



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

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



1-0047607

(51)<sup>2020.01</sup> A61K 39/395; C07K 16/28; A61P 27/00 (13) B

- 
- (21) 1-2022-02390 (22) 24/09/2020  
(86) PCT/EP2020/076685 24/09/2020 (87) WO 2021/058636 01/04/2021  
(30) 19199099.3 24/09/2019 EP; 20150942.9 09/01/2020 EP  
(45) 25/06/2025 447 (43) 25/07/2022 412A  
(73) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE)  
Binger Strasse 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, Germany  
(72) ZIPPEL, Nina (DE); GUPTA, Pankaj (US); HAN, Fei (US); HUANG, Yining (CN);  
LOW, Sarah (US); PRESTLE, Juergen (DE); THOMAS, Leo (DE).  
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
- 

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG MIỄN A CỦA NEUROPILIN 1 (NRP1A) ĐỂ ĐIỀU TRỊ  
CÁC BỆNH VỀ MẮT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-02390

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể và đoạn của nó mà hướng đích miền A của Neuropilin-1 (Nrp1A). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A, được phẩm chứa kháng thể này và phương pháp sản xuất kháng thể này. Kháng thể này là hữu dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế nói chung đề cập đến các kháng thể và các đoạn của nó mà hướng đích Neuropilin 1 (Nrp1), chính xác hơn là miền A của Nrp1 (Nrp1A). Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng Nrp1A và phương pháp sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau. Sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa kháng thể kháng Nrp1A.

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

Bệnh võng mạc tiểu đường là một trong những biến chứng gây suy nhược cơ thể nhiều nhất của bệnh tiểu đường. Bất chấp những tiến bộ lớn trong việc tìm hiểu cơ chế bệnh sinh của căn bệnh này và hiệu quả của các liệu pháp điều trị hiện tại, bệnh võng mạc tiểu đường vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây mù lòa mới khởi phát ở những người trong độ tuổi lao động.

Bệnh võng mạc tiểu đường được đặc trưng bởi sự tiến triển của các bất thường xảy ra trên mạch máu, thần kinh đệm và tế bào thần kinh. Một trong những biến chứng mạch máu là mất các mao mạch nhỏ dẫn đến thiếu máu cục bộ võng mạc. Bệnh võng mạc do thiếu máu cục bộ được đặc trưng bởi sự mất hoặc rối loạn chức năng của mạch máu võng mạc, dẫn đến giảm lưu lượng máu và giảm oxy huyết. Tình trạng sa mao mạch thường biểu hiện xung quanh vùng không mạch ở hố thị giác (foveal avascular zone - FAZ) do đó mở rộng kích thước của nó, một tình trạng được gọi là thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường (diabetic macular ischemia - DMI). Thiếu máu cục bộ của võng mạc dẫn đến việc điều chỉnh tăng các yếu tố tăng trưởng tiền sinh mạch và đồng thời cả các yếu tố đẩy mạch, dẫn đến lệch hướng hình thành mạch. Sự tái phân phối mạch của võng mạc do thiếu máu cục bộ không xảy ra, trong khi có sự tân tạo mạch bệnh lý mạnh mẽ vào thủy tinh thể, một vùng của mắt thường không có mạch máu. Sự phát triển của các mạch mới bất thường này trong bệnh võng mạc tăng sinh 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 sẹo có thể kết thúc bằng bong võng mạc. Các phương pháp điều trị bệnh võng mạc tăng sinh hiện nay tìm cách phá hủy các mạch bệnh lý hiện có nhưng

không giải quyết được tình trạng thiếu máu cục bộ cơ sở mà thúc đẩy sự phát triển của chúng. Hiện nay, phương pháp điều trị tiêu chuẩn cho bệnh võng mạc tăng sinh bao gồm phá hủy một phần võng mạc bằng tia lazer nhằm ngăn chặn sự phát triển mạch mới và duy trì thị lực trung tâm. Tuy nhiên, các phương pháp điều trị này ở một mức độ nào đó là không hiệu quả. Trong khi một số bệnh nhân có thể duy trì thị lực ổn định trong nhiều năm, một tỷ lệ cao bệnh nhân bị bệnh võng mạc cuối cùng bị mất toàn bộ thị lực.

Bệnh võng mạc cũng có thể được đặc trưng bằng sự gia tăng rò rỉ mạch máu võng mạc dẫn đến phù hoàng điểm. Hiện tại, bệnh nhân bị phù hoàng điểm do tiểu đường được điều trị bằng các hợp chất hướng đích yếu tố tăng trưởng nội mô mạch A (VEGF-A), yếu tố tăng trưởng mà thúc đẩy cả sự hình thành mạch và tính thấm thành mạch.. Chiến lược điều trị này có thể không đủ để điều trị cho những bệnh nhân bị thiếu máu cục bộ hoàng điểm và phù hoàng điểm.

Do đó, vẫn cần một phương pháp trị liệu để điều trị cho những bệnh nhân có thể được hưởng lợi từ các đặc tính tiền tạo mạch của VEGF-A, đặc biệt là ở những bệnh nhân bị cả thiếu máu cục bộ hoàng điểm và phù hoàng điểm. Do đó, vẫn có nhu cầu chưa được đáp ứng về các phương pháp trị liệu mới để điều trị hiệu quả các bệnh về mắt hoặc võng mạc.

