có các mạch máu.

Sự sinh trưởng của các mạch mới bất thường này tạo ra hầu hết các mối đe dọa đối với thị lực vì chúng có thể bị rò rỉ, dẫn đến xuất huyết hoặc dẫn đến hình thành sẹo mà có thể kết thúc bằng bong võng mạc. Các điều trị hiện nay đối với các bệnh lý võng mạc thiếu máu cục bộ là tìm cách ngăn chặn sự sinh trưởng của các mạch bệnh lý nhưng không giải quyết được chứng thiếu máu cục bộ tiềm ẩn mà thúc đẩy sự sinh trưởng của chúng. Hơn thế nữa, điều trị tiêu chuẩn cho bệnh lý võng mạc do đái tháo đường bao gồm sự phá hủy một phần võng mạc bằng laze nhằm dừng sự sinh trưởng mạch mới và duy trì thị lực trung tâm. Tuy nhiên, các điều trị này ở một chừng mực nào đó không có hiệu quả. Trong khi một số bệnh nhân có thể duy trì thị lực ổn định trong nhiều năm, tỉ lệ phần trăm cao số bệnh nhân bị bệnh lý võng mạc cuối cùng bị mất thị lực hoàn toàn.

Do đó, vẫn có nhu cầu chưa được đáp ứng đối với các cách tiếp cận trị liệu để điều trị một cách hiệu quả các bệnh về mắt hoặc võng mạc.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sema3A là protein được tiết nội sinh mà thuộc họ semaphorin nhóm 3 (Sema3), mà được xác định ban đầu là các phân tử dẫn sợi trục và có liên quan đến tìm đường mạch và sự hình thành mạng lưới. Neuropilin 1 và 2 (Nrp1 và Nrp2) và các plexin loại A/D (Plxns) hoạt động như các tiểu đơn vị liên kết phối tử và tải nạp tín hiệu của các phức hợp thụ thể Sema3 trên bề mặt của các tế bào nội mô (endothelial cell - EC). Là thành viên cụ thể của họ Sema3, Sema3A liên kết duy nhất với Nrp1 lúc đầu và sau đó kết hợp với PlexinA1–4 ở dạng phức hợp (Nrp1/PlexA1–4). Trong phức hợp thụ thể này, Nrp1 hoạt động ở dạng phân tử liên kết, trong khi PlexA1–4 hoạt động ở dạng phân tử tải nạp tín hiệu.

Semaphorin 3A ở người là protein như được bộc lộ trong SEQ ID NO: 22 và sẵn có ở Trình tự tham chiếu NCBI NP_006071.1. Ngoài ra, Sema3A ở người được mã hóa bởi Gene ID: 10371 (NCBI).

Sema3A đã được nghiên cứu trong sự tạo mạch và sự di căn khối u trong nhiều năm, nhưng tác động của nó đối với sự tân tạo mạch võng mạc vẫn chưa biết rõ. Các tác giả sáng chế đã lấy ví dụ rằng Semaphorin 3A được tiết bởi các tế bào hạch võng mạc giảm oxy huyết và hoạt động như dấu hiệu đẩy mạch. Sema3A đẩy lùi các mạch tân tạo ra khỏi vùng thiếu máu cục bộ bằng việc cảm ứng sự tan vỡ khung tế bào ở các tế bào này. Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, các tác giả sáng chế đã giả thuyết rằng điều này sẽ giải thích tại sao sự tái tạo mạch của các vùng thiếu máu cục bộ không xảy ra và thay vào đó là sự điều hòa tăng Sema3A dẫn đến sự tân tạo mạch bệnh lý vào trong vùng dịch kính.

Semaphorin 3A được tiết bởi các tế bào thần kinh giảm oxy huyết ở võng mạc thiếu máu cục bộ/không mạch, do đó ức chế sự tái sinh mạch của võng mạc và tăng cường sự tân tạo mạch tiền võng mạc bệnh lý.

Các tác giả sáng chế đã giải quyết tình trạng bệnh lý này bằng cách phát triển các kháng thể hướng đích Sema3A. Do đó, sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng mà liên kết đặc hiệu với Sema3A, cụ thể là Sema3A ở người.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13;

trong đó:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 11, tương ứng;
- b. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 11, tương ứng;
- c. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12, tương ứng; hoặc
- d. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 13, tương ứng.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- chuỗi nặng bao gồm, tốt hơn là gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19; và
- chuỗi nhẹ bao gồm, tốt hơn là gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15;
- b. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15;
- c. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18; hoặc
- d. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, kháng thể kháng Sema3A là kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với ít nhất một gốc axit amin bên trong các vùng axit amin 370-382 của Sema3A ở người như được mô tả trong SEQ ID NO: 22.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với ít nhất một gốc axit amin bên trong các vùng axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 21 (DSTKDLPPDDVITF). Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với các vùng axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 21.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng làm thuốc.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để ức chế tác dụng ức chế mạch của SemaA, và/hoặc để cải thiện sự tái tạo mạch của võng mạc.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh võng mạc hoặc bệnh mắt.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lý võng mạc, bệnh lý võng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh lý võng mạc do đái tháo đường bao gồm bệnh lý võng mạc do đái tháo đường tăng sinh và bệnh lý võng mạc do đái tháo đường không tăng sinh, bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường, chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi, bệnh viêm võng mạc sắc tố, chứng loạn dưỡng võng mạc di truyền, bệnh thoái hóa cận thị, tắc động mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng bồ đào, phù hoàng điểm dạng kén, màng tân tạo mạch màng mạch thứ phát sau các bệnh võng mạc bất kỳ, các bệnh lý thần kinh thị giác, bệnh tăng nhãn áp, bệnh bong võng mạc, bệnh lý võng mạc độc tố, bệnh lý võng mạc bức xạ, bệnh lý võng mạc chấn thương, bệnh lý mạch võng mạc do thuốc gây ra, sự tân tạo mạch võng mạc, bệnh lý mạch màng mạch dạng polyp, viêm mạch võng mạc, phì mao mạch võng mạc, chứng loạn dưỡng Fuch, chứng giãn mao mạch điểm vàng, hội chứng usher, và bệnh Stargardt.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lý võng mạc do đái tháo đường bao gồm bệnh lý võng mạc do đái tháo đường tăng sinh và bệnh lý võng mạc do đái tháo đường không tăng sinh, bệnh lý võng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường, chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường, phù hoàng điểm do tuổi, sự tân tạo mạch võng mạc, bệnh tăng nhãn áp và sự tân tạo mạch màng mạch. Tốt hơn là, bệnh đã nêu là bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường và/hoặc chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường, bằng cách thúc đẩy sự tái sinh mạch bên trong võng mạc thiếu máu cục bộ (sự tái tạo mạch) và ngăn ngừa sự tân tạo mạch bệnh lý của vùng dịch kính của mắt.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường, bằng cách giảm khả năng thấm qua của hàng rào máu võng mạc.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để ức chế khả năng thấm qua được cảm ứng bởi Sema3A của hàng rào máu võng mạc và/hoặc sự thoái triển mạch được cảm ứng bởi Sema3A từ các vùng thiếu máu cục bộ.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và chất mang được dụng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc dược phẩm chứa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể đã nêu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được dùng qua đường sử dụng ngoài đường tiêu hóa, đường dùng trong tĩnh mạch, đường dùng qua nội nhãn hoặc đường dưới da, tốt hơn là qua đường dùng qua nội nhãn.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập bao gồm:

- trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và
- trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector virus chứa polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa vector biểu hiện hoặc polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm bước thu tế bào chủ chứa vector biểu hiện hoặc polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10

hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13; và nuôi cấy tế bào chủ.

Theo một phương án, phương pháp sản xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó còn bao gồm bước thu hồi và tinh chế kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Sự khu trú của Sema3A ở mắt người.

Hình này thể hiện sự khu trú của Sema3A ở mắt người trong mẫu võng mạc được xác lập trước từ người cho có tiền sử bệnh lý võng mạc do đái tháo đường hoặc bệnh tăng nhãn áp góc mở nguyên phát (POAG) trong sự so sánh với các đối chứng phù hợp về tuổi (đối chứng tuổi) và các đối tượng bị bệnh đái tháo đường, nhưng không có bệnh lý về mắt (đối chứng DM). Sema3A được tìm thấy ở thành mạch của các mạch máu võng mạc. Ngoài ra, các vật thể phát huỳnh quang Sema3A chưa xác định nhưng phân biệt được quan sát thấy ở lớp tế bào hạch võng mạc.

Fig. 2: Hiệu quả ở thử nghiệm khả năng thâm tế bào.

Sự thâm của FITC-dextran trong các tế bào nội mô vi mạch võng mạc người được đo ở thử nghiệm xuyên giếng. Kháng thể kháng TNP là kháng thể đối chứng chống lại trinitrophenol. Kháng thể kháng Sema3A là kháng thể theo sáng chế (vòng vô tính I). Mức ý nghĩa được thể hiện so với Sema3A tái tổ hợp của người.

Fig. 3: Sự tan vỡ khung tế bào ở HRMEC (Xcelligence).

Sema3A-F tất cả đều cảm ứng sự tan vỡ khung tế bào ở các tế bào nội mô võng mạc người. Kháng thể theo sáng chế (dòng vô tính I) là đặc hiệu đối với Sema3A và ngăn ngừa chỉ sự tan vỡ được cảm ứng bởi Sema3A.

Fig. 4: Tác động đến mật độ tế bào đầu mút và vùng không mạch in vivo.

(A) và (C) Mật độ tế bào đầu mút và vùng không mạch được điều tra ở mô hình bệnh lý võng mạc được cảm ứng bởi oxy ở các con chuột nhắt con. Các con vật này được tiếp xúc

với oxy 75% từ P7 đến P12 và được tiếp nhận một mũi tiêm đơn qua nội nhãn chứa kháng thể sau khi trở lại đến mô có lượng oxy thông thường vào P12. Kháng thể kháng TNP là kháng thể đối chứng chống lại trinitrophenol. Kháng thể kháng Sema3A là kháng thể theo sáng chế (vòng vô tính I). Ở P17, các lượng phẳng võng mạc được chuẩn bị, được nhuộm bằng isolectin B4 và được sử dụng để đếm các tế bào đầu mút và sự xác định kích thước của vùng không mạch võng mạc.

(B) Mỗi tương quan giữa mật độ tế bào đầu mút và vùng không mạch được thể hiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Cấu trúc được tổng quát hóa của các kháng thể hoặc globulin miễn dịch là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, các phân tử này là các glycoprotein heterotetrame, thường là khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ (L) giống nhau và hai chuỗi nặng (H) giống nhau. Mỗi chuỗi nhẹ được liên kết cộng hóa trị với một chuỗi nặng bởi một liên kết disulfit để tạo thành heterodime, và phân tử heterotrime được hình thành thông qua liên kết cộng hóa trị disulfit giữa hai chuỗi nặng giống nhau của các heterodime. Mặc dù các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết với nhau bằng một liên kết disulfit, song số lượng các liên kết disulfit giữa hai chuỗi nặng thay đổi bởi isotyp globulin miễn dịch. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các cầu disulfit nội chuỗi cách đều nhau. Mỗi chuỗi nặng có tại đầu cùng amin một miền biến đổi (V_H = chuỗi nặng biến đổi), theo sau là ba hoặc bốn miền không đổi (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , và C_{H4}), cũng như một vùng bản lề giữa C_{H1} và C_{H2} . Mỗi chuỗi nhẹ có hai miền, một miền biến đổi đầu cùng amin (V_L = chuỗi nhẹ biến đổi) và một miền không đổi đầu carboxy (C_L). Miền V_L liên kết không cộng hóa trị với miền V_H , trong khi miền C_L thường được liên kết cộng hóa trị với miền C_{H1} thông qua liên kết disulfit. Các gốc axit amin đặc biệt được cho là hình thành giao diện giữa các miền biến đổi 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, là "siêu biến đổi". Các miền siêu biến đổi này chứa các gốc có liên quan trực tiếp đến sự liên 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 chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, tập trung ở ba đoạn được gọi là các vùng quyết định bổ sung (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, thì 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 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 chuỗi nặng. Do đó, CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ xác định các đặc tính chức năng và tính 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 cùng amin đến đầu carboxy của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các FR và CDR được sắp xếp theo thứ tự: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Các cấu hình tấm β lớn của các FR mang các CDR bên trong mỗi chuỗi trong số các chuỗi đến gần nhau cũng như gần với các CDR từ chuỗi khác. Cấu hình thu được đóng góp vào vị trí liên kết kháng nguyên (xem Kabat et al., 1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, trang 647-669), mặc dù không phải tất cả các gốc CDR nhất thiết phải liên quan trực tiếp đến sự liên kết kháng nguyên.

Các gốc FR và miền không đổi Ig không liên quan trực tiếp đến sự liên kết kháng nguyên, nhưng góp phần vào sự liên kết kháng nguyên và/hoặc làm trung gian cho chức năng tác động của kháng thể. Một số gốc FR được cho là có ảnh hưởng đáng kể đến sự liên kết kháng nguyên theo ít nhất ba cách: bằng cách liên 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 liên kết kháng nguyên mà làm trung gian cho các chức năng tác động Ig khác nhau, như

sự tham gia của kháng thể trong khả năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity-ADCC), khả năng gây độc tế bào phụ thuộc phần bổ sung (complement-dependent cytotoxicity-CDC) và sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular phagocytosis-ADCP).

Các chuỗi nhẹ cả globulin miễn dịch động vật có xương sống được chỉ định vào một trong hai nhóm khác nhau rõ rệt, kappa (κ) và lambda (λ), dựa vào trình tự axit amin của miền không đổi. Để so sánh, các chuỗi nặng của globulin miễn dịch của động vật có vú được chỉ định vào 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 chuỗi nặng mà tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ , tương ứng. Các cấu trúc tiểu đơn vị và các cấu hình không gian ba chiều của các nhóm globulin miễn dịch tự nhiên cũng đã biết rõ.

Các thuật ngữ, "kháng thể", "kháng thể kháng Sema3A", "kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa", và "kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa biến thể" được sử dụng ở đây theo nghĩa rộng nhất và đặc biệt bao hàm các kháng thể đơn dòng (bao gồm các kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ), kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và các mảnh kháng thể như các miền biến đổi và các phần khác của kháng thể mà thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn, ví dụ, liên kết với Sema3A.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" (mAb) 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 nhau ngoại trừ các đột biến xảy ra tự nhiên mà 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 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 thể lai (Kohler et al., 1975, Nature 256:495), hoặc phương pháp ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, bằng sáng chế 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 thực khuẩn thể, bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-628, và Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597.

Các kháng thể khảm gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể từ một loài (ví dụ, động vật có vú không phải người như chuột nhắt) và các vùng không đổi 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 thứ nhất (ví dụ, chuột nhắt) 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 được 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 với, tương đồng với, hoặc là biến thể của trình tự tương ứng trong kháng thể đơn dòng từ nhóm hoặc một isotyp globulin miễn dịch khác, hoặc từ trình tự liên ứng hoặc trình tự dòng mầm. Các kháng thể khảm có thể bao gồm các mảnh của các kháng thể như vậy, với điều kiện là mảnh kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn của kháng thể ban đầu của nó, ví dụ như liên kết với cùng epitop (xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

Các thuật ngữ, "mảnh kháng thể", "mảnh liên kết kháng nguyên", "mảnh kháng thể kháng Sema3A", "mảnh kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa", "mảnh kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa biến thể" để chỉ một phần của kháng thể kháng Sema3A chiều dài đầy đủ, trong đó vùng biến đổi hoặc khả năng hoạt động chức năng được giữ lại, ví dụ, sự liên kết epitop Sema3A đặc hiệu. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv và scFv-Fc, kháng thể dime, kháng thể mạch thẳng, kháng thể đơn chuỗi, kháng thể nhỏ, kháng thể dime được tạo thành từ các mảnh kháng thể, và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể.

Kháng thể chiều dài đầy đủ có thể được xử lý bằng các enzym như papain hoặc pepsin để tạo ra các mảnh kháng thể hữu ích. Sự phân giải bằng papain được sử dụng để tạo thành hai mảnh kháng thể liên kết kháng nguyên giống nhau được gọi là các mảnh Fab, mỗi mảnh có một vị trí liên kết kháng nguyên duy nhất, và một mảnh Fc còn lại. Mảnh Fab

còn chứa miền không đổi của chuỗi nhẹ và miền C_{H1} của chuỗi nặng. Xử lý bằng pepsin tạo ra mảnh $F(ab')_2$ mà có hai vị trí liên kết kháng nguyên và vẫn có khả năng liên kết ngang với kháng nguyên.

Các mảnh Fab' khác với các mảnh Fab bởi sự có mặt của các gốc bổ sung bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề kháng thể tại đầu cùng C của miền C_{H1} . Các mảnh kháng thể $F(ab')_2$ là các cặp mảnh Fab' được liên kết bởi các gốc xystein trong vùng bản lề. Các cách ghép cặp hóa học khác giữa các mảnh kháng thể cũng đã biết.

Mảnh "Fv" chứa vị trí nhận biết kháng nguyên và liên kết kháng nguyên trọn vẹn gồm dime của một miền biến đổi chuỗi nặng và một miền biến đổi 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 liên kết kháng nguyên trên bề mặt của dime V_H - V_L . Nói chung, sáu CDR tạo ra tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên cho kháng thể.

Mảnh kháng thể "Fv đơn chuỗi" hoặc "scFv" là biến thể Fv đơn chuỗi bao gồm các miền V_H và V_L của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Fv đơn chuỗi có khả năng nhận biết và liên kết kháng nguyên. Polypeptit scFv cũng có thể tùy ý chứa một liên kết polypeptit được định vị giữa các miền V_H và V_L để tạo điều kiện hình thành cấu trúc ba chiều mong muốn cho sự liên 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 mảnh kháng thể được nhận diện khác bao gồm các mảnh gồm một cặp đoạn Fd nối tiếp (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}) để tạo thành một cặp vùng liên kết kháng nguyên. "Các kháng thể mạch 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 nhân hóa hoặc mảnh kháng thể được nhân hóa là loại kháng thể khảm đặc hiệu bao gồm biến thể trình tự axit amin globulin miễn dịch, hoặc mảnh của chúng, có khả năng liên kết với kháng nguyên được xác định trước và bao gồm một hoặc nhiều FR về cơ bản có trình tự axit amin của globulin miễn dịch của người và một hoặc nhiều CDR về cơ bản 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", cụ thể là miền biến đổi. Nói chung, kháng thể được nhân hóa bao gồm ít nhất là CDR hoặc HVL của kháng thể không phải người, được chèn vào giữa các FR của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của người.

Sáng chế mô tả các kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa đặc hiệu mà chứa các CDR có nguồn gốc từ kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm được chèn vào giữa các FR của các miền biến đổi 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 nhân hóa và do đó, một số gốc của các miền biến đổi 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.

Như được sử dụng ở đây, sự thể hiện "kháng thể theo sáng chế" và "kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế" để chỉ kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây. Tốt hơn là, sự thể hiện đã nêu để chỉ kháng thể bất kỳ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa bao gồm gần như toàn bộ trong số ít nhất một, và thông thường là hai, miền biến đổi (như được chứa, ví dụ, trong các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, và Fv) trong đó tất cả, hoặc gần như tất cả các CDR tương ứng với các CDR của globulin miễn dịch không phải của người, và cụ thể ở đây, các CDR là các trình tự của chuột, và các FR là các FR của trình tự liên ứng hoặc trình tự dòng mầm của globulin miễn dịch người. Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa cũng bao gồm ít nhất một phần của vùng Fc globulin miễn dịch, thường là vùng Fc của 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 trong số vùng CH₁, bản lề, CH₂, CH₃, và/hoặc CH₄ của chuỗi nặng, nếu thích hợp.

Kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa có thể được chọn từ nhóm globulin miễn dịch bất kỳ, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và isotyp bất kỳ, bao gồm IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ và IgA₂. Ví dụ, miễn không đổi có thể là miễn không đổi cố định bổ sung trong đó mong muốn rằng kháng thể được nhân hóa thể hiện hoạt tính gây độc tế bào, và isotyp thông thường là IgG₁. Khi hoạt tính gây độc tế bào là không mong muốn, miễn không đổi có thể thuộc isotyp khác, ví dụ, IgG₂. Kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa thay thế có thể bao gồm các trình tự từ nhiều hơn một nhóm hoặc isotyp globulin miễn dịch, và việc lựa chọn các miễn không đổi cụ thể để tối ưu hóa các chức năng yếu tố tác động mong muốn là nằm trong hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể mà là các kháng thể IgG1 và cụ thể hơn là các kháng thể IgG1 được đặc trưng bởi chức năng yếu tố tác động giảm.

Tốt hơn là, kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế là kháng thể được nhân hóa được tạo định dạng là IgG1KO.

Các FR và CDR, hoặc HVL của kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa không cần phải tương ứng chính xác với các trình tự gốc. Ví dụ, một hoặc nhiều gốc trong CDR nhập khẩu, hoặc HVL, hoặc trình tự FR liên ứng hoặc dòng mầm có thể thay đổi (ví dụ, được gây đột biến) bằng cách thế, chèn hoặc loại bỏ sao cho gốc axit amin thu được không còn giống với gốc ban đầu ở vị trí tương ứng ở trình tự gốc nhưng tuy nhiên kháng thể này vẫn giữ chức năng liên kết với Sema3A. Sự 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 nhân hóa sẽ tương ứng với các gốc của các trình tự CDR nhập khẩu và FR liên ứng hoặc dòng mầm ban đầu, phổ biến hơn là ít nhất 90%, và phổ biến 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 chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ("giao diện V_L-V_H") 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 V_L 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, và 98 và các gốc V_H 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100, và 103 (sử dụng hệ thống đánh số được nêu trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda,

Md., 1987)). Bằng sáng chế Mỹ số 6,407,213 cũng thảo luận rằng các gốc như các gốc V_L 43 và 85, và các gốc V_H 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 tiểu đơn vị cụ thể bất kỳ, ví dụ, miền biến đổi của globulin miễn dịch của người. Trình tự liên ứng có thể dựa trên các 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 bao gồm 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 nó. Các FR của các trình tự liên ứng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và các biến thể của nó, cung cấp các trình tự hữu dụng cho việc điều chế các kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa. Xem, ví dụ, Bằng sáng chế Mỹ số 6,037,454 và 6,054,297.

Các trình tự dòng mầm của người được phát hiện trong tự nhiên ở quần thể người. Sự 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 được 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 đến sự phân lập ít nhất là trên 95% khối lượng của kháng thể.

Thuật ngữ "hiệu suất kháng thể" dùng để chỉ các yếu tố/đặc tính góp phần nhận diện kháng thể của kháng nguyên hoặc hiệu quả của kháng thể in vivo. Theo phương án được ưu tiên, nó đề cập đến khả năng của kháng thể ngăn chặn sự tan vỡ khung tế bào ở các tế bào vòng mạc. Những thay đổi ở trình tự axit amin của kháng thể có thể ảnh hưởng đến các tính chất của kháng thể như sự 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 (k_a), hằng số phân ly của kháng thể từ kháng nguyên (k_d), hằng số ái lực của kháng thể cho kháng nguyên (K_d), 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 "tương đồng" hoặc "phần trăm tương đồng", trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit nucleic hoặc polypeptit, để chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc phân trình tự là giống nhau hoặc có mức phần trăm đã định của các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống nhau, khi được so sánh và căn thẳng hàng để có sự tương ứng tối đa. Để xác định phần trăm tương đồng, các trình tự được căn 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 căn 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 tương đồng tại vị trí đó. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là hàm số của số lượng vị trí tương đồng chia đều cho các trình tự (tức là, % tương đồng = số lượng vị trí tương đồng/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 tương đồng 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. 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 trọng số 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. Cách khác, sự căn 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.

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 là, động vật có vú là người.

"Bệnh" hoặc "rối loạn", như được sử dụng ở đây, là tình trạng bất kỳ mà có lợi từ sự điều trị bằng kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa được mô tả ở đây. 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.

Thuật ngữ "tiêm nội nhãn" có nghĩa thông thường của nó trong lĩnh vực và để chỉ việc đưa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó vào trong dịch kính của bệnh nhân.

Thuật ngữ "dùng dưới da" để chỉ việc đưa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó vào dưới da của bệnh nhân là người hoặc động vật, ưu tiên bên trong túi nằm giữa da và mô bên dưới, bằng cách phân phối tương đối chậm, kéo dài 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, kéo dài 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 nhanh (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 nhanh 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 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 quả điều trị" được sử dụng để chỉ lượng kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà làm giảm hoặc thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng của các rối loạn đang được điều trị. Đó là lượng mà có kết quả có lợi cho bệnh nhân. Hiệu quả có thể được xác định theo những cách thông thường, tùy thuộc vào tình trạng được điều trị. Ví dụ, ở các bệnh hoặc rối loạn ở mắt/võng mạc được đặc trưng bởi các tế bào biểu hiện Sema3A, hiệu quả có thể được đo bằng cách xác định các tỉ lệ đáp ứng, ví dụ, sự phục hồi thị lực hoặc bằng cách đánh giá thời gian trì hoãn cho tới 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 dùng kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trước hoặc sau khi khởi phát triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn nhờ đó ngăn chặn hoặc loại bỏ một hoặc nhiều dấu hiệu của bệnh hoặc rối loạn. Ví dụ khác là, thuật ngữ này bao gồm

việc sử dụng kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó sau khi có biểu hiện lâm sàng của bệnh để chống lại các triệu chứng của bệnh. Hơn nữa, việc dùng kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó 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, cho dù việc điều trị có dẫn đến sự 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 chất trị liệu 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 Sema3A hoặc mảnh liên 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 hướng dẫn sử dụng đi kèm" 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 theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Tốt hơn là, kháng thể đã nêu là kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa, tốt hơn nữa là kháng thể kháng Sema3A đơn dòng được nhân hóa.

Ở sự phân tích đặc điểm ban đầu, thư viện các kháng thể hướng đích các biến thể Sema3A được sinh ra bằng cách đặt các CDR của các kháng thể chuột vào trong các FR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên ứng của người và hơn thế nữa bằng cách thiết kế các FR với các sự thay đổi khác nhau.

Điều này dẫn đến các kháng thể được nhân hóa được định hướng kháng Sema3A với các tính chất được tăng cường như được bộc lộ ở đây. Các trình tự của kháng thể theo sáng chế được trình bày trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1:

Tên	Trình tự axit amin	SEQ ID NO
HCDR1	SYYMS	SEQ ID NO: 1
HCDR2	TIKSGGYAY YPDSVKD	SEQ ID NO: 2
HCDR3	GGQGAMDY	SEQ ID NO: 3
LCDR1	RASQSIGDYL H	SEQ ID NO: 4
LCDR2	YASQSIG	SEQ ID NO: 5
LCDR3	QQGYSPYT	SEQ ID NO: 6
VH – biến thể 1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSS	SEQ ID NO: 7
VH – biến thể 2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSS	SEQ ID NO: 8
VH – biến thể 3	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSS	SEQ ID NO: 9
VH- biến thể 4	EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAYY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSS	SEQ ID NO: 10
VL – biến thể a	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTITSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 11
VL – biến thể b	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIYY ASQSIGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 12

VL- biến thể c	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIK	SEQ ID NO: 13
Chuỗi nặng- Dòng vô tính I	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 14
Chuỗi nhẹ- Dòng vô tính I	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	SEQ ID NO: 15
Chuỗi nặng - Dòng II	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFPFS SYYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCVRGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN	SEQ ID NO: 16

	YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	
Chuỗi nặng- Dòng vô tính III	EVQLVESGGG LVQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 17
Chuỗi nhẹ – Dòng vô tính III	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIYY ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	SEQ ID NO: 18
Chuỗi nặng- Dòng vô tính IV	EVQLVESGGG LLQLGGSLRL SCAASGFTFS SYMSWVRQA PGKGLEWVST IIKSGGYAAY PDSVKDRFTI SRDNSKNTLN LQMNSLRAED TAVYYCVKGG QGAMDYWGQG TTVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 19

Chuỗi nhẹ – Dòng vô tính IV	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG DYLHWYQQKP GQAPRLLIK Y ASQSISGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ GYSFPYTFGG GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	SEQ ID NO: 20
-----------------------------------	---	---------------

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và

- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin tương đồng 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: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13;

trong đó:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 11, tương ứng;
- vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 11, tương ứng;
- vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12, tương ứng; hoặc
- vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 13, tương ứng.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- chuỗi nặng bao gồm, tốt hơn là gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 19; và
- chuỗi nhẹ bao gồm, tốt hơn là gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15, kháng thể đã nêu được gọi là “dòng vô tính I”;
- b. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15, kháng thể đã nêu được gọi là “dòng vô tính II”;
- c. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, kháng thể đã nêu được gọi là “dòng vô tính III”; hoặc
- d. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, kháng thể đã nêu được gọi là “dòng vô tính IV”.