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

Các neuropilin (NRP) là các thụ thể glycoprotein xuyên màng đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của hệ thần kinh và mạch máu như là các thụ thể cho các thành viên của họ semaphorin nhóm 3 (SEMA) của các yếu tố hướng dẫn trực và các thành viên của họ yếu tố tăng trưởng nội mô mạch (VEGF) gồm các yếu tố hình thành mạch. Hai protein neuropilin, neuropilin-1 (Nrp-1) và neuropilin-2 (Nrp-2) đã được nhận diện. Vùng ngoại bào của chúng chứa ba miền: hai miền tương đồng CUB (miền A của Nrp1, ở đây còn được đề cập là “Nrp1A”) làm miền gắn kết phối tử Sema3, hai miền tương đồng V/VIII của yếu tố đông tụ (miền B của Nrp1, ở đây còn được đề cập là “Nrp1B”) làm miền gắn kết VEGF, và miền MAM (c) có liên quan đến sự dime hóa Nrp-1. Nrp-1 có thể gắn kết với VEGF-A165, VEGF-B, VEGF-E, PlGF, Sema3A, Sema3B và Sema3C, trong khi đó Nrp2 gắn kết với VEGF-A165, VEGF-A145, VEGF-C, VEGF-D, SEMA3B, Sema3C, Sema3F và Sema3G. Vị trí gắn kết đối với

các phối tử VEGF đã được định vị tại miền B của Nrp1 trong khi đó sự gắn kết của các semaphorin đã được định vị tại miền A của Nrp1.

Trình tự của Nrp1 người là có sẵn trực tuyến, tiền chất Nrp1 isoform A được mô tả trong SEQ ID NO: 26 và có sẵn dưới trình tự protein tham chiếu NP\_003864. Nrp1 đã được nghiên cứu trong quá trình hình thành mạch và di căn trong nhiều năm, nhưng tác động của nó đối với tái phân phối mạch và tân tạo mạch võng mạc vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Các tác giả sáng chế đã chứng minh ở đây rằng việc hướng đích Nrp1, đặc biệt là miền A của Nrp1, là chiến lược có hiệu quả cao để điều trị các bệnh về mắt và võng mạc.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa 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 của chuỗi nhẹ chứa 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 phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa 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: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và
- vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa 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.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa 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: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và
- vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa 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;

trong đó:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa 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 của chuỗi nhẹ chứa 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 phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và
- vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11;
- b. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 11;

- c. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 11;
- d. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 11;
- e. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 11;
- f. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 11; hoặc
- g. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- chuỗi nặng chứa, tốt hơn là chỉ bao gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25; và
- chuỗi nhẹ chứa, tốt hơn là chỉ bao gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- b. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- c. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- d. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;

- e. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- f. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19; hoặc
- g. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng Nrp1A là kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin 68-77 của Nrp1 người như được mô tả trong SEQ ID NO: 26.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 26. Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với các vùng axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng làm thuốc.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để ức chế tác dụng đầy mạch của Sema3A, và/hoặc để cải thiện sự tái phân phối mạch của võng mạc. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên để ức chế khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc (blood retinal barrier - BRB) được cảm ứng bởi Sema3A và để ức chế khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc được cảm ứng bởi VEGF, tốt hơn là bởi VEGF-A.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên để:

- chuyển hướng hình thành mạch tới các vùng thiếu máu cục bộ, để cải thiện sự tái phân phối mạch của võng mạc;

- ngăn ngừa sự tân tạo mạch bệnh lý của vùng thủy tinh thể;
- ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi Sema3A; và
- ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh về mắt hoặc võng mạc.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị một hoặc nhiều bệnh về võng mạc hoặc mắt, bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị dùng lượng có hiệu quả về mặt dược lý của kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh võng mạc, bệnh võng mạc tăng sinh (proliferative retinopathy - PR) như bệnh võng mạc ở trẻ sinh non, bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh võng mạc tiểu đường (diabetic retinopathy - DR) bao gồm bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh (proliferative diabetic retinopathy - PDR) và bệnh võng mạc tiểu đường không tăng sinh, bệnh phù hoàng điểm do tiểu đường (diabetic macular edema - DME), bệnh thiếu máu hoàng điểm do tiểu đường (diabetic macular ischemia - DMI), thoái hóa hoàng điểm liên quan đến tuổi tác, viêm võng mạc sắc tố, loạn dưỡng võng mạc di truyền, thoái hóa do cận thị, tắc nghẽn tĩnh mạch võng mạc, tắc nghẽn động mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng mạch nhỏ, phù hoàng điểm dạng nang, bệnh màng tân mạch màng mạch thứ phát đối với bệnh võng mạc bất kỳ, bệnh thần kinh thị giác, bệnh cườm nước (glaucoma), bong võng mạc, bệnh võng mạc do chất độc, bệnh võng mạc do bức xạ, bệnh võng mạc do chấn thương, bệnh mạch máu võng mạc do thuốc, tân tạo mạch võng mạc, bệnh mạch máu màng mạch dạng polyp, bệnh viêm mạch võng mạc, phình mao mạch võng mạc, loạn dưỡng Fuch, giãn mao mạch hoàng điểm, hội chứng Usher, và bệnh Stargardt.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh võng mạc tiểu đường gồm bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh và bệnh võng mạc tiểu đường không tăng sinh, bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ, phù

hoàng đĩnh do tiểu đường, thiếu máu cục bộ hoàng đĩnh do tiểu đường, phù hoàng đĩnh liên quan đến tuổi tác, tân tạo mạch võng mạc, cườm nước và tân tạo mạch màng mạch. Tốt hơn là, bệnh này là phù hoàng đĩnh do tiểu đường và/hoặc thiếu máu cục bộ hoàng đĩnh do tiểu đường.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể kháng NrplA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị thiếu máu cục bộ hoàng đĩnh do tiểu đường, bằng cách thúc đẩy sự tái sinh mạch trong võng mạc thiếu máu cục bộ (tái phân phối mạch) và giảm sự tân tạo mạch bệnh lý của các vùng thủy tinh thể của mắt. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế không ức chế sự hình thành mạch được cảm ứng bởi VEGF, tốt hơn là VEGF-A.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng NrplA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị phù hoàng đĩnh do tiểu đường, bằng cách giảm, tốt hơn là ngăn ngừa, khả năng thâm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi Sema3A và bằng cách giảm, tốt hơn là ngăn ngừa, khả năng thâm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng NrplA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó và chất mang được dụng.