Các thể đột biến IgG1-KO đã được tạo ra bằng cách đưa các đột biến vào trong vùng Fc. Các đột biến để làm giảm hoặc ức chế chức năng yếu tố tác động đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và được bộc lộ rõ ràng trong tình trạng kỹ thuật, ví dụ trong tài liệu Wang et al, Protein Cell 2018, 9(1):63–73 và Stewart et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2014, 2:29. Thông thường, danh sách không giới hạn các đột biến được đưa vào trong vùng IgG1 Fc để làm giảm chức năng yếu tố tác động của Fc bao gồm:

- L234A và L235A;
- L234A, L235A, và N297Q;
- L234A, L235A, và P329G; hoặc

- L234A, L235A, và D265A;

trong đó các gốc được đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế bao gồm hai đột biến L234A và L235A ở vùng Fc để làm giảm chức năng yếu tố tác động.

CDR được bộc lộ ở đây và được mô tả trong SEQ ID NO: 1 đến 6 được thể hiện theo cách đánh số Kabat và được tổng hợp trong bảng 2 dưới đây với vị trí Kabat.

Bảng 2:

CDR	Trình tự Kabat	Vị trí Kabat	SEQ ID NO:
HCDR1	SYYSMS	31-35	1
HCDR2	TIKSGGYAYYPDSVKD	50-66	2
HCDR3	GGQGAMDY	99-106	3
LCDR1	RASQSIGDY LH	24-34	4
LCDR2	YASQSIG	50-56	5
LCDR3	QQGYSPY T	89-97	6

Kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế liên kết với ái lực cao với Sema3A người. Theo một phương án liên quan đến khía cạnh này, kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế liên kết với Sema3A người tại $K_D < 50$ pM. Theo phương án khác, kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế liên kết với Sema3A người tại $K_D < 35$ pM, như được minh họa trong Ví dụ 4. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế liên kết với Sema3A người tại $K_D < 30$ pM.

Kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế cũng liên kết với Sema3A của cyno, Sema3A chuột nhắt, Sema3A chuột cống và Sema3A thỏ.

Kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế ngăn ngừa sự tan vỡ khung tế bào do Sema3A gây ra ở các tế bào võng mạc với hoạt lực chức năng nhỏ hơn 100 pM, tốt hơn là nhỏ hơn 80 pM, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 70 pM. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể

kháng Sema3A theo sáng chế ngăn ngừa sự tan vỡ khung tế bào do Sema3A gây ra ở các tế bào võng mạc với hoạt lực chức năng là 69 pM, như được minh họa trong Ví dụ 4.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế đã chứng minh là có nguy cơ gây miễn dịch thấp như được mô tả trong Ví dụ 5. Điều này dựa vào sự dự đoán *in silico* tính sinh miễn dịch của kháng thể. Nguy cơ sinh miễn dịch thường được đánh giá bằng các phương pháp khác nhau đã biết rõ như bằng thuật toán trên máy tính để dự đoán các epitop tế bào T, yếu tố ảnh hưởng tính sinh miễn dịch chính.

Thực vậy, đã được báo cáo rằng các trình tự chứa các epitop tế bào T có mặt trong các protein quan tâm có thể được dự đoán bằng cách sử dụng thuật toán dựa trên phương pháp tiếp cận ma trận tính toán bằng máy tính, sẵn có dưới tên EpiMatrix (được sản xuất bởi EpiVax). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể đề cập đến Van Walle et al., Expert Opin Biol Ther. 2007 March; 7(3): 405-18 và Jawa and al., Clin Immunol. 2013 Dec;149(3):534-55.

Các tác giả sáng chế đã chứng tỏ rằng kháng thể theo sáng chế thể hiện các tính chất có lợi hơn so với các kháng thể khác hoặc các mảnh hướng đích Sema3A được đề cập trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả ở đây.

Các tác giả sáng chế đã so sánh ái lực liên kết của kháng thể hướng đích Sema3A được bộc lộ trong WO2014123186 (Chiome Bioscience) với ái lực của kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể của WO2014123186 được bộc lộ để sử dụng trong điều trị bệnh Alzheimer. Ví dụ 8 của sáng chế thể hiện rằng kháng thể theo sáng chế đã chứng tỏ có các ái lực liên kết cao hơn đối với Sema3A người so với kháng thể trong giải pháp đã biết được bộc lộ bởi Chiome Bioscience.

Các tác giả sáng chế cũng đã so sánh các tính chất của kháng thể theo sáng chế với các mảnh ScFv được bộc lộ trong WO2017074013 (Samsung). Các mảnh này được bộc lộ để sử dụng trong điều trị các bệnh ung thư khác nhau. Ví dụ 9 theo sáng chế chứng tỏ rằng kháng thể theo sáng chế đã chứng minh là có các ái lực liên kết cao hơn đối với Sema3A người so với các mảnh kháng thể của giải pháp đã biết được bộc lộ bởi WO2017074013.

Ái lực liên kết cao hơn kéo dài thời gian để trung hòa Sema3A sau khi tiêm nội nhãn và cho phép giảm tần suất tiêm. Ái lực liên kết cao hơn cho phép sử dụng liều thấp hơn, hạn chế các tác dụng phụ tiềm ẩn. Kháng thể theo sáng chế do đó đưa ra các ưu điểm kỹ thuật so với các kháng thể của giải pháp đã biết. Ái lực liên kết được cải thiện và tần suất tiêm giảm cải thiện một cách đáng kể hiệu quả điều trị cho bệnh nhân cần điều trị. Nó cũng cung cấp các lợi ích có giá trị cho bệnh nhân, đặc biệt là cải thiện sự tuân thủ và tuân theo hướng dẫn dùng thuốc.

Các tác giả sáng chế cũng so sánh hoạt lực chức năng của kháng thể theo sáng chế và kháng thể hướng đích Sema3A có bán sẵn như được mô tả trong Ví dụ 11 của sáng chế. Các tác giả sáng chế đã chứng tỏ rằng, trong cùng điều kiện, các kháng thể theo sáng chế ngăn ngừa sự tan vỡ khung tế bào do Sema3A gây ra ở tế bào võng mạc (Ví dụ 3), trong khi kháng thể có bán sẵn thì không (Ví dụ 11).

Sự nhân hóa và các biến thể trình tự axit amin

Các kháng thể kháng Sema3A biến thể khác và các mảnh kháng thể có thể được thiết kế dựa trên tập hợp các CDR được xác định dưới các trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 1 đến 6. Cần hiểu rằng trong các kháng thể kháng Sema3A biến thể và các mảnh kháng thể đã nêu, trình tự axit amin của các CDR vẫn giữ không đổi nhưng các vùng xung quanh, ví dụ các vùng FR có thể được thiết kế. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể kháng Sema3A có thể được tạo ra bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào trong ADN kháng thể kháng Sema3A, hoặc bởi sự tổng hợp peptit. Các biến thể như vậy bao gồm, ví dụ, các loại bỏ khỏi, và/hoặc chèn vào trong và/hoặc sự thế, của các gốc bên trong các trình tự axit amin của các kháng thể kháng Sema3A của các ví dụ ở đây. Sự kết hợp bất kỳ của sự loại bỏ, sự chèn, và sự thế được tạo ra để đạt được cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng này có đặc tính mong muốn. Các thay đổi axit amin có thể thay đổi các quy trình sau dịch mã của kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa hoặc biến thể, như làm thay đổi số lượng hoặc vị trí của các vị trí glycosyl hóa.

Loại khác của biến thể axit amin của kháng thể bao gồm việc thay đổi kiểu glycosyl ban đầu của kháng thể. Thuật ngữ "làm thay đổi" trong ngữ cảnh này có nghĩa là loại bỏ

một hoặc nhiều gốc cacbohydrat được phát hiện trong kháng thể, và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa mà không có mặt trước đó 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 kháng thể kháng Sema3A được mô tả ở đây. Các phân tử axit nucleic mã hóa các biến thể trình tự axit amin của kháng thể kháng Sema3A được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sự phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp các biến thể trình tự axit amin xuất hiện tự nhiên) hoặc sự tạo thành bởi gây đột biến được trung gian bởi oligonucleotit (hoặc hướng vị trí), gây đột biến PCR, và gây đột biến catxet của biến thể được tạo ra trước đó hoặc phiên bản không đột biến của kháng thể kháng Sema3A.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng Sema3A là mảnh kháng thể. Có các kỹ thuật mà đã được phát triển để sản xuất các mảnh kháng thể. Các mảnh có thể thu được bằng cách 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 mảnh này có thể được sản xuất trực tiếp ở các tế bào chủ tái tổ hợp. Ví dụ, các mảnh Fab'-SH có thể được thu hồi trực tiếp từ E. coli và được kết hợp hóa học để tạo thành các mảnh F(ab')₂ (xem, ví dụ, Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167). Theo phương pháp khác, các mảnh F(ab')₂ có thể được phân lập trực tiếp từ dịch nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Các kỹ thuật khác để sản xuất các mảnh kháng thể sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

Các kháng thể kháng Sema3A và các mảnh liên kết kháng nguyên do đó có thể bao gồm các cải biến.

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn sử dụng mảnh kháng thể kháng Sema3A, hơn là kháng thể nguyên vẹn. Có thể mong muốn cải biến mảnh kháng thể để làm tăng thời gian bán hủy huyết thanh. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách kết hợp epitop liên kết thụ thể cứu trợ vào trong mảnh kháng thể. Trong một phương pháp, vùng thích hợp của mảnh kháng thể có thể được thay đổi (ví dụ, được đột biến), hoặc epitop có thể được kết hợp vào thể peptit mà sau đó được dung hợp với mảnh kháng thể tại một đầu hoặc ở giữa, ví dụ, bởi sự tổng hợp ADN hoặc peptit. Xem, ví dụ, WO 96/32478.

Theo phương án khác, sáng chế bao gồm các cải biến cộng hóa trị của các kháng thể kháng Sema3A. Các cải biến cộng hóa trị bao gồm sự cải biến các gốc xysteinyl, gốc histidyl, các gốc lysinyl và đầu cùng amino, các gốc arginyl, các gốc tyrosyl, các nhóm cạnh carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl), các gốc glutaminyl và asparaginy, hoặc các gốc seryl, hoặc threonyl. Các loại cải biến cộng hóa trị khác bao gồm các glycosit kết cặp bằng hóa học hoặc enzym với kháng thể. Các cải biến này có thể được tạo ra bằng sự tổng hợp hóa học hoặc bằng sự phân tách bằng enzym hoặc hóa học của kháng thể, nếu có thể. 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 hướng đích của kháng thể phản ứng với chất tạo dẫn xuất hữu cơ mà có khả năng phản ứng với các chuỗi bên được chọn hoặc các gốc đầu cùng amino hoặc carboxy.

Sự loại bỏ các gốc cacbohydrat bất kỳ có mặt trên kháng thể có thể được hoàn thành bằng hóa học hoặc enzym. Sự deglycosyl hóa 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. Sự phân tách bằng enzym của các gốc cacbohydrat trên các kháng thể có thể đạt được bằng việc sử dụng đa dạng các endo- và exo-glycosidaza như được mô tả bởi Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

Loại cải biến cộng hóa trị hữu dụng khác bao gồm việc liên kết kháng thể với một trong số nhiều polyme không có protein, ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol, hoặc các polyoxyalkylen, theo cách được nêu trong một hoặc nhiều tài liệu trong số Bằng sáng chế Mỹ số 4,640,835, Bằng sáng chế Mỹ số 4,496,689, Bằng sáng chế Mỹ số 4,301,144, Bằng sáng chế Mỹ số 4,670,417, Bằng sáng chế Mỹ số 4,791,192 và Bằng sáng chế Mỹ số 4,179,337.

Liên kết epitop

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến kháng thể mà nhận biết "epitop kháng nguyên Sema3A" và "epitop Sema3A" đặc hiệu. Cụ thể, kháng thể theo sáng chế liên kết với epitop của Sema3A người với SEQ ID NO: 22.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với ít nhất một gốc axit amin bên trong các vùng axit amin 370-382 của Sema3A người như được nêu trong SEQ ID NO: 22.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với SEQ ID NO: 21.

Các trình tự SEQ ID NO: 21 và 22 được mô tả trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

Tên	Trình tự	SEQ ID NO:
Epitop Sema3A	DSTKDLPDDV ITF	21
Sema3A người	NYQNGKNNVPRLKLSYKEMLESNNVITFENGLANSSSYH TFLLEERSRL YVGAKDHIFSFDLVNIKDFQKIVWPVSY TRRDECKWAGKDILKECANFIKVLKAYNQTHLYACGT GAFHPICTYIEIGHHPEDNIFKLENSHFENGRGKSPYDPK LLTASLLIDGEL YSGTAADFMGRDFAIFRTLGHHPHIRT EQHDSRWLNDPKFISAHLISESDNPEDDKVYFFFRENAI DGEHSGKATHARIGQICKNDFGGHRSLVNKWTTFLLKAR LICSVPGPNGIDTHFDELQDVFLMNFKDPKNPVVYGVFT TSSNIFKGSAVCMYSMSDVRRVFLGPYAHRDGPNYQW VPYQGRVPYPRPGTCPSKTFGGFDSTKDLPDDVITFARS HPAMYNPVFPMNNRPIVIKTDVNYQFTQIVVDRVDAED GQYDVMFIGTDVGTVLKVVSIPKETWYDLEEVLEEMT VFREPTAISAMELSTKQQQLYIGSTAGVAQLPLHRCDIY GKACAECCLARDPYCAWDGSACSRYFPTAKRRTRRQD IRNGDPLTHCSDLHHDNHHGHSPEERIIYGVENSSTFLEC SPKSQRALVYWQFQRRNEERKEEIRVDDHIIRTDQGLLL RSLQQKDSGNYLCHAVEHGFIQTLLKVTLEVIDTEHLEE LLHKDDDDGDGSKTKEMSNSMTPSQKVWYRDFMQLINH PNLNTMDEFCEQVWKRDRKQRRQRPGHTPGNSNKWK HLQENKKGRNRRTHEFERAPRSV	22

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “epitop kháng nguyên Sema3A” và “epitop Sema3A” để chỉ phân tử (ví dụ, peptit) hoặc mảnh của phân tử có khả năng liên kết với

kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Các thuật ngữ này bao gồm, ví dụ, yếu tố quyết định kháng nguyên Sema3A được nhận biết bởi bất kỳ trong số các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể của sáng chế, mà có sự kết hợp CDR chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được chọn từ các CDR chuỗi nặng của các SEQ ID NO 1 đến 3 và các CDR chuỗi nhẹ của các SEQ ID NO: 4 đến 6.

Các epitop kháng nguyên Sema3A có thể được bao gồm trong các protein, các mảnh protein, các peptit hoặc loại tương tự. Các epitop này là các protein phổ biến nhất, các oligopeptit ngắn, các giả oligopeptit (tức là, các hợp chất hữu cơ mà bất chước các tính chất liên kết kháng thể của kháng nguyên Sema3A), hoặc các tổ hợp của chúng.

Đã phát hiện ra rằng các kháng thể hoặc các mảnh kháng nguyên theo sáng chế liên kết với epitop duy nhất của Sema3A người. Tốt hơn là, kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với ít nhất một gốc axit amin bên trong các vùng axit amin 370-382 của miền ngoại bào của Sema3A người với SEQ ID NO: 22. Epitop này được định vị gần với giao diện của Sema3A và thụ thể Plexin A. Sự liên kết của kháng thể với epitop này ức chế sự hình thành phức hợp thụ thể hoàn chỉnh truyền tín hiệu của phối tử Sema3A, thụ thể Plexin A và đồng thụ thể Nrp1, dẫn đến sự giao thoa với các tác dụng sinh học của sự truyền tín hiệu này.

Trong ngữ cảnh liên kết epitop, cụm từ “liên kết bên trong các vùng axit amin X-Y...” nghĩa là kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với ít nhất một, tốt hơn là tất cả các gốc axit amin bên trong vùng axit amin được định rõ trong trình tự.

Theo phương án khác, kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% của trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO: 22. Tốt hơn là, kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với SEQ ID NO: 22.

Sử dụng trị liệu

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng làm thuốc.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để ức chế tác dụng ức chế mạch của SemaA, và/hoặc để cải thiện sự tái tạo mạch của võng mạc.

Tốt hơn là, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh võng mạc hoặc mắt. Các tác thực vậy đã phát triển kháng thể hướng đích Sema3A, mà cực kỳ hữu ích cho việc:

- hướng lại sự tạo thành mạch đến các vùng thiếu máu cục bộ, để cải thiện sự tái tạo mạch của võng mạc;
- ngăn ngừa sự tân tạo mạch bệnh lý của vùng dịch kính; và
- ngăn ngừa sự tan vỡ của hàng rào máu võng mạc.

Như được đề cập trước đây, Sema3A là dấu hiệu đẩy mạch được tiết bởi các tế bào hạch võng mạc giảm oxy huyết. Với sự liên kết với neuropilin-1, nó kích hoạt sự truyền tín hiệu nội bào của các thụ thể plexin trên các tế bào nội mô dẫn đến sự tách các sợi actin. Điều này dẫn đến sự tan vỡ khung tế bào ở giả túc dạng sợi của các tế bào đầu mút, các tế bào nội mô được chuyên hóa mà đang hướng đến sự sinh trưởng của mạch mới và ngăn sự tái sinh mạch của các vùng thiếu máu cục bộ ở võng mạc. Các tác giả đã chứng tỏ rằng sự điều biến hoạt động đẩy mạch bằng kháng thể Sema3A trung hòa sẽ làm tăng số lượng các tế bào đầu mút và tái định hướng sự tạo mạch đến các vùng thiếu máu cục bộ, như vùng không mạch hổ thị giác được mở rộng được làm lớn bệnh lý ở người có chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường.

Do đó, theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lý võng mạc, bệnh lý võng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh lý võng mạc do đái tháo đường bao gồm bệnh lý võng mạc do đái tháo đường tăng sinh và bệnh lý võng mạc do đái tháo đường không tăng sinh, bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường, chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi, bệnh viêm võng mạc sắc tố, chứng loạn dưỡng võng mạc di truyền, bệnh thoái hóa cận thị, tắc động mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng bồ đào, phù hoàng điểm dạng

kén, màng tân tạo mạch màng mạch thứ phát sau các bệnh võng mạc bất kỳ, các bệnh lý thần kinh thị giác, bệnh tăng nhãn áp, bệnh bong võng mạc, bệnh lý võng mạc độc tố, bệnh lý võng mạc bức xạ, bệnh lý võng mạc chấn thương, bệnh lý mạch võng mạc do thuốc gây ra, sự tân tạo mạch võng mạc, bệnh lý mạch màng mạch dạng polyp, viêm mạch võng mạc, phì mao mạch võng mạc, chứng loạn dưỡng Fuch, chứng giãn mao mạch điểm vàng, hội chứng usher và bệnh Stargardt.

Kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế cụ thể là hữu dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh lý võng mạc do đái tháo đường bao gồm bệnh lý võng mạc do đái tháo đường tăng sinh và bệnh lý võng mạc do đái tháo đường không tăng sinh, bệnh lý võng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường, chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường, phù hoàng điểm do tuổi, sự tân tạo mạch võng mạc và sự tân tạo mạch màng mạch.

Theo phương án được ưu tiên, bệnh đã nêu là chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường và kháng thể theo sáng chế thúc đẩy sự tái sinh mạch bên trong võng mạc thiếu máu cục bộ (sự tái tạo mạch) và ngăn sự tân tạo mạch bệnh lý của vùng dịch kính của mắt.

Theo phương án được ưu tiên khác, bệnh đã nêu là bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường và kháng thể theo sáng chế làm giảm khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để ức chế khả năng thấm qua được cảm ứng bởi Sema3A của hàng rào máu võng mạc và/hoặc sự thoái triển mạch được cảm ứng bởi Sema3A từ các vùng thiếu máu cục bộ.

Theo khía cạnh được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế hữu dụng để điều trị bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường (DME) và/hoặc chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường (DMI). Theo phương án được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế hữu dụng để điều trị cho bệnh nhân bị DME và DMI. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế được sử

dùng để điều trị DMI như được xác định bởi sự làm lớn trên 15%, 20%, 25%, và tốt hơn là 30% vùng không mạch hô thị giác (foveal avascular zone - FAZ).

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và chất mang được dùng.

Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được dùng theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm trong nội nhãn, 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 Sema3A được dùng thích hợp bằng các truyền từng đợt, cụ thể là với các liều kháng thể giảm dần. Theo một khía cạnh, liều 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 mãn tính. Tốt hơn là, kháng thể kháng Sema3A được dùng qua tiêm nội nhãn vào trong 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.

Theo phương án được ưu tiên, khoảng liều dùng của các kháng thể theo sáng chế có thể áp dụng cho mỗi lần tiêm luôn nằm trong khoảng từ 1 mg/mắt đến 10 mg/mắt, tốt hơn là giữa 1,5 mg/mắt và 5 mg/mắt, tốt hơn nữa là giữa 2 mg/mắt và 3 mg/mắt và thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 2,5 mg/mắt.

Thuật ngữ “sự ức chế” 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 khoa 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 bệnh vồng mạc hoặc mắt được giải quyết bởi kháng thể theo sáng chế.

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 có hiệu quả của các chất khác như vậy tùy thuộc vào lượng kháng thể kháng Sema3A có mặt trong chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận trên đây. 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 trên.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên để sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh không phải về mắt, như bệnh viêm khớp tự miễn, đau do bệnh lý thần kinh, chứng loãng xương và bệnh ung thư.

Phương pháp điều trị

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng bao gồm phương pháp bất kỳ để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh mắt hoặc thị giác ở bệnh nhân cần điều trị, phương pháp này bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế.

Tốt hơn là, sáng chế đề cập đến phương pháp sử dụng kháng thể theo sáng chế để ức chế tác dụng đầy mạch của SemaA3. Tốt hơn nữa là, sáng chế đề cập đến phương pháp đã nêu để cải thiện sự tái tạo mạch của vồng mạc.

Tốt hơn là, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh mắt hoặc vồng mạc bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân cần điều trị lượng có hiệu quả được lý của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn là, bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lý vồng mạc, bệnh lý vồng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh lý vồng mạc do đái tháo đường bao gồm bệnh lý vồng mạc do đái tháo đường tăng sinh và bệnh lý vồng mạc do đái tháo đường không tăng sinh, bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường, chứng thiếu máu cục bộ hoàng

điểm do đái tháo đường, bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi, bệnh viêm võng mạc sắc tố, chứng loạn dưỡng võng mạc di truyền, bệnh thoái hóa cận thị, tắc động mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng bồ đào, phù hoàng điểm dạng kén, màng tân tạo mạch màng mạch thứ phát sau các bệnh võng mạc bất kỳ, các bệnh lý thần kinh thị giác, bệnh tăng nhãn áp, bệnh bong võng mạc, bệnh lý võng mạc độc tố, bệnh lý võng mạc bức xạ, bệnh lý võng mạc chấn thương, bệnh lý mạch võng mạc do thuốc gây ra, sự tân tạo mạch võng mạc, bệnh lý mạch màng mạch dạng polyp, viêm mạch võng mạc, phì mao mạch võng mạc, chứng loạn dưỡng Fuch, chứng giãn mao mạch điểm vàng, hội chứng usher, và bệnh Stargardt. Tốt hơn nữa là, bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lý võng mạc do đái tháo đường bao gồm bệnh lý võng mạc do đái tháo đường tăng sinh và bệnh lý võng mạc do đái tháo đường không tăng sinh, bệnh lý võng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường, chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường, phù hoàng điểm do tuổi, sự tân tạo mạch võng mạc, bệnh tăng nhãn áp và sự tân tạo mạch màng mạch. Theo phương án được ưu tiên nữa, bệnh này là bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường và/hoặc chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường.

Tất cả các dấu hiệu kỹ thuật được bộc lộ ở đây có thể áp dụng cho phương pháp điều trị đã nêu.

Dược phẩm và cách dùng

Chế phẩm chứa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được dùng cho đối tượng bị hoặc có nguy cơ bị bệnh mắt hoặc võng mạc. Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó để sản xuất thuốc để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh mắt hoặc võng mạc hoặc bệnh Sema3A. Tất cả các dấu hiệu kỹ thuật được bộc lộ ở đây có thể áp dụng được cho việc sử dụng đã nêu của kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong sản xuất thuốc. Thuật ngữ "đối tượng" như được sử dụng ở đây nghĩa là động vật có vú bất kỳ mà kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng cho, bao gồm, ví dụ, người hoặc động vật có vú không phải là 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 Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chế phẩm khác.

Các hệ thống phân phối khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để cung cấp kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Các phương pháp để đưa vào bao gồm nhưng không giới hạn ở, trong nội nhãn, 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 Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng, ví dụ bằng cách truyền, tiêm nhanh (bolus) hoặc tiêm, và có thể được sử dụng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc cục bộ. Theo các phương án được ưu tiên, việc sử dụng là bằng cách tiêm trong nội nhãn. 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 Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng ở dạng dược phẩm bao gồm lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và một hoặc nhiều thành phần tương thích về mặt dược lý.

Theo các phương án thông thường, dược phẩm được bào chế theo các quy trình thông thường ở dạng dược phẩm thích hợp để dùng theo đường tĩnh mạch hoặc dưới da cho người. Thông thường, chế phẩm để dùng theo đường tĩnh mạch là dung dịch trong đệm nước đẳng trương vô trùng. 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 bít kín khí 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 kit dược bao gồm (a) đồ chứa có chứa kháng thể kháng Sema3A hoặc đoạn liên 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 Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó 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 Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là có hiệu quả trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh mắt hoặc võng mạc có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng chuẩn. Ngoài ra, các thử nghiệm *in vitro* có thể tùy ý được sử dụng để giúp xác định các khoảng liều dùng 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 mô hình động vật.

Ví dụ, độc tính và hiệu quả điều trị của kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được xác định trong dịch nuôi cấy tế bào hoặc các động vật thí nghiệm bởi quy trình được chuẩn để xác định ED₅₀ (liều có hiệu quả điều trị ở 50% của quần thể). Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà thể hiện chỉ số trị liệu lớn 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 dùng kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó thông thường nằm trong khoảng các nồng độ tuần hoàn mà bao gồm ED₅₀ với ít độc hoặc không độc. 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 Sema3A bất kỳ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được sử dụng trong phương pháp này, liều có hiệu quả điều trị có thể được ước tính ban đầu từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liều có thể được bào chế trong các mô hình động

vật để đạt được khoảng nồng độ trong huyết tương tuần hoàn bao gồm IC_{50} (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 sắc ký lỏng tính năng cao, ELISA và dạng tương tự.

Đối với việc tiêm nội nhãn kháng thể kháng Sema3A, thông thường ưu tiên các khoảng cách thời gian dài hơn giữa các lần điều trị. Do ái lực liên kết và hoạt lực của được cải thiện, các kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế có thể được dùng ở các khoảng cách thời gian dài hơn.

Theo một phương án, kháng thể kháng Sema3A được dùng mỗi 6 tuần, tốt hơn là mỗi 7 tuần, tốt hơn là mỗi 8 tuần, tốt hơn là mỗi 9 tuần, tốt hơn là mỗi 10 tuần, tốt hơn là mỗi 11 tuần, và tốt hơn nữa là mỗi 12 tuần. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế được dùng 3 tháng một lần.

Vì thể tích mà có thể được dùng cho mắt bị hạn chế nghiêm ngặt, điều quan trọng là kháng thể kháng Sema3A có thể được bào chế ở nồng độ cao. Hơn thế nữa, hoạt lực của kháng thể kháng Sema3A có tầm quan trọng rất lớn vì kháng thể tiềm năng có thể phát huy tác dụng của nó ở các mức liều thấp hơn và do đó kéo dài hoạt tính và cả các khoảng cách thời gian giữa các lần điều trị.

Kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế ở các liều rất cao mà bao gồm, nhưng không bị 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. Tốt hơn là, các kháng thể theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng chế phẩm lỏng với khoảng 50 mg/ml.

Liều thông thường có thể được sử dụng cho bệnh nhân là khoảng 2,5 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 Sema3A được phối chế với đệm histidin 10 mM, sucroza 240 mM, polysorbat 20 0,02% khối lượng/thể tích tại độ pH 5,5 với nồng độ protein cuối cùng là 60 mg/mL.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó còn có thể chứa chất trị liệu, được liên hợp hoặc không được liên kết với chất liên kết.

Với khía cạnh phác đồ điều trị cho việc sử dụng kết hợp, theo phương án cụ thể, kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được sử dụng đồng thời với chất trị liệu. Theo phương án cụ thể khác, chất trị liệu được dùng trước hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, ít nhất một giờ và lên 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 Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

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

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế bao hàm các polynucleotit được phân lập mà bao gồm trình tự mã hóa kháng thể kháng Sema3A, vector, và tế bào chủ chứa polynucleotit, và các kỹ thuật tái tổ hợp để sản xuất kháng thể. Các polynucleotit được phân lập có thể mã hóa dạng mong muốn bất kỳ của kháng thể kháng Sema3A bao gồm, ví dụ, các kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ, các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, các kháng thể dime, các kháng thể mạch thẳng, các phân tử kháng thể đơn chuỗi, và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể.

(Các) polynucleotit mà bao gồm trình tự mã hóa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh hoặc chuỗi của nó có thể được dung hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa hoặc kiểm soát, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và có thể được chứa trong các vector biểu hiện hoặc các tế bào chủ thích hợp như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Mỗi phân tử polynucleotit mã hóa các miền biến đổi 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 để sản xuất kháng thể chuỗi đơn.