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

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

- trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và

- trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vector virus chứa polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa vector biểu hiện hoặc polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm bước thu tế bào chủ chứa vector biểu hiện hoặc polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25 hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11; và nuôi cấy tế bào chủ.

Theo một phương án, phương pháp sản xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó còn bao gồm bước thu hồi và tinh chế kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

FIG.1: Định vị Sema3A trong mắt người

Hình vẽ này thể hiện sự định vị Sema3A trong mắt người trong các mẫu võng mạc đã định từ những người cho có tiền sử bệnh võng mạc tiểu đường hoặc bệnh cườm nước góc mở nguyên phát (primary open angle glaucoma - POAG) so với các đối chứng khớp về tuổi tác (Age ctrl) và các đối tượng bị tiểu đường, nhưng không có bệnh lý về mắt (DM ctrl). Sema3A được phát hiện trong thành mạch của mạch máu võng mạc. Ngoài ra, các đối tượng huỳnh quang Sema3A không xác định nhưng phân biệt được quan sát trong lớp tế bào hạch võng mạc.

FIG.2: Ưc chế tác dụng qua trung gian VEGF - khả năng thấm cảm ứng bởi VEGF-A ở võng mạc của chuột Brown Norway

Huỳnh quang Evans Blue (EB) võng mạc được sử dụng làm chỉ số đo khả năng thấm để đánh giá sự rò rỉ mạch máu. Tiêm VEGF-A nội nhãn gây ra sự tăng khả năng thấm trong võng mạc. Kháng thể theo sáng chế gắn kết với miền A của Nrp1 ức chế khả năng thấm của võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A, tương tự như bẫy VEGF (aflibercept). Kháng thể được định hướng kháng phối tử Nrp1 semaphorin 3A (kháng thể Sema3A) không ức chế khả năng thấm cảm ứng bởi VEGF-A trong võng mạc.

FIG.3: Tác dụng của kháng thể theo sáng chế và việc điều trị kháng VEGF đối với mật độ tế bào đỉnh, vùng không mạch và các búi tiền võng mạc ở mô hình OIR chuột nhắt

Mật độ tế bào đỉnh, vùng không mạch và tân tạo mạch tiền võng mạc (các búi) được nghiên cứu trong mô hình bệnh võng mạc cảm ứng bởi oxy (oxygen-induced retinopathy - OIR) ở các con chuột nhắt con. Các con vật được tiếp xúc với 75% oxy

từ P7 đến P12 và được tiêm liều đơn kháng thể vào nội nhãn sau khi quay trở lại trình trạng oxy thông thường (normoxia) vào P12. Kháng thể đối chứng được định hướng kháng trinitrophenol. Vào P17, các flatmount võng mạc được chuẩn bị, nhuộm bằng isolectin B4 và được sử dụng để đếm các tế bào đỉnh và xác định kích cỡ của vùng không mạch võng mạc. Kháng thể theo sáng chế gắn kết với miền A của Nrp1 làm gia tăng mật độ tế bào đỉnh và làm giảm vùng không mạch trong khi đó aflibercept bẫy VEGF không làm được (3A, 3C). Sự tương quan giữa mật độ tế bào đỉnh và vùng không mạch được thể hiện trên (3B). Mất đối bên được sử dụng để phân chia mô học của cốc mắt và nhân tiền võng mạc đã được đếm. Sự tân tạo mạch tiền võng mạc bị ức chế mạnh hơn bởi aflibercept so với bởi kháng thể theo sáng chế (3D).

FIG.4: Sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế với VEGF và Nrp1

Sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế với Nrp1 của người (hNrp1) với sự có mặt của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch của người được biotinyl hóa -165 (hVEGF165) được hoàn thành bằng cách sử dụng thiết bị Bio-Layer Interferometry (BLI). hVEGF165 được biotinyl hóa được bắt giữ trên đầu cảm biến streptavidin sử dụng 10 ug/ml biotin hNFAM1 (hoặc chất đệm) (điểm A trên Fig.4). Sau khi rửa các đầu cảm biến, 100nM Nrp1 người được bắt giữ thông qua hVEGF165 (điểm B trên Fig.4). Cuối cùng, các cảm biến được nhúng vào các nồng độ khác nhau của kháng thể theo sáng chế (100nM và 400nM) để xem có thấy sự gắn kết hay không (điểm C trên Fig.4). Hình vẽ đã xác nhận rằng hNrp1 đã gắn kết với hVEGF165 được biotinyl hóa. Hình vẽ còn thể hiện rằng theo tương tác này, kháng thể theo sáng chế vẫn có khả năng gắn kết với hNrp1 ngay cả khi nó được gắn kết đồng thời với hVEGF165. Điều này chỉ ra rằng kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự gắn kết của VEGF và Nrp1 người.