Để sản xuất tái tổ hợp, polynucleotit mã hóa kháng thể được chèn vào vector sao chép được để tách dòng (khuếch đại ADN) hoặc để 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 bị giới hạn ở, một hoặc nhiều thành phần sau: trình tự tín hiệu, điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen chỉ thị, yếu tố tăng cường, trình tự khởi động, và trình tự kết thúc phiên mã.

Các kháng thể kháng Sema3A cũng có thể được sản xuất ở dạng các 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 tách cụ thể tại đầu cùng amino của protein protein hoặc polypeptit thành thực. Trình tự tín hiệu khác loại được chọn thường là trình tự được nhận biết và được xử lý (ví dụ, được phân cắt bởi peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Đối với tế bào chủ nhân sơ mà không nhận biết và xử lý trình tự tín hiệu của kháng thể kháng Sema3A, trình tự tín hiệu này có thể được thế bởi trình tự tín hiệu của sinh vật nhân sơ. 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 α 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 nối trong khung đọc với ADN mã hóa kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa.

Vector biểu hiện và tách dòng bao gồm 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 2- $\square\square$ của plasmid thích hợp đối với nấm men, và nhiều điểm khởi đầu của virus khác nhau (SV40, polyoma,

adenovirut, 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 SV40 thường có thể được dùng vì nó chứa trình tự khởi động sớm).

Các vector biểu hiện và tách dòng có thể chứa một gen mã hóa chỉ thị chọn lọc để tạo điều kiện cho việc xác định sự biểu hiện. Các gen chỉ thị 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-alanin racemaza 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 chỉ thị chọn lọc được thông thường cho các tế bào động vật có vú là các chỉ thị mã cho phép xác định các thành phần tế bào mà hấp thụ axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa, như DHFR (dihydrofolat reductaza), tymidin kinaza, metallothionein-I và -II (như các gen metallothionein của động vật linh trưởng), adenosin deaminaza, ornithin decarboxylaza, và loại 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 methotrexat (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 (CHO) thiếu hoạt tính của DHFR (ví dụ, DG44).

Theo cách khác, tế bào chủ (cụ thể là vật chủ kiểu đại mà chứa DHFR nội sinh) được biến nạp hoặc cùng biến nạp với các trình tự ADN mã hóa kháng thể kháng Sema3A, protein DHFR kiểu đại, và chỉ thị chọn lọc khác như aminoglycosit 3'-phosphotransferaza (APH) có thể được chọn bằng cách nuôi tế bào trong môi trường chứa tác nhân chọn lọc đối với chỉ thị chọn lọc được như kháng sinh aminoglycosidic, ví dụ, kanamycin, neomycin, hoặc G418. Xem, ví dụ, Bằng sáng chế 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 nấm men YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) có thể được sử dụng làm chỉ thị chọn lọc. Ví dụ, gen TRP1 tạo ra chỉ thị 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 μ m có thể được sử dụng để biến nạp nấm men *Kluyveromyces*. Theo cách khác, hệ biểu hiện cho sự sản xuất quy mô lớn của chymosin tái tổ hợp của bê 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 tái tổ hợp trưởng thành của người nhờ các chủng công nghiệp *Kluyveromyces* cũng đã được bộc lộ (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

Vector biểu hiện và tách dòng luôn chứa trình tự khởi động mà được nhận biết bởi sinh vật chủ và được liên kết hoạt động với phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Sema3A hoặc mạch polypeptit của chúng. Các trình tự khởi động thích hợp để sử dụng với tế bào chủ nhân sơ bao gồm trình tự khởi động *phoA*, hệ thống trình tự khởi động β -lactamaza và lactoza, trình tự khởi động phosphataza kiềm, hệ thống trình tự khởi động tryptophan (*trp*), và các trình tự khởi động lai như trình tự khởi động tac. Các trình tự khởi động vi khuẩn đã biết khác cũng là thích hợp. Các trình tự khởi động để sử dụng trong hệ vi khuẩn cũng sẽ chứa trình tự Shine-Dalgarno (S.D.) được liên kết hoạt động với ADN mã hóa kháng thể kháng Sema3A được nhân hóa.

Nhiều trình tự khởi động của sinh vật nhân chuẩn là đã biết. Hầu như tất cả các gen của tế bào nhân chuẩn 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. Tại đầu 3' của hầu hết các gen của sinh vật nhân chuẩn 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 chèn vào vectơ biểu hiện của tế bào nhân chuẩn.

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

Các trình tự khởi động 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 vectơ và trình tự khởi động 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 trình tự khởi động nấm men.

Sự phiên mã kháng thể kháng Sema3A từ các vectơ ở tế bào chủ động vật có vú được kiểm soát, ví dụ, bởi các trình tự khởi động thu được từ các bộ gen của 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 trình tự khởi động động vật có vú khác loại, ví dụ, trình tự khởi động actin hoặc trình tự khởi động globulin miễn dịch, hoặc từ các trình tự khởi động sốc nhiệt, miễn là các trình tự khởi động này tương hợp với hệ thống tế bào chủ.

Các trình tự khởi động sớm và muộn của virus SV40 thu được một cách thuận tiện dưới dạng mảnh giới hạn SV40 mà cũng chứa điểm khởi đầu sao chép của virus SV40. Trình tự khởi động 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 vectơ được bộc lộ trong bằng sáng chế Mỹ số 4,419,446. Cải biến của hệ này được mô tả trong bằng sáng chế 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 trình tự khởi động thymidin kinaza từ virus herpes đơn hình. Theo cách khác, đoạn lặp đầu cùng dài của virus sarcoma rous có thể được sử dụng làm trình tự khởi động.

Yếu tố hữu dụng khác mà có thể được sử dụng trong vector biểu hiện tái tổ hợp là trình tự tăng cường, mà được sử dụng để làm tăng sự phiên mã của ADN mã hóa kháng thể kháng Sema3A bởi các sinh vật nhân chuẩn bậc cao hơn. Nhiều trình tự tăng cường hiện đã biết từ gen của động vật có vú (ví dụ, globin, elastaza, albumin, α -fetoprotein, và insulin). Tuy nhiên, thông thường sẽ sử dụng trình tự tăng cường từ virus ở tế bào nhân chuẩn. 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 trình tự khởi động sớm của cytomegalovirus, trình tự tăng cường của polyoma ở phía sau của điểm khởi đầu sao chép, và trình tự tăng cường của adenovirus. Tương tự, xem tài liệu Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 mô tả về các yếu tố tăng cường để hoạt hóa các trình tự khởi động của tế bào nhân chuẩn. Trình tự tăng cường có thể được ghép nối vào trong vector tại vị trí 5' hoặc 3' với trình tự mã hóa kháng thể kháng Sema3A, nhưng tốt hơn là được định vị tại vị trí 5' từ trình tự tăng cường.

Các vector biểu hiện được sử dụng trong tế bào chủ nhân chuẩn (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 chuẩn hoặc virus. Các vùng này chứa các đoạn nucleotit được phiên mã ở dạng các mảnh được polyadenyl hóa ở phần không được dịch mã của mRNA mã hóa kháng thể kháng Sema3A. 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 số phương án, các kháng thể kháng Sema3A có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ thống CHEF. (Xem, ví dụ, Bằng sáng chế Mỹ số 5,888,809; phần bộc lộ của nó được kết hợp toàn bộ ở 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 sơ, tế bào nấm men, hoặc tế bào nhân chuẩn bậc cao hơn được mô tả trên

đây. Các sinh vật nhân sơ thích hợp cho mục đích này bao gồm vi khuẩn thực, 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 marcescens*, 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 nhằm minh họa chứ không hạn chế.

Ngoài các sinh vật nhân sơ, các vi khuẩn nhân chuẩn như nấm sợi hoặc nấm men là các sinh vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp đối với các vectơ mã hóa kháng thể kháng Sema3A. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc thường được gọi là nấm men bánh mì, được sử dụng phổ biến nhất trong số các vi sinh vật chủ nhân chuẩn bậc thấp hơn. Tuy nhiên, nhiều chi, loài, và chủng khác là có sẵn và hữu dụng ở đây, như các sinh vật chủ *Schizosaccharomyces pombe*; *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. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastors* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis*; và nấm sợi như, ví dụ, sinh vật chủ *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, và *Aspergillus* như *A. nidulans* và *A. niger*.

Các tế bào chủ thích hợp cho sự biểu hiện kháng thể kháng Sema3A được glycosyl hóa có nguồn gốc từ các sinh vật đa bào. Ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng, bao gồm, ví dụ, nhiều chủng và các biến thể baculovirus và các tế bào chủ côn trùng chấp nhận được tương ứng từ các sinh 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 cho sự chuyển nạp là có sẵn công khai, 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, cụ thể là cho sự chuyển nạp của các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

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

Kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế cũng có thể được kết hợp trong vector virus, tức là, polynucleotit mã hóa kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được đưa vào trong vector virus và sau đó được biểu hiện trong cơ thể của bệnh nhân sau khi bị nhiễm virus.

Theo khía cạnh khác, sự biểu hiện của kháng thể kháng Sema3A được thực hiện ở 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 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 carcinom 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 vector biểu hiện và tách dòng được mô tả trên đây đối với việc sản xuất kháng thể kháng Sema3A và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến nếu thích hợp để cảm ứng các trình tự khởi động, các thể biến nạp chọn lọc, 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 Sema3A được mô tả ở đây có thể được nuôi cấy ở 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, Bằng sáng chế Mỹ số 4,767,704, Bằng sáng chế Mỹ số 4,657,866, Bằng sáng chế Mỹ số 4,927,762, Bằng sáng chế Mỹ số 4,560,655, Bằng sáng chế 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, bột nhào tế bào được làm tan giá với sự có mặt của natri axetat (độ pH=3,5), EDTA, và phenylmethylsulfonyl florua (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 thường đầu tiên

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 thường 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 gamma1, gamma2, hoặc gamma4 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 gamma3 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(styrenediviny)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 C_{H3} , 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 mà lai trong các điều kiện nghiêm ngặt thấp, trung bình, và cao, như được xác định ở đây, với toàn bộ hoặc một phần (ví dụ, phân mã hóa vùng biến đổi) của trình tự nucleotit được thể hiện bởi (các) trình tự polynucleotit mà

mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể kháng Sema3A. Phần lai hóa của axit nucleic lai thường có độ dài ít nhất là 15 (ví dụ, 20, 25, 30 hoặc 50) nucleotit. Phần lai hóa của axit nucleic lai hóa tương đồng ít nhất 80%, e.g., ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 98%, với trình tự của một phần hoặc toàn bộ axit nucleic mã hóa polypeptit kháng Sema3A (ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ), hoặc phần bổ sung của nó. Có thể sử dụng các axit nucleic lai hóa 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 phương án, sáng chế đề cập đến polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

Cần hiểu rằng ở các kháng thể và các mảnh kháng thể kháng Sema3A đã nêu, trình tự axit nucleic mã hóa các CDR vẫn giữ không đổi (không đổi với khía cạnh axit amin chúng mã hóa, các đường lượng của trình tự ADN do sự suy biến của các codon là có thể có) nhưng các vùng xung quanh, ví dụ các vùng FR có thể được thiết kế.

Vật phẩm sản xuất

Theo một khía cạnh khác, vật phẩm sản xuất 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 vật chứa và nhãn. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi lanh, và ống nghiệm. Các vật chứa có thể được tạo ra từ nhiều vật liệu như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa giữ chế phẩm hữu hiệu để điều trị tình trạng bệnh và có thể có lỗ nạp vô trùng. Ví dụ, vật 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. Chất hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Nhãn ở trên hoặc được kết hợp với vật 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 vật 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

Ví dụ 1: Sự điều hòa tăng của Sema3A ở dịch kính của bệnh nhân DME và PDR

Sự biểu hiện của Sema3A ở võng mạc của các mẫu từ người cho có tiền sử bệnh lý võng mạc do đái tháo đường được điều tra nghiên cứu bằng mô hóa học miễn dịch. Quy trình nhuộm miễn dịch là như sau:

1. Làm tan các lam kính và cho phép các mẫu khô trong không khí trong 30 phút tại nhiệt độ phòng (RT);
2. Kéo hộp bút pap và cho phép để khô;
3. Thu hồi kháng nguyên ở 1% SDS trong 5 phút tại nhiệt độ phòng;
4. Rửa các lam kính 3 lần trong PBS trong 5 phút;
5. Phong bế các phần trong dung dịch 1%BSA/0,3% Triton X100/PBS (dung dịch phong bế) trong 30 phút tại nhiệt độ phòng;
6. Pha loãng kháng thể thử thứ nhất kháng Sema3a (abcam, ab23393) 1:200 trong dung dịch phong bế. Ủ các phần trên lam kính tại nhiệt độ phòng qua đêm;
7. Rửa các lam kính 3 lần trong PBS trong 5 phút;
8. Ủ kháng thể thử hai với kháng thể lừa kháng thể được đánh dấu bằng Alexa fluor546 (invitrogen, A10040) tại độ pha loãng 1:400 trong dung dịch DAPI/0,3% Triton X100/ PBS. Ủ các phần trên lam kính trong 3 giờ tại nhiệt độ phòng;
9. Rửa các lam kính 3-5 lần trong PBS trong 5 phút;
10. Phủ bảo vệ các phần bằng Aquamount và cho phép khô trong không khí;

11. Chụp ảnh các phần và đánh giá cường độ tại độ phóng đại 40x.

Các tập hợp gồm 3 phần trên mỗi người cho được nhuộm miễn dịch đối với Sema3A. Việc đánh dấu Sema3A được đánh giá độc lập ở mỗi vùng này bởi người quan sát được đào tạo trước cho nhiệm vụ cụ thể này bằng cách sử dụng sơ đồ đánh giá 5 điểm (0=không phát hiện, 1=cường độ thấp, ít điểm, 2=cường độ trung bình, vài điểm, 3=cường độ sáng, nhuộm lan rộng và 4=cường độ rất sáng, phát hiện dư thừa). Những người quan sát không biết về tình trạng sức khỏe của đối tượng cho mắt. Bên trong võng mạc, Sema3A được liên kết với thành mạch của mạch máu võng mạc. Sự biểu hiện của Sema3A ở mạch máu võng mạc và nhu mô võng mạc tăng ở bệnh nhân bị bệnh phù hoàng điểm do đái tháo đường so với bệnh nhân đái tháo đường mà không có bệnh lý về mắt (Fig. 1).

Ví dụ 2: Hiệu quả ở thử nghiệm khả năng thấm tế bào

Khả năng thấm qua tế bào được đo bởi sự thấm của FITC-dextran trong các đơn lớp của tế bào nội mô vi mạch võng mạc người (HRMEC).

Tóm tắt, khả năng thấm nội mô *in vitro* được đo bằng cách sử dụng kit Millipore ('Thử nghiệm khả năng thấm mạch *in vitro*' Lô số ECM642) và các tế bào nội mô vi mạch võng mạc người (HRMEC). Kit thử nghiệm cung cấp đĩa tiếp nhận 96 giếng với các thể chèn nuôi cấy tế bào. Các thể chèn này chứa các lỗ 1 μ m và được phủ bằng collagen đuôi chuột công loại I. HRMEC được cấy giống tại mật độ là 25000 tế bào/giếng lên trên các thể chèn và các tế bào được cho phép sinh trưởng thành lớp đơn trong 3 ngày. Các tế bào được xử lý bằng VEGF-A tái tổ hợp, Sema3A cũng như kháng thể theo sáng chế qua đêm. Dung dịch FITC-Dextran khối lượng phân tử cao được cung cấp với kit được bổ sung vào thể chèn, cho phép các phân tử huỳnh quang đi qua lớp đơn tế bào nội mô. Khả năng thấm *in vitro* được xác định bằng cách đo sự phát huỳnh quang của dung dịch giếng của đĩa tiếp nhận tại 485nm / 535nm (sự kích thích và sự hấp thụ).

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm kháng thể lấy ví dụ theo sáng chế: dòng vô tính I. Kháng thể này chứa chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15.

Kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế đã ức chế hoàn toàn khả năng thấm được cảm ứng bởi Sema3A, nhưng không ức chế khả năng thấm được cảm ứng bởi VEGF-A (Fig. 2). Quan trọng là, hiệu quả của khả năng thấm của Sema3A là độc lập với VEGF-A. Việc sử dụng kháng thể đối chứng hướng đến chống lại TNP khẳng định rằng hiệu quả này là do sự hướng đích đặc hiệu của kháng thể theo sáng chế đến Sema3A.

Ví dụ 3: Phép đo sự tan vỡ khung tế bào ở thử nghiệm tế bào

Hoạt tính tế bào của kháng thể làm ví dụ theo sáng chế (dòng vô tính I) được đánh giá bằng cách đo sự tan vỡ khung tế bào ở các tế bào nội mô vi mạch võng mạc người (HRMEC) sử dụng hệ thống XCELLigence (Thiết bị phân tích tế bào thời gian thực được thương mại hóa bởi ACEA Biosciences). Hệ thống này đo sự gắn tế bào và sự hợp dòng tế bào qua trở kháng tế bào. HRMEC biểu hiện nội mô Neuropilin-1 (Nrp1) và các plexin, mà là các bộ phận của thụ thể hoàn chỉnh Semaphorin nhóm 3. Bằng việc liên kết với phức hợp thụ thể này, các semaphorin cảm ứng sự tan vỡ của các sợi F-actin ở lớp nội mô. Ở thử nghiệm chức năng này, việc bổ sung protein Sema3A tái tổ hợp vào lớp hợp dòng của các tế bào nội mô vi mạch võng mạc làm hạ tế bào do sự tan vỡ khung tế bào và sự co rút sau đó của tế bào, được đo dưới dạng sự giảm trở kháng tế bào.

Tóm tắt, các đĩa E View được phủ bằng yếu tố gắn. Các tế bào được cấy giống với mật độ 20000 tế bào/ giếng và sau đó được phép sinh trưởng thành lớp đơn trong các điều kiện sinh trưởng bình thường của chúng bên trong thiết bị XCELLigence qua đêm.

Các tổ hợp Sema3A (hoặc các semaphorin nhóm 3 khác) cùng với và không cùng với kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế được bổ sung trong sự có mặt của 3mM CaCl₂. Chỉ số tế bào được chuẩn hóa với điểm thời gian trước khi bổ sung các chất. Các phép tính được thực hiện 5 giờ sau khi kích thích.

Sự tan vỡ khung tế bào được cảm ứng bởi Sema3A có thể được ngăn chặn hoàn toàn bởi kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế. Sự tan vỡ khung tế bào được cảm ứng bởi các semaphorin được thử nghiệm khác (B, C, E và F) không thể được ngăn chặn bởi kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế, khẳng định tính đặc hiệu của kháng thể theo sáng chế đối với Sema3A (Fig. 3).

Ví dụ 4: Ái lực và hoạt lực tế bào

A) Ái lực

Đệm chạy cho thí nghiệm này và tất cả các dung dịch pha loãng (trừ trường hợp đã nêu) được thực hiện trong PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20 [100 μ l của 100% Tween20 được bổ sung vào 2L PBS-T-EDTA để tạo ra nồng độ Tween 20 cuối cùng là 0,01%]. Chip cảm biến GLM được chuẩn hóa và được tạo điều kiện sơ bộ như theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Chip cảm biến được hoạt hóa với hỗn hợp cân bằng của EDC/s-NHS theo hướng nằm ngang trong 300 giây tại tốc độ dòng là 30 μ l/phút và được cố định bằng chất gắn kết Fab người (10 μ g/ml trong 10 mM axetat pH 5,0) theo hướng nằm ngang trong 300 giây tại tốc độ dòng là 30 μ l/phút dẫn đến có ~ 6739-7414 RU của chất gắn kết Fab người trên bề mặt. Chip cảm biến được khử hoạt hóa bằng 1M etanolamin HCl theo hướng nằm ngang trong 300 giây tại tốc độ dòng là 30 μ l/phút. Chip cảm biến được ổn định hóa bằng 10 mM glyxin pH 2,1 trong 18 giây, tại tốc độ dòng là 100 μ l/phút 1 lần theo hướng nằm ngang và 1 lần theo hướng dọc.

Các tác giả sáng chế đã thử nghiệm kháng thể lấy làm ví dụ theo sáng chế (dòng vô tính I). Kháng thể này (0,5 μ g/ml) được bắt giữ trên bề mặt chất gắn kết Fab người theo chiều dọc trong 300 giây tại tốc độ dòng là 25 μ l/phút dẫn đến mức bắt giữ ~180 RU. Đường cơ sở được ổn định hóa bằng cách phun PBS-T-EDTA trong 60 giây tại tốc độ dòng là 40 μ l/phút theo hướng nằm ngang. Chất phân tích được phun theo hướng nằm ngang qua kháng thể được bắt giữ trong 600 giây tại tốc độ dòng là 40 μ l/phút và phân ly trong 7200 giây. Các nồng độ của các chất phân tích là 0 nM, 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 5 nM, và 10 nM. Bề mặt được tái tạo bằng cách phun 10 mM glyxin, pH 2,1 trong 18 giây tại tốc độ dòng là 100 μ l/phút một lần theo chiều ngang và một lần theo chiều dọc. PBS-T-EDTA được phun trong 60 giây tại tốc độ dòng là 25 μ l/phút một lần theo chiều dọc.

Điểm giao cắt (các tương tác với bề mặt bộ cảm biến) và mẫu trắng (PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20 hoặc 0 nM chất phân tích) được trừ khỏi số liệu thô. Các đồ thị đáp ứng sau đó được làm khít toàn bộ với sự liên kết 1:1 Langmuir để cung cấp các giá trị tốc độ liên kết (k_a), tốc độ phân ly (k_d), và ái lực (K_D).

B) Hoạt lực tế bào

Để xác định hoạt lực chức năng ở thử nghiệm sự tan vỡ khung tế bào, các đường cong đáp ứng nồng độ Sema3A được kết hợp với các nồng độ tăng dần của kháng thể ở dạng các thí nghiệm dịch chuyển IC50. Đồ thị Gaddum Schild được thực hiện để tính giá trị pA2 (thuật toán âm của nồng độ kháng thể cần để dịch chuyển đường cong đáp ứng nồng độ Sema3A bằng hệ số 2). Hoạt lực tính theo pM được tính từ giá trị pA2 là $=\text{POTENCY}(10; -X)$.

Các kết quả được tổng hợp trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6:

Phân tử	Ái lực (K_d) [pM]					Sự đối kháng chức năng ở thử nghiệm sự tan vỡ khung tế bào (A_2) [pM]
	<i>Người</i>	<i>Cyno</i>	<i>Chuột nhắt</i>	<i>Chuột cống</i>	<i>Thỏ</i>	<i>Người</i>
Kháng thể theo sáng chế (dòng vô tính I)	29	28	27	27	42	69

Ví dụ 5: Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng thể theo sáng chế

Các tác giả sáng chế đã đánh giá khả năng sinh miễn dịch được dự đoán của kháng thể lấy làm ví dụ theo sáng chế, dòng vô tính I. Kháng thể này bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 15, tương ứng.

Cho mục đích này, họ đã sử dụng công cụ *in silico* để dự đoán các epitop tế bào T (EpiMatrix được phát triển bởi EpiVax).

Bằng việc sàng lọc các trình tự của nhiều thể phân lập kháng thể người, EpiVax đã xác định một số phối tử HLA được bảo toàn cao mà được tin là có hoạt lực điều hòa. Bằng chứng thực nghiệm đã gợi ý nhiều peptit trong số các peptit này, trên thực tế, có tính sinh dung nạp miễn dịch hoạt tính ở hầu hết các đối tượng. Các epitop tế bào T hỗn tạp, điều hòa và được bảo toàn cao hiện này được biết đến là các Tregitope (De Groot et al. Blood.

2008 Oct 15;112(8):3303-11). Hoạt lực sinh miễn dịch của các neo-epitop được chứa trong các kháng thể được nhân hóa có thể được kiểm soát một cách hiệu quả trong sự có mặt của số lượng đáng kể các Tregitope.

Đối với mục đích phân tích khả năng sinh miễn dịch của kháng thể, EpiVax đã phát triển Điểm EpiMatrix được điều chỉnh bởi Tregitope và sự dự đoán tương ứng của sự đáp ứng kháng thể kháng trị liệu. Để tính Điểm Epimatrix được điều chỉnh bởi Tregitope, các điểm của các Tregitope được trừ khỏi Điểm số protein EpiMatrix. Các điểm được điều chỉnh bởi Tregitope đã được chứng tỏ là tương quan tốt với đáp ứng miễn dịch lâm sàng được quan sát cho tập hợp gồm 23 kháng thể thương mại (De Groot et al. Clin Immunol. 2009 May;131(2):189-201).

Các kết quả trên thang điểm EpiMatrix được tổng hợp trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7:

Phân tử	Chuỗi nặng (% của người)		Epivax (VH)	Epivax (VK)	Chuỗi nhẹ (% của người)	
	<i>FR</i>	<i>V-gen</i>			<i>FR</i>	<i>V-gen</i>
Kháng thể theo sáng chế (dòng vô tính I)	97	91	-27,27	-21,79	98	88

Các trình tự của kháng thể theo sáng chế, điểm số trên đầu thấp của thang điểm EpiMatrix, chỉ ra rằng kháng thể theo sáng chế có hoạt lực bị hạn chế nhiều đối với khả năng sinh miễn dịch. Thang điểm EpiMatrix đã nêu là đã biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được tìm thấy *không kể những thứ khác* trên Fig. 2 của công bố Mufarрге et al. Clin Immunol. 2017 Mar;176:31-41.

Ví dụ 6: Tác động đến mật độ tế bào đầu mút và vùng không mạch in vivo (Mô hình bệnh lý vớng mạch được cảm ứng bởi oxy OIR)

Hiệu quả của kháng thể lấy làm ví dụ theo sáng chế (dòng vô tính I) đối với sự tái tạo mạch của vùng không mạch thiếu máu cục bộ được điều tra nghiên cứu ở mô hình chuột nhắt của bệnh lý vồng mạc được cảm ứng bởi oxy (OIR). Các lứa đẻ của chuột nhắt C57Bl/6J được tiếp xúc với khí quyển 75% oxy ngày 7 sau sinh đến ngày 12 sau sinh. Điều này dẫn đến sự hồi phục các mạch máu ở vồng mạc trung tâm và sự tạo thành vùng không mạch. Sau khi trở lại các tình trạng mô có lượng oxy thông thường, vùng này trở nên thiếu máu cục bộ. Các con con tiếp nhận mũi tiêm nội nhãn đơn gồm 10 μ g kháng thể trong 0,5 μ l dung dịch ở mỗi mắt trong điều kiện gây tê bằng isofluran vào ngày 12 sau sinh. Vài ngày 17 sau sinh, các con vật được cho chết và mắt được khoét nhân. Các mắt được cố định trong formalin và lượng phẳng vồng mạc được tạo ra trong đó các mạch máu vồng mạc được nhuộm bằng isolectin B4. Số lượng các tế bào đầu mút (các tế bào nội mô được chuyên biệt hóa bắt đầu tạo thành các mạch mới) được đếm tại trán không mạch dọc toàn bộ vồng mạc (đường bao ở giữa vùng ngoại biên được tạo mạch và cùng trung tâm không mạch của vồng mạc).

Các tế bào đầu mút này được xác định bằng hình thái riêng của chúng thể hiện sự kéo dài giả túc dạng sợi. Để phân tích, số lượng các tế bào đầu mút được chuẩn hóa với chiều dài của trán không mạch. Kích thước của vùng không mạch được xác định bằng cách sử dụng kính hiển vi đồng tiêu và phần mềm phân tích hình ảnh.

Kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế làm tăng mật độ tế bào đầu mút ở mô hình OIR chuột nhắt (Fig. 4). Hơn thế nữa, nó thể hiện sự giảm vùng không mạch. Có mối tương quan nghịch giữa mật độ tế bào đầu mút và kích thước của vùng không mạch, chỉ ra sự phụ thuộc về cơ chế của hai tham số này. Việc sử dụng kháng thể đối chứng hướng đến chống lại TNP khẳng định rằng hiệu quả này là do sự hướng đích đặc hiệu của kháng thể theo sáng chế đến Sema3A.

Tổng quát là, kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế làm giảm kích thước vùng không mạch thiếu máu cục bộ ở mô hình động vật bị bệnh lý vồng mạc được cảm ứng bởi oxy, chỉ ra hiệu quả có lợi trong điều trị chứng thiếu máu cục bộ hoàng điểm do đái tháo đường.

Ví dụ 7: So sánh kháng thể kháng Sema3A và Avastin $t_{1/2}$ ở mắt thỏ

Các kết quả được tổng hợp trong bảng 8 dưới đây.

Bảng 8:

t _{1/2} được tính (ngày)			
	<i>Kháng thể theo sáng chế (dòng vô tính I)</i>		<i>Avastin</i>
	<i>0-14 ngày</i>	<i>tất cả</i>	
Dịch kính	5,1	3,9	4,4
Võng mạc	6,1	4,1	4,8
Thủy dịch	4,7	3,3	4,5

Thời gian bán hủy được tính là 3,9, 4,1 và 3,3 ngày ở dịch kính, võng mạc, và thủy dịch tương ứng. Các thời gian bán hủy này là tương tự với các thời gian bán hủy trong tài liệu cho kháng thể đơn dòng IgG1 được nhân hóa tái tổ hợp được sử dụng lâm sàng Avastin (kháng thể kháng VEGF, bevacizumab, Bakri et al., Ophthalmology, 2007), mà cũng được khẳng định qua thực nghiệm bởi các tác giả sáng chế. Các kết quả này là như được mong đợi, vì sự thanh thải trong nội nhãn của các IgG có chiều dài đầy đủ phụ thuộc chủ yếu vào kích thước phân tử của chúng, mà tương tự đối với kháng thể theo sáng chế và Avastin. Do đó, PK người, bao gồm thời gian bán hủy trong mắt của kháng thể theo sáng chế và Avastin được kỳ vọng là tương tự nhau. Thời gian bán hủy trong mắt người được báo cáo của Avastin là $9,73 \pm 1,48$ ngày (Hutton-Smith, 2016).