FIG.5: Sự tăng sinh tế bào nội mô cảm ứng bởi VEGF-A

Sự tăng sinh tế bào nội mô được nghiên cứu trên các tế bào nội mô vi mạch võng mạc của người (human retinal microvascular endothelial cells - HRMEC) sử dụng hệ thống Incucyte (Sartorius). Trong thử nghiệm chức năng này, việc bổ sung protein VEGF-A tái tổ hợp vào lớp hợp đồng phụ của HRMEC cảm ứng sự tăng sinh của chúng. Kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự tăng sinh tế bào nội mô cảm

ứng bởi VEGF-A, trong khi đó aflibercept bắt VEGF (Eylea®) thể hiện sự giảm phụ thuộc liều sự tăng sinh tế bào HRMEC cảm ứng bởi VEGF-A.

FIG.6: Thử nghiệm hình thành mạng nội mô cảm ứng bởi VEGF-A

Sự hình thành mạch in vitro được đánh giá trong thử nghiệm hình thành mạng trong việc nuôi cấy đồng thời nội mô/nguyên bào sợi. Trong thử nghiệm chức năng này, VEGF-A cảm ứng sự hình thành các mạng nội mô trên đỉnh của lớp hợp dòng các nguyên bào sợi. Hiệu quả và hiệu lực (IC50) của kháng thể ví dụ theo sáng chế và bắt VEGF (bevacizumab, Avastin®) được đánh giá trong việc ngăn chặn sự hình thành mạng cảm ứng bởi 10 ng/mL VEGF-A. Kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự hình thành mạng nội mô cảm ứng bởi VEGF-A, trong khi đó bắt VEGF (bevacizumab, Avastin®) thể hiện sự giảm phụ thuộc liều sự hình thành mạng cảm ứng bởi VEGF-A.

FIG.7: Vùng tổn thương tân mạch màng mạch ở chuột Brown Norway sau khi quang đông mắt bằng laze

Các con vật nhận hai liều tiêm nội nhãn kháng thể đối chứng IgG (109 µg/mắt), kháng thể theo sáng chế (liều thấp 54,5 mg/mắt; liều cao 109 µg/mắt) hoặc bắt VEGF Eylea® (200 µg/mắt) vào ngày 1 và ngày 8. Sự quang đông bằng laze được thực hiện vào ngày 1 ngay trước khi tiêm nội nhãn lần đầu tiên. Vùng tổn thương được phân tích vào ngày 15 bằng sự nhuộm isolectin B4 đối với các flatmount RPE/ màng mạch/ màng cứng. Số liệu là giá trị trung bình  $\pm$  SEM. Phân tích thống kê được thực hiện bằng kiểm định t hai chiều không ghép cặp (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

## Mô tả chi tiết sáng chế

### Các định nghĩa

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

nặng giống hệt nhau của các heterodime. Mặc dù các chuỗi nhẹ và nặng được liên kết với nhau bằng một liên kết disulfua, song số lượng các liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng thay đổi bởi isotyp globulin miễn dịch. Mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cũng có các cầu disulfua nội chuỗi cách đều nhau. Mỗi chuỗi nặng có tại đầu amin một miền biến đổi ( $V_H$  = chuỗi nặng biến đổi), theo sau là ba hoặc bốn miền hằng định ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ , 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 amin ( $V_L$  = chuỗi nhẹ biến đổi) và một miền hằng định 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 disulfua. Các gốc axit amin đặc biệt được cho là tạo ra giao diện giữa các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (Chothia et al., 1985, J. Mol. Biol. 186:651-663.)

Các miền nhất định nằm trong các miền biến đổi khác nhau rất nhiều giữa các kháng thể khác nhau, tức là "siêu biến đổi". Các miền siêu biến đổi này chứa các gốc có liên quan trực tiếp đến sự gắn kết và tính đặc hiệu của mỗi kháng thể cụ thể đối với yếu tố quyết định kháng nguyên đặc hiệu của nó. Khả năng siêu biến đổi, cả ở miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, tập trung ở ba đoạn được gọi là các vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining region-CDR) hoặc các vòng siêu biến đổi (hypervariable loop-HVL). Các CDR được xác định bởi sự so sánh trình tự trong Kabat et al., 1991, In: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> 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. Nếu 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 của chuỗi nhẹ; CDR-H1 được định vị ở khoảng các gốc 31-35, CDR-H2 ở khoảng các gốc 50-65, và CDR-H3 ở khoảng các gốc 95-102 trong miền biến đổi của chuỗi nặng. Do đó, CDR1, CDR2, CDR3 của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ xác định các đặc tính chức năng và duy nhất đặc hiệu đối với một kháng thể nhất định.

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

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

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

Các chuỗi nhẹ của các globulin miễn dịch của động vật có xương sống được chia thành một trong số hai loại khác nhau rõ rệt, kappa ("κ") và lambda ("λ"), dựa trên trình tự axit amin miền hằng định. Để so sánh, các chuỗi nặng của globulin miễn dịch của động vật có vú được chia thành một trong năm nhóm chính, theo trình tự của các miền hằng định: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM. IgG và IgA còn được chia thành các nhóm phụ (isotyp), ví dụ, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, và IgA<sub>2</sub>, tương ứng. Các miền hằng định của chuỗi nặng tương ứng với các nhóm globulin miễn dịch khác nhau lần lượt được gọi là  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , và  $\mu$ . Các cấu trúc dưới đơn vị và cấu hình ba chiều của các nhóm globulin miễn dịch tự nhiên là đã được biết rõ.

Các thuật ngữ "kháng thể", "kháng thể kháng Nrp1A", "kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người", và "kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người dạng biến thể" được sử dụng ở đây theo nghĩa rộng nhất và đặc biệt bao gồm các kháng thể đơn dòng (bao gồm cả kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ), các

kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép), và các đoạn kháng thể như các miền biến đổi và các phần khác của kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn, ví dụ, gắn kết với NrplA.

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

Các kháng thể khảm bao gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một kháng thể từ một loài (ví dụ, động vật có vú không phải người như chuột) và các vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của một loài khác (ví dụ, người) và có thể thu được bằng cách liên kết các trình tự ADN mã hóa các vùng biến đổi của kháng thể từ loài đầu tiên (ví dụ, chuột) sang trình tự ADN cho các vùng hằng định của kháng thể từ loài thứ hai (ví dụ, người) và biến đổi vật chủ với vector biểu hiện chứa các trình tự liên kết để cho phép nó tạo thành kháng thể khảm. Ngoài ra, kháng thể khảm cũng có thể là kháng thể trong đó một hoặc nhiều vùng hoặc miền của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống hệt với, tương đồng với, hoặc là một biến thể của trình tự tương ứng trong một kháng thể đơn dòng từ một nhóm hoặc một isotyp globulin miễn dịch khác, hoặc từ một trình tự liên ứng hoặc trình tự dòng mầm. Các kháng thể khảm có thể bao gồm các đoạn của các kháng thể như vậy, với điều kiện là đoạn kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn của kháng thể bố mẹ của nó, ví

dụ như liên kết với cùng một epitop (xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

Các thuật ngữ, "đoạn kháng thể", "đoạn gắn kết kháng nguyên", "đoạn kháng thể kháng Nrp1A", "đoạn kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người", "đoạn kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người dạng biến thể" đề cập đến một phần của kháng thể kháng Nrp1A có chiều dài đầy đủ, trong đó một vùng biến đổi hoặc khả năng chức năng được giữ lại, ví dụ, khả năng gắn kết epitop Nrp1A đặc hiệu. Ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đoạn Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv và scFv-Fc, diabody, kháng thể thẳng, kháng thể chuỗi đơn, minibody, diabody được tạo thành từ các đoạn kháng thể, và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể.

Kháng thể chiều dài đầy đủ có thể được xử lý bằng các enzym như papain hoặc pepsin để tạo ra các đoạn kháng thể hữu ích. Sự phân giải bằng papain được sử dụng để tạo thành hai đoạn kháng thể gắn kết kháng nguyên giống nhau được gọi là các đoạn Fab, mỗi đoạn có một vị trí gắn kết kháng nguyên duy nhất, và một đoạn Fc còn lại. Đoạn Fab còn chứa miền hằng định của chuỗi nhẹ và miền C<sub>H1</sub> của chuỗi nặng. Xử lý bằng pepsin tạo ra đoạn F(ab')<sub>2</sub> mà có hai vị trí gắn kết kháng nguyên và vẫn có khả năng liên kết ngang với kháng nguyên.

Các đoạn Fab' khác với các đoạn Fab bởi sự có mặt của các gốc bổ sung bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng bản lề kháng thể tại đầu tận cùng C của miền C<sub>H1</sub>. Các đoạn kháng thể F(ab')<sub>2</sub> là các cặp đoạn Fab' được liên kết bởi các gốc xystein trong vùng bản lề. Các cách kết hợp hóa học khác giữa các đoạn kháng thể cũng đã biết.

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

Đoạn kháng thể "Fv chuỗi đơn" hoặc "scFv" là biến thể Fv chuỗi đơn bao gồm các miền V<sub>H</sub> và V<sub>L</sub> của kháng thể, trong đó các miền này có mặt trong chuỗi polypeptit đơn. Fv chuỗi đơn có khả năng nhận diện và gắn 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 gắn kết kháng nguyên bởi scFv (xem, ví dụ, Pluckthun, 1994, In *The Pharmacology of monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315).

Các đoạn kháng thể được nhận diện khác bao gồm các đoạn gồm một cặp đoạn Fd nối tiếp ( $V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$ ) để tạo thành một cặp vùng gắn kết kháng nguyên. “Các kháng thể thẳng” này có thể là đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu đơn như được mô tả trong, ví dụ, Zapata et al. 1995, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062.

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

Sáng chế mô tả các kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người chứa các CDR có nguồn gốc từ kháng thể khả năng hoặc của chuột mà được chèn vào giữa các FR của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của trình tự dòng mầm của người. Cần phải hiểu rằng các gốc FR chuột nhất định có thể là quan trọng đối với chức năng của các kháng thể được làm giống như của người và do đó, một số gốc của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của trình tự dòng mầm của người được cải biến để giống như các gốc của trình tự của chuột tương ứng.

Như được sử dụng ở đây, biểu hiện “kháng thể theo sáng chế” và “kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế” để chỉ kháng thể được định hướng kháng Nrp1, tốt hơn là miền A của Nrp1, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được mô tả ở đây. Tốt hơn là, kháng thể nêu trên theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa 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 của chuỗi nhẹ chứa 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 phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người. Kháng thể được làm giống như của người về cơ bản là bao gồm ít nhất một, và điển hình là hai, miền biến đổi (như có trong, ví dụ, các đoạn Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, và Fv) trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người, và cụ thể ở đây, các CDR là các trình tự của chuỗi, và các FR là các FR của trình tự liên ứng hoặc dòng mầm globulin miễn dịch của người. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người còn bao gồm ít nhất một phần của vùng Fc globulin miễn dịch, điển hình là một phần của vùng Fc globulin miễn dịch của người. Thông thường, kháng thể sẽ chứa cả chuỗi nhẹ cũng như ít nhất là miền biến đổi của chuỗi nặng. Kháng thể này còn có thể bao gồm một hoặc nhiều vùng C<sub>H1</sub>, bản lề, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>, và/hoặc C<sub>H4</sub> của chuỗi nặng, nếu thích hợp.

Kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người có thể được chọn từ nhóm bất kỳ trong số các globulin miễn dịch, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và isotyp bất kỳ, bao gồm IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> và IgA<sub>2</sub>. Ví dụ, miền hằng định có thể là miền hằng định cố định hỗ trợ trong đó mong muốn rằng kháng thể được làm giống như của người thể hiện hoạt tính gây độc tế bào, và isotyp điển hình là IgG<sub>1</sub>. Khi hoạt tính gây độc tế bào là không mong muốn, miền hằng định có thể thuộc isotyp khác, ví dụ, IgG<sub>2</sub>. Kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người theo cách khác có thể bao gồm các trình tự từ nhiều hơn một nhóm globulin miễn dịch hoặc isotyp, và việc lựa chọn các miền hằng định cụ thể để tối ưu hóa các chức năng tác động mong muốn nằm trong hiểu biết của người có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể mà là các kháng thể IgG1 và cụ thể hơn là các kháng thể IgG1 được đặc trưng bằng chức năng tác động giảm.

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế là kháng thể được làm giống như của người được định dạng dưới dạng IgG1KO.

Các FR và CDR, hoặc HVL, của kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người không cần tương ứng chính xác với các trình tự bố mẹ. Ví dụ, một hoặc nhiều gốc trong CDR nhập khẩu, hoặc HVL, hoặc trình tự FR liên ứng hoặc dòng mầm có thể được thay đổi (ví dụ, bị đột biến) bằng cách thay thế, chèn hoặc xóa bỏ sao cho gốc axit amin thu được không còn giống với gốc ban đầu ở vị trí tương ứng trong trình tự bố mẹ nhưng tuy nhiên kháng thể vẫn giữ chức năng gắn kết với Nrp1. Thay đổi như vậy thường sẽ không rộng và sẽ là những thay đổi bảo toàn. Thông thường, ít nhất 75% các gốc của kháng thể được làm giống như của người sẽ tương ứng với các gốc của các trình tự CDR nhập khẩu và FR liên ứng hoặc dòng mầm của bố mẹ, thông thường hơn là ít nhất 90%, và thông thường nhất là lớn hơn 95%, hoặc lớn hơn 98% hoặc lớn hơn 99%.

Các gốc globulin miễn dịch ảnh hưởng đến giao diện giữa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ("giao diện  $V_L$ - $V_H$ ") 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 đánh số được nêu trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). Patent Mỹ số 6,407,213 cũng thảo luận rằng các gốc như các gốc  $V_L$  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 dưới 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 globulin miễn dịch của một loài cụ thể hoặc của nhiều loài. Trình tự, cấu trúc hoặc kháng thể "liên ứng" được hiểu là bao gồm trình tự liên ứng của người như được mô tả trong các phương án nhất định, và để chỉ trình tự axit amin bao gồm các gốc axit amin tồn tại thường xuyên nhất ở mỗi vị trí trong tất cả các globulin miễn dịch người thuộc

loại, isotyp, hoặc cấu trúc dưới đơn vị cụ thể bất kỳ. Do đó, trình tự liên ứng chứa trình tự axit amin có ở mỗi vị trí một axit amin có mặt trong một hoặc nhiều globulin miễn dịch đã biết, nhưng có thể không nhân đôi chính xác toàn bộ trình tự axit amin của globulin miễn dịch riêng lẻ bất kỳ. Trình tự liên ứng vùng biến đổi không thu được từ globulin miễn dịch hoặc kháng thể được sản xuất tự nhiên bất kỳ. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., and variants thereof. Các FR của trình tự liên ứng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và các biến thể của chúng, tạo ra các trình tự hữu ích cho việc điều chế các kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người. Ví dụ, xem patent Mỹ số 6,037,454 và 6,054,297.

Các trình tự dòng mầm của người được thấy trong tự nhiên ở quần thể người. Tổ hợp của các gen dòng mầm đó tạo thành tính đa dạng kháng thể. Các trình tự kháng thể dòng mầm cho chuỗi nhẹ của kháng thể đến từ gen j và gen v kappa hoặc lambda dòng mầm được bảo toàn của người. Tương tự, các trình tự chuỗi nặng đến từ các gen v, d và j dòng mầm (LeFranc, M-P, và LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể đã được nhận dạng và tách và/hoặc thu hồi từ thành phần trong môi trường tự nhiên của nó. Các thành phần nhiễm tạp trong môi trường tự nhiên của kháng thể là các vật liệu mà có thể cản trở việc ứng dụng kháng thể trong chẩn đoán hoặc điều trị, và có thể là các enzym, hormon, hoặc các chất hòa tan có bản chất protein hoặc không protein. Theo một khía cạnh, kháng thể sẽ được tinh chế để phân lập ít nhất là trên 95% trọng 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, hiệu suất kháng thể dùng để chỉ khả năng của kháng thể trong việc ngăn ngừa sự sụp đổ khung tế bào trong các tế bào vôong mạc. Sự thay đổi trình tự axit amin của kháng thể có thể ảnh hưởng đến các đặc tính của kháng thể như gấp nếp, và có thể ảnh hưởng đến các yếu tố vật lý như tốc độ ban đầu của sự gắn kết kháng thể với kháng nguyên ( $k_a$ ), hằng số phân ly của kháng thể khỏi kháng nguyên ( $k_d$ ), hằng số ái lực của kháng thể đối với 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, đề cập đến hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con là giống nhau hoặc có mức phần trăm đã định các nucleotit hoặc các gốc axit amin giống nhau, khi được so sánh và sắp xếp thẳng hàng để có sự tương ứng tối đa. Để xác định phần trăm tương đồng, các trình tự được sắp xếp thẳng hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào trong trình tự của trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ nhất để sắp xếp thẳng hàng tối ưu với trình tự axit amin hoặc axit nucleic thứ hai). Các gốc axit amin hoặc các nucleotit tại các vị trí axit amin hoặc các vị trí nucleotit tương ứng sau đó được so sánh. Khi một vị trí trong trình tự thứ nhất được chiếm chỗ bởi gốc axit amin hoặc nucleotit giống như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, thì các phân tử là 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, thì các trình tự dẫn đầu và/hoặc các trình tự của miền hằng 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 khác 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 sắp xếp thẳng hàng trình tự protein có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán CLUSTAL W, như được mô tả bởi Higgins et al., 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402.

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

Thuật ngữ "động vật có vú" đối với các mục đích điều trị chỉ động vật được phân loại vào động vật có vú, bao gồm người, động vật nuôi trong nhà và ở trang trại,

và động vật trong vườn thú, động vật thể thao, hoặc thú nuôi, như chó, ngựa, mèo, bò, và các động vật tương tự. Tốt hơn, nếu động vật có vú là người.

“Bệnh” hoặc “rối loạn”, như được sử dụng ở đây, là tình trạng bệnh lý bất kỳ có lợi khi điều trị bằng kháng thể kháng NrplA được làm giống như của người 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 ý nghĩa bình thường của nó trong lĩnh vực này và dùng để chỉ việc đưa kháng thể kháng NrplA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó vào thủy tinh thể của bệnh nhân.

Thuật ngữ “sử dụng dưới da” dùng để chỉ việc đưa kháng thể kháng NrplA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó vào dưới da của đối tượng bị bệnh là động vật hoặc người, tốt hơn là vào trong túi nằm giữa da và mô bên dưới, bằng cách phân phối tương đối chậm, duy trì từ đồ chứa thuốc. Véo hoặc kéo da lên và ra khỏi mô bên dưới có thể tạo ra túi này.

Thuật ngữ “truyền dưới da” dùng để chỉ việc đưa thuốc vào dưới da của đối tượng bị bệnh là động vật hoặc người, tốt hơn là trong túi nằm giữa da và mô bên dưới, bằng cách phân phối tương đối chậm, duy trì từ đồ chứa thuốc trong một khoảng thời gian bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 30 phút hoặc ngắn hơn, hoặc 90 phút hoặc ngắn 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 một khía cạnh khác nữa, việc sử dụng là trong túi nằm giữa da và mô bên dưới, nơi túi có thể được tạo ra bằng cách véo hoặc kéo da lên và ra khỏi mô bên dưới.

Thuật ngữ "lượng có hiệu lực điều trị" được sử dụng để chỉ lượng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà sẽ làm thuyên giảm hoặc giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn được điều trị. Đó là lượng mà có kết quả có lợi cho bệnh nhân. Hiệu quả có thể được xác định theo những cách thông thường, tùy thuộc vào tình trạng được điều trị. Ví dụ, trong các bệnh hoặc các rối loạn về mắt/võng mạc đặc trưng bởi các tế bào biểu hiện Nrp1A, hiệu quả có thể được xác định bằng cách xác định tỷ lệ đáp ứng, ví dụ, phục hồi thị lực hoặc bằng cách đánh giá thời gian trì hoãn cho đến khi bệnh tiến triển.

Các thuật ngữ "điều trị" và "trị liệu" và tương tự, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là bao gồm các biện pháp điều trị cũng như phòng ngừa, hoặc các biện pháp ức chế đối với bệnh hoặc rối loạn dẫn đến tác dụng lâm sàng mong muốn hoặc có lợi bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở việc giảm bớt hoặc thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng, sự thoái lui, làm chậm hoặc chấm dứt tiến triển của bệnh hoặc rối loạn. Do đó, ví dụ, thuật ngữ điều trị bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó trước hoặc sau khi khởi phát triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn nhờ đó ngăn ngừa hoặc loại bỏ một hoặc nhiều dấu hiệu của bệnh hoặc rối loạn. Một ví dụ khác là, thuật ngữ này bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn 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 sử dụng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn 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 thuyên giảm bệnh hay không, bao gồm "điều trị" hoặc "trị liệu" như được sử dụng ở đây. Ngoài ra, miễn là các chế phẩm của sáng chế ở dạng riêng lẻ hoặc kết hợp với tác nhân điều trị khác làm thuyên giảm 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 Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, 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 "tò rời trong bao gói" được sử dụng để chỉ hướng dẫn thường được bao gồm trong các gói sản phẩm điều trị trên thị trường, có chứa thông tin về chỉ định,

cách sử dụng, đường dùng, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo về việc sử dụng các sản phẩm điều trị đó.

#### Kháng thể theo sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó. Tốt hơn là, kháng thể này là kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người, tốt hơn nữa là kháng thể kháng Nrp1A đơn dòng được làm giống như của người.

Trong việc mô tả đặc trưng ban đầu, thư viện các kháng thể hướng đích các biến thể Nrp1A được tạo ra bằng cách đặt các CDR của các kháng thể chuột hoặc các kháng thể người thu được từ thư viện thực khuẩn thể vào các FR của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ liên ứng của người và tiếp theo bằng cách xử lý các FR với các thay đổi khác nhau.

Điều này dẫn đến kháng thể được làm giống như của người được định hướng kháng Nrp1A với các tính chất tăng cường như được bộc lộ ở đây. Các trình tự của các kháng thể theo sáng chế được thể hiện trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1:

| Tên    | Trình tự axit amin | SEQ ID NO    |
|--------|--------------------|--------------|
| HCDR 1 | GFTFSSYAMS         | SEQ ID NO: 1 |
| HCDR 2 | SISRTGYTYAESVKG    | SEQ ID NO: 2 |
| HCDR 3 | VGTAFDY            | SEQ ID NO: 3 |
| LCDR 1 | RASQSISSYLN        | SEQ ID NO: 4 |
| LCDR 2 | AASSLQS            | SEQ ID NO: 5 |

|                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                  |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| LCDR<br>3                | QQSYSTPLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | SEQ ID NO:<br>6  |
| VH –<br>biển<br>thể 1    | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDESKQT<br>LYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVTV<br>SS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO:<br>10 |
| VL –<br>biển<br>thể a    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK<br>PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ<br>PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | SEQ ID NO:<br>11 |
| VH –<br>biển<br>thể 2    | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDDSKN<br>TLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVT<br>VSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO:<br>12 |
| VH –<br>biển<br>thể 3    | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDDSKQ<br>TLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVT<br>VSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO:<br>13 |
| VH-<br>biển<br>thể 4     | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDDSKN<br>TLYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVT<br>VSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO:<br>14 |
| VH-<br>biển<br>thể 5     | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDESKNT<br>LYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVTV<br>SS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO:<br>15 |
| VH-<br>biển<br>thể 6     | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDDSKQ<br>TLYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVT<br>VSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO:<br>16 |
| VH-<br>biển<br>thể 7     | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDESKNT<br>LYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVTV<br>SS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | SEQ ID NO:<br>17 |
| Chuỗi<br>nặng-<br>Dòng I | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESA VKGRFTISRDESKQT<br>LYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTA FDYWGQGTLVTV<br>SSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV<br>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS<br>LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPC<br>PAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS<br>HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<br>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW<br>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | SEQ ID NO:<br>18 |

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                  |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Chuỗi<br>nhẹ-<br>Dòng I     | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK<br>PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ<br>PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                            | SEQ ID NO:<br>19 |
| Chuỗi<br>nặng -<br>Dòng II  | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAAESVKGRFTISRDDSKN<br>TLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGTAFDYWGQGTLLT<br>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP<br>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG<br>NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG | SEQ ID NO:<br>20 |
| Chuỗi<br>nhẹ –<br>Dòng III  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK<br>PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ<br>PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                            | SEQ ID NO:<br>19 |
| Chuỗi<br>nặng -<br>Dòng III | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAAESVKGRFTISRDDSKQ<br>TLYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGTAFDYWGQGTLLT<br>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP<br>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG<br>NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG | SEQ ID NO:<br>21 |
| Chuỗi<br>nhẹ –<br>Dòng IV   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK<br>PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ<br>PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                            | SEQ ID NO:<br>19 |

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                  |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Chuỗi<br>nặng -<br>Dòng<br>IV | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAAESVKGRFTISRDDSKN<br>TLYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTAFDYWGQGTLLVT<br>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP<br>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG<br>NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | SEQ ID<br>NO:22  |
| Chuỗi<br>nhẹ –<br>Dòng<br>V   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK<br>PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ<br>PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                  | SEQ ID NO:<br>19 |
| Chuỗi<br>nặng -<br>Dòng<br>V  | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAAESVKGRFTISRDESKNT<br>LYLQMNSLKTEDTAVYYCARVGTAFDYWGQGTLLVT<br>SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV<br>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP<br>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSV<br>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP<br>REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW<br>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ<br>GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | SEQ ID NO:<br>23 |
| Chuỗi<br>nhẹ –<br>Dòng<br>VI  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK<br>PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ<br>PEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA<br>CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                  | SEQ ID NO:<br>19 |
| Chuỗi<br>nặng -<br>Dòng<br>VI | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR<br>QAPGKGLEWVSSISRTGYTYAAESVKGRFTISRDDSKQ<br>TLYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTAFDYWGQGTLLVT<br>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP<br>APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG<br>NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | SEQ ID NO:<br>24 |

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |               |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Chuỗi nhẹ – Dòng VII  | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                        | SEQ ID NO: 19 |
| Chuỗi nặng - Dòng VII | EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISRTGYTYAESVKGRFTISRDESKNTLYLQMQLSKTEDTAVYYCARVGTAFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG | SEQ ID NO: 25 |

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng 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 của chuỗi nhẹ 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 phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng 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: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, hoặc SEQ ID NO: 17; và

- vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 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.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, hoặc SEQ ID NO: 17 và
- vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

Theo phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11;
- b. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 11;
- c. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 11;
- d. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và SEQ ID NO: 11;
- e. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 11;
- f. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và SEQ ID NO: 11; hoặc
- g. chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi lần lượt gồm các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- chuỗi nặng gồm, tốt hơn là chỉ bao gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25; và
- chuỗi nhẹ gồm, tốt hơn là chỉ bao gồm, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

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

- a. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể này được đề cập là “dòng I”;
- b. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể này được đề cập là “dòng II”;
- c. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể này được đề cập là “dòng III”;
- d. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể này được đề cập là “dòng IV”;
- e. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể này được đề cập là “dòng V”;
- f. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể này được đề cập là “dòng VI”;
- hoặc
- g. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, kháng thể này được đề cập là “dòng VII”.

Các thể đột biến IgG1-KO đã được tạo ra bằng cách đưa các đoạn đột biến vào trong vùng Fc. Các đoạn đột biến để giảm hoặc ức chế các chức năng tác động đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được bộc lộ rõ trong lĩnh vực này, ví dụ, trong Wang et al, Protein Cell 2018, 9(1):63–73 và Stewart et al. Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2014, 2:29. Điển hình là, danh sách không

giới hạn về các đoạn đột biến được đưa vào trong vùng Fc của IgG1 để giảm chức năng 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 trong vùng Fc để giảm chức năng tác động.

CDR được bộc lộ ở đây và được mô tả trong SEQ ID