Ví dụ 8: So sánh ái lực liên kết giữa kháng thể theo sáng chế và kháng thể Chiome

Cho mục đích so sánh, các tác giả sáng chế đã phát triển kháng thể được nhân hóa kháng Sema3A được bộc lộ trong WO2014123186 (Chiome Bioscience) với các dấu hiệu sau đây:

- chuỗi nặng là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11 trong WO2014123186, và
- chuỗi nhẹ là như được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 trong WO2014123186.

Các tác giả sáng chế đã phát triển 2 dạng của kháng thể này:

- một dạng được tạo định dạng trên IgG1KO Fc, được sau đây được gọi là “kháng thể Chiome A” và
- một dạng được tạo định dạng trên vùng triệt tiêu IgG1KO-FcRn sau đây được gọi là “kháng thể Chiome B”.

Mật độ bề mặt cao của kháng thể kháng Fab người (GE Healthcare) được cố định trên chip GLM (BioRad) qua việc kết cặp amin trực tiếp qua 6 kênh nằm ngang theo hướng dẫn của nhà sản xuất BioRad.

Kháng thể theo sáng chế (dòng vô tính I) và các kháng thể Chiome được bắt giữ qua bề mặt kháng thể kháng Fab người qua 5 trong số 6 kênh dọc với mật độ bề mặt tối thiểu cho phân tích liên kết động lực. Sema3A người được chuẩn bị trong đệm PBS-T-EDTA (BioRad) ở các nồng độ là 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 và 0 nM. Tiêm đệm PBS-T-EDTA được sử dụng làm đối chứng kép cho phân tích số liệu động lực. Mỗi loại trong số các dung dịch Sema3A người và đệm PBS-T-EDTA được tiêm đồng thời qua 6 kênh nằm ngang trong 10 phút tại tốc độ dòng là 40 μ L/phút sau đó là pha phân ly 2 giờ. Các bề mặt được tái tạo bởi tiêm 10 mM pH 2,1 glyxin HCl (GE Healthcare) trong 18 giây tại tốc độ dòng là 100 μ L/phút sau đó là tiêm PBS-T-EDTA 60 giây tại tốc độ dòng là 25 μ L/phút. Các đồ thị đáp ứng liên kết được làm khít với mô hình langmuir 1:1 để tính tốc độ liên kết, tốc độ phân ly và ái lực.

Số liệu động lực và ái lực của kháng thể theo sáng chế và các kháng thể Chiome liên kết với Sema3A người được liệt kê trong bảng 9 dưới đây.

Bảng 9 :

Tên mẫu	KD đối với HuSema3A
Kháng thể Chiome A	56,4 nM
Kháng thể Chiome B	55,9 nM
Kháng thể theo sáng chế (dòng vô tính I)	32,0 pM

Kết luận

Các kết quả chỉ ra rằng kháng thể theo sáng chế được chứng tỏ có ái lực liên kết với Sema3A người cao hơn so với các kháng thể trong giải pháp đã biết được bộc lộ trong WO2014123186 (Chiome Bioscience).

Ví dụ 9: So sánh ái lực liên kết giữa kháng thể theo sáng chế và Samsung scFv

Các mảnh scFv như được bộc lộ trong WO2017074013 (Samsung) đã được so sánh.

Đối với mục đích so sánh, các tác giả sáng chế đã phát triển 3 mảnh scFv được bộc lộ (“Samsung scFv”) với các dấu hiệu được bộc lộ trong bảng 10 dưới đây.

Bảng 10:

Tên của kháng thể	Trình tự	SEQ ID NO như được nêu trong WO2017074013
Samsung scFv 1	Chuỗi nặng	19
	Chuỗi nhẹ	20
Samsung scFv 2	Chuỗi nặng	21
	Chuỗi nhẹ	22
Samsung scFv 3	Chuỗi nặng	23
	Chuỗi nhẹ	24

Mật độ bề mặt cao của kháng thể kháng His (GE Healthcare) được cố định trên chip GLM (BioRad) qua việc kết cặp amin trực tiếp qua 6 kênh nằm ngang theo hướng dẫn của nhà sản xuất BioRad. Các kháng thể Samsung scFv được bắt giữ qua bề mặt kháng thể kháng His qua 5 trong số 6 kênh dọc với mật độ bề mặt tối thiểu cho thử nghiệm liên kết động lực. Sema3A người được chuẩn bị trong đệm PBS-T-EDTA (BioRad) ở các nồng độ là 100, 50, 25, 12,5, 10, 6,25, 5, 2,5, 1,25, 0,625 và 0 nM. Tiêm đệm PBS-T-EDTA được

sử dụng làm đối chứng kép cho phân tích số liệu động lực. Mỗi loại trong số các dung dịch Sema3A người và đệm PBS-T-EDTA được tiêm đồng thời qua 6 kênh nằm ngang trong 10 phút tại tốc độ dòng là 40 μL /phút sau đó là pha phân ly 1 giờ. Các bề mặt được tái tạo bởi tiêm 10 mM pH 2,1 glyxin HCl (GE Healthcare) trong 18 giây tại tốc độ dòng là 100 μL /phút sau đó là tiêm PBS-T-EDTA 60 giây tại tốc độ dòng là 25 μL /phút. Các đồ thị đáp ứng liên kết được làm khít với mô hình langmuir 1:1 để tính tốc độ liên kết, tốc độ phân ly và ái lực.

Liên kết cho kháng thể theo sáng chế với Sema3A người (dòng vô tính I) được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tương tự nhưng kháng thể dê kháng IgG người (Invitrogen) được sử dụng để bắt giữ kháng thể theo sáng chế. Sự liên kết của kháng thể theo sáng chế và Samsung ScFv với Sema3A của Cynomology, chuột nhắt, chuột cống, hoặc thỏ cũng được thực hiện sử dụng cùng phương pháp.

Số liệu động lực và ái lực của kháng thể theo sáng chế và Samsung scFv được lập danh sách ở bảng 11 dưới đây.

Bảng 11:

Tên của kháng thể	K _D với HuSema3A (pM)	K _D với CynoSema3A (pM)	K _D với MouseSema3A (pM)	K _D với RatSema3A (pM)	K _D với RabbitSema3A (pM)
Samsung scFv 1	359	89,0	105	< 20	112
Samsung scFv 2	359	118	117	< 20	122
Samsung scFv 3	296	68,0	88,8	< 20	59,5
Kháng thể theo sáng chế (dòng vô tính I)	34,7	35,0	35,0	23,5	40,1

Kết luận

Kháng thể theo sáng chế có ái lực liên kết với Sema3A người, cyno, chuột nhắt, hoặc thỏ cao hơn so với 3 Samsung scFv như được bộc lộ trong WO2017074013.

Ví dụ 10: So sánh ái lực của hai kháng thể theo sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát triển hai kháng thể có các CDR như được mô tả trong SEQ ID NO: 1 đến 6. Hai kháng thể thay đổi ở vùng Fc trong đó:

- một kháng thể bao gồm tổ hợp của L234A và L235A (kháng thể A), và
- kháng thể còn lại bao gồm đột biến H435A (kháng thể B),

các gốc được đánh số theo chỉ số EU của Kabat.

Không có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê nào ở ái lực liên kết của cả hai kháng thể với Sema3A người có các CDR như được mô tả trong SEQ ID NO: 1 đến 6. Do đó, ái lực đối với Sema3A người vẫn được duy trì ở các kháng thể kháng Sema3A theo sáng chế.

Ví dụ 11: Hoạt lực của kháng thể có bán sẵn mà kháng Sema3A

Cho mục đích so sánh, các tác giả sáng chế đã thử nghiệm hoạt tính tế bào của kháng thể có bán sẵn hướng đích Sema3A. Kháng thể đã nêu được thương mại hóa bởi Creative Biolabs dưới tên “*kháng thể trị liệu kháng SEMA3A người, được nhân hóa (CAT#: TAB-556CL)*”. Kháng thể có bán sẵn này sau đây sẽ được gọi là “kháng thể Creative Biolabs”.

Hoạt tính tế bào của kháng thể Creative Biolabs được đánh giá bằng cách đo sự tan vỡ khung tế bào ở các tế bào nội mô vi mạch võng mạc người (HRMEC) với cùng quy trình như được bộc lộ trong Ví dụ 3. Các tính toán và xác định hoạt lực được thực hiện 5 giờ sau khi kích thích.

Dưới các điều kiện này, kháng thể Creative Biolabs không thể hiện hoạt tính bất kỳ đối với sự tan vỡ khung tế bào được cảm ứng bởi Sema3A. Sự tan vỡ khung tế bào được

cảm ứng bởi Sema3A quả thực có thể không được ngăn chặn bởi kháng thể Creative Biolabs.

Do đó, kháng thể Creative Biolabs đã chứng tỏ không ngăn chặn sự tan vỡ khung tế bào được cảm ứng bởi Sema3A ở các tế bào võng mạc, trong khi ở cùng điều kiện, kháng thể theo sáng chế thì có. Điều này khẳng định hiệu quả bất ngờ và vượt trội của kháng thể theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 (H-CDR3); và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 4 (L-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 (L-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 (L-CDR3).

2. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10 và
- vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

3. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 11, tương ứng;
- b. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 11, tương ứng;
- c. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 12, tương ứng; hoặc
- d. vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 13, tương ứng.

4. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- chuỗi nặng bao gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 hoặc SEQ ID NO: 19; và
- chuỗi nhẹ bao gồm, tốt hơn là gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20.

5. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15;
- b. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 15;
- c. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 18; hoặc
- d. chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 20.

6. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

7. Polynucleotit được phân lập bao gồm:

- trình tự mã hóa chuỗi nặng bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, hoặc SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10; và
- trình tự mã hóa chuỗi nhẹ bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.

8. Vector biểu hiện bao gồm polynucleotit được phân lập theo điểm 7.

9. Tế bào chủ bao gồm polynucleotit được phân lập theo điểm 7.

10. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm bước:

- a. thu được tế bào chủ theo điểm 9; và
- b. nuôi cấy tế bào chủ.

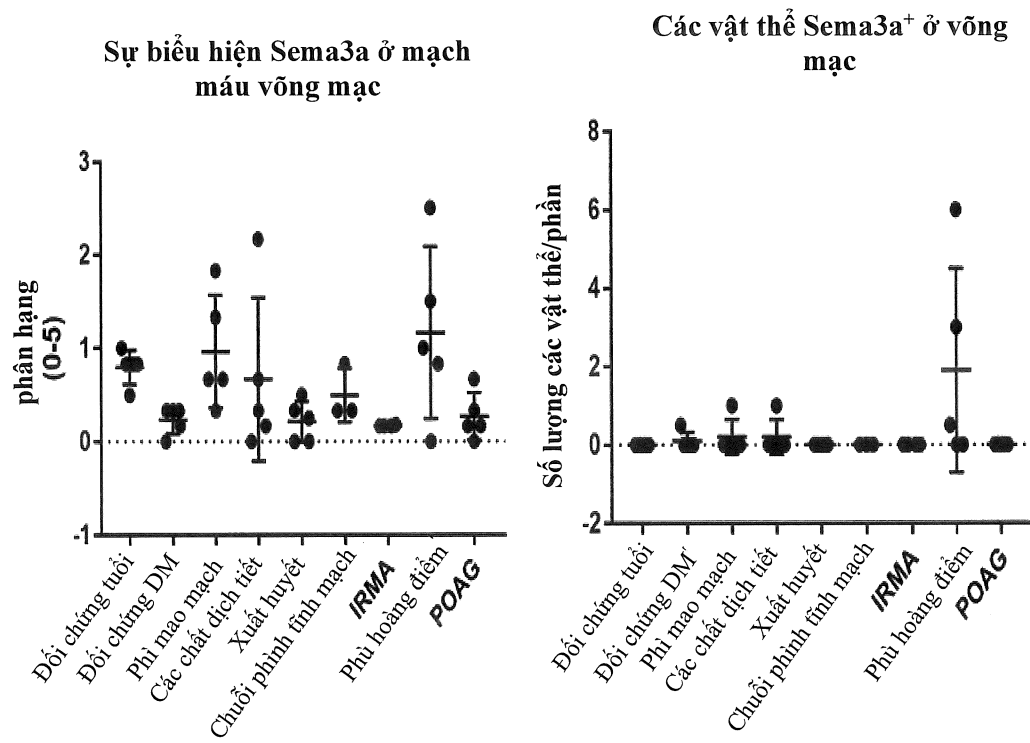
11. Phương pháp theo điểm 10, còn bao gồm bước thu hồi và tinh chế kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

12. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15.

13. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15.

14. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 17 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18.

15. Kháng thể kháng Sema3A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20.

**FIG. 1**

**Thử nghiệm khả năng thấm xuyên giếng in vitro
(Sự thấm FITV-dextran ở các đơn lớp HRMEC)**

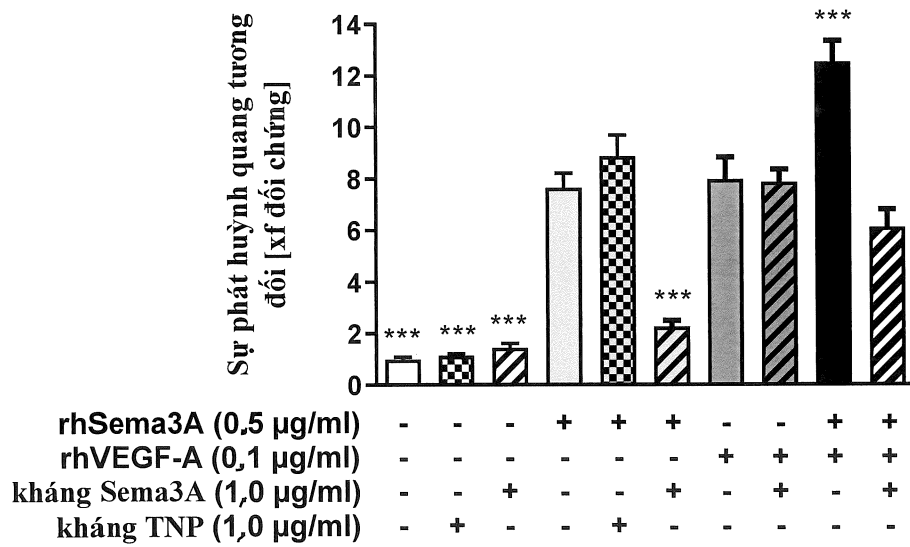


FIG. 2

Sự tan vỡ bộ xương tế bào ở HRMEC (Xcelligence)

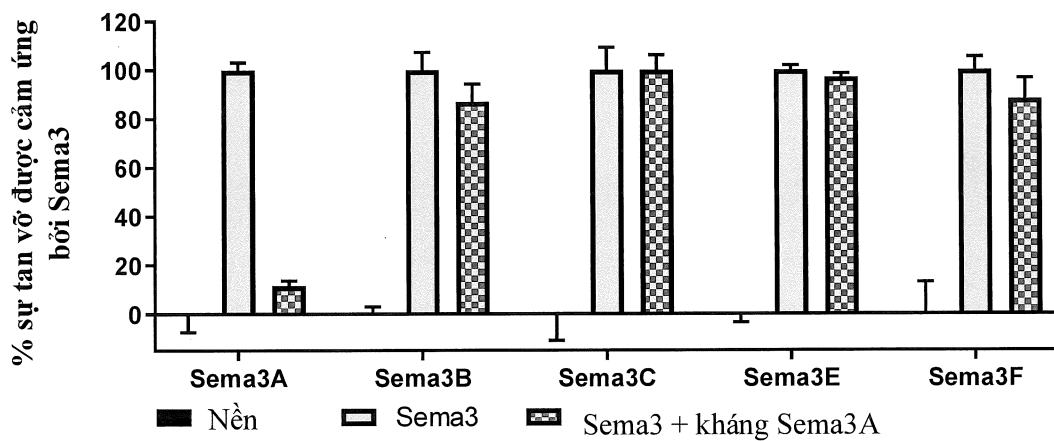
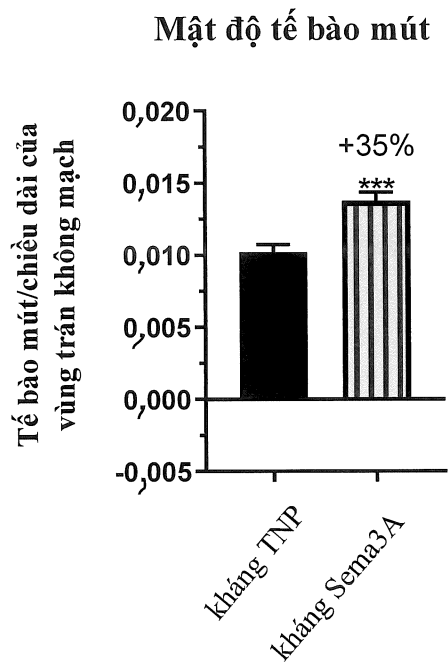
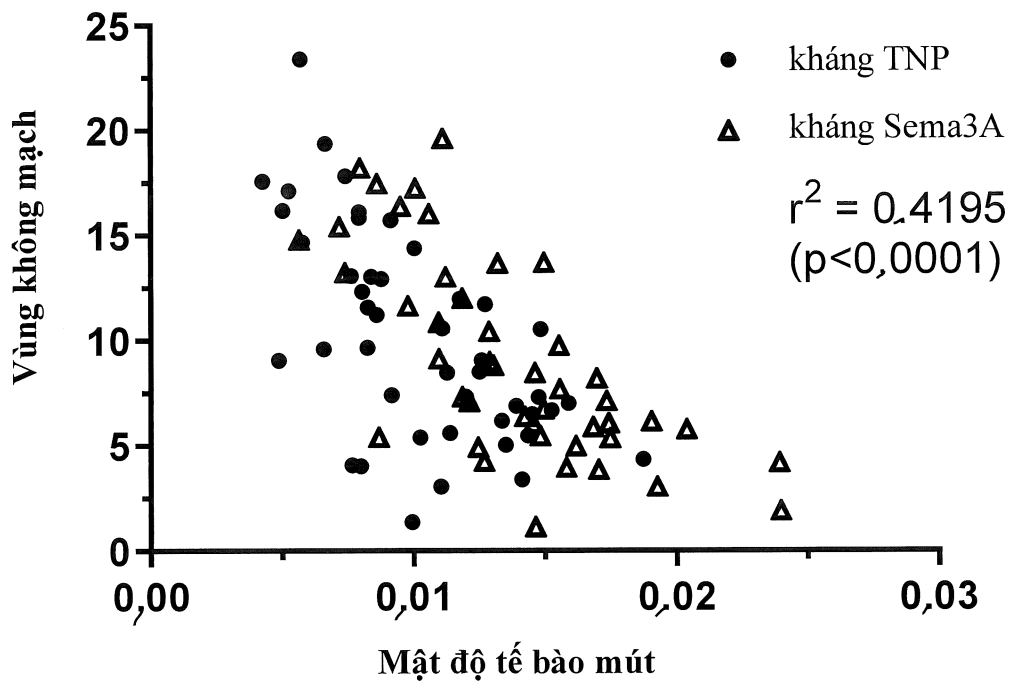
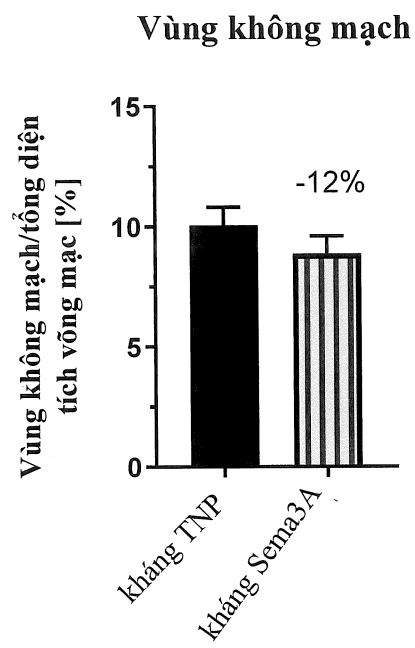


FIG. 3

**FIG. 4A**

Mật độ tế bào mủt so với vùng không mạch

**FIG. 4B**

**FIG. 4C**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim International GMBH

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG SEMA3A ĐỂ ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH VỀ MẮT, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ KHÁNG SEMA3A, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ KHÁNG SEMA3A, POPYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP, VECTO BIỂU HIỆN VÀ TẾ BÀO CHỦ CHỨA POPYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP

<130> 01-3361

<150> EP19173454.0

<151> 2019-05-09

<160> 22

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1

<400> 1

Ser Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2

<400> 2

Thr Ile Ile Lys Ser Gly Gly Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 3
Gly Gly Gln Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR1

<400> 4
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asp Tyr Leu His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR2

<400> 5
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LCDR3

<400> 6
Gln Gln Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH - biến thể 1

<400> 7

```

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

```

<210> 8
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH - biến thể 2

```

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr
20          25          30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ser Thr Ile Ile Lys Ser Gly Gly Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50          55          60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Val Arg Gly Gly Gln Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH - biến thể 3

<400> 9

```

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

```

<210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH- biến thể 4

```

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

```

<210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL - biến thể a

<400> 11

```

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

```

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL - biến thể b

```

<400> 12
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asp Tyr
20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35           40           45
Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Phe Pro Tyr
85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL- biến thể c

```

<400> 13
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asp Tyr
20           25           30

```

```

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

```

<210> 14

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng- Dòng vô tính I

<400> 14

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ser Thr Ile Ile Lys Ser Gly Gly Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50              55              60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Val Arg Gly Gly Gln Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
      100              105              110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
      115              120              125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130              135              140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145              150              155              160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
      165              170              175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
      180              185              190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195              200              205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210              215              220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225              230              235              240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
      245              250              255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

```

			260					265				270					
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
		275					280					285					
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
		290					295					300					
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
305					310					315					320		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
				325					330					335			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
		340						345					350				
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
		355					360					365					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
		370				375					380						
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
385					390					395					400		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		
			405					410						415			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		
			420					425					430				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
		435					440					445					

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ - Dòng vô tính I

<400> 15

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 16

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng - Dòng vô tính II

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ile Lys Ser Gly Gly Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gly Gly Gln Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

```

      275              280              285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
  290              295              300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
  305              310              315              320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
      325              330              335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      340              345              350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
      355              360              365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
      370              375              380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
  385              390              395              400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
      405              410              415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
      420              425              430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      435              440              445

```

<210> 17

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng - Dòng vô tính III

<400> 17

```

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

```

```

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

```

<210> 18

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ - Dòng vô tính III

<400> 18

```

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

```

```

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

```

<210> 19

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng- Dòng vô tính IV

<400> 19

```

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

```

```

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

```

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ - Dòng vô tính IV

<400> 20

```

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

```

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

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Epitope

<400> 21

Asp	Ser	Thr	Lys	Asp	Leu	Pro	Asp	Asp	Val	Ile	Thr	Phe					
1				5					10								

<210> 22

<211> 751

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

His	Pro	Glu	Asp	Asn	Ile	Phe	Lys	Leu	Glu	Asn	Ser	His	Phe	Glu	Asn		
	130					135				140							
Gly	Arg	Gly	Lys	Ser	Pro	Tyr	Asp	Pro	Lys	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu		
145					150					155					160		
Leu	Ile	Asp	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ser	Gly	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Met	Gly		
				165					170						175		
Arg	Asp	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Thr	Leu	Gly	His	His	His	Pro	Ile	Arg		
			180					185						190			
Thr	Glu	Gln	His	Asp	Ser	Arg	Trp	Leu	Asn	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Ser		
		195					200					205					
Ala	His	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Asp	Asn	Pro	Glu	Asp	Asp	Lys	Val	Tyr		
	210					215					220						
Phe	Phe	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Ile	Asp	Gly	Glu	His	Ser	Gly	Lys	Ala		
225					230					235					240		
Thr	His	Ala	Arg	Ile	Gly	Gln	Ile	Cys	Lys	Asn	Asp	Phe	Gly	Gly	His		
				245					250					255			
Arg	Ser	Leu	Val	Asn	Lys	Trp	Thr	Thr	Phe	Leu	Lys	Ala	Arg	Leu	Ile		
			260					265						270			
Cys	Ser	Val	Pro	Gly	Pro	Asn	Gly	Ile	Asp	Thr	His	Phe	Asp	Glu	Leu		
		275					280					285					
Gln	Asp	Val	Phe	Leu	Met	Asn	Phe	Lys	Asp	Pro	Lys	Asn	Pro	Val	Val		
	290					295					300						
Tyr	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Ser	Ser	Asn	Ile	Phe	Lys	Gly	Ser	Ala	Val		
305					310					315					320		
Cys	Met	Tyr	Ser	Met	Ser	Asp	Val	Arg	Arg	Val	Phe	Leu	Gly	Pro	Tyr		
				325				330						335			
Ala	His	Arg	Asp	Gly	Pro	Asn	Tyr	Gln	Trp	Val	Pro	Tyr	Gln	Gly	Arg		
			340					345					350				
Val	Pro	Tyr	Pro	Arg	Pro	Gly	Thr	Cys	Pro	Ser	Lys	Thr	Phe	Gly	Gly		
		355					360					365					
Phe	Asp	Ser	Thr	Lys	Asp	Leu	Pro	Asp	Asp	Val	Ile	Thr	Phe	Ala	Arg		
	370					375					380						
Ser	His	Pro	Ala	Met	Tyr	Asn	Pro	Val	Phe	Pro	Met	Asn	Asn	Arg	Pro		
385					390					395					400		
Ile	Val	Ile	Lys	Thr	Asp	Val	Asn	Tyr	Gln	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Val		
				405					410					415			
Asp	Arg	Val	Asp	Ala	Glu	Asp	Gly	Gln	Tyr	Asp	Val	Met	Phe	Ile	Gly		
			420					425				430					
Thr	Asp	Val	Gly	Thr	Val	Leu	Lys	Val	Val	Ser	Ile	Pro	Lys	Glu	Thr		
		435					440					445					
Trp	Tyr	Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Glu	Glu	Met	Thr	Val	Phe	Arg		
	450					455					460						
Glu	Pro	Thr	Ala	Ile	Ser	Ala	Met	Glu	Leu	Ser	Thr	Lys	Gln	Gln	Gln		
465					470					475					480		
Leu	Tyr	Ile	Gly	Ser	Thr	Ala	Gly	Val	Ala	Gln	Leu	Pro	Leu	His	Arg		
				485					490					495			
Cys	Asp	Ile	Tyr	Gly	Lys	Ala	Cys	Ala	Glu	Cys	Cys	Leu	Ala	Arg	Asp		
		500						505					510				
Pro	Tyr	Cys	Ala	Trp	Asp	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Arg	Tyr	Phe	Pro	Thr		
		515					520					525					
Ala	Lys	Arg	Arg	Thr	Arg	Arg	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Gly	Asp	Pro	Leu		
	530					535					540						
Thr	His	Cys	Ser	Asp	Leu	His	His	Asp	Asn	His	His	Gly	His	Ser	Pro		
545					550					555					560		

Glu	Glu	Arg	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val	Glu	Asn	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Glu
				565					570					575	
Cys	Ser	Pro	Lys	Ser	Gln	Arg	Ala	Leu	Val	Tyr	Trp	Gln	Phe	Gln	Arg
			580					585					590		
Arg	Asn	Glu	Glu	Arg	Lys	Glu	Glu	Ile	Arg	Val	Asp	Asp	His	Ile	Ile
		595				600					605				
Arg	Thr	Asp	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Gln	Lys	Asp	Ser
	610					615					620				
Gly	Asn	Tyr	Leu	Cys	His	Ala	Val	Glu	His	Gly	Phe	Ile	Gln	Thr	Leu
625					630					635					640
Leu	Lys	Val	Thr	Leu	Glu	Val	Ile	Asp	Thr	Glu	His	Leu	Glu	Glu	Leu
				645					650					655	
Leu	His	Lys	Asp	Asp	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Lys	Thr	Lys	Glu	Met	Ser
			660					665					670		
Asn	Ser	Met	Thr	Pro	Ser	Gln	Lys	Val	Trp	Tyr	Arg	Asp	Phe	Met	Gln
		675					680					685			
Leu	Ile	Asn	His	Pro	Asn	Leu	Asn	Thr	Met	Asp	Glu	Phe	Cys	Glu	Gln
	690					695					700				
Val	Trp	Lys	Arg	Asp	Arg	Lys	Gln	Arg	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	His	Thr
705					710					715					720
Pro	Gly	Asn	Ser	Asn	Lys	Trp	Lys	His	Leu	Gln	Glu	Asn	Lys	Lys	Gly
				725					730				735		
Arg	Asn	Arg	Arg	Thr	His	Glu	Phe	Glu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Val	
			740					745					750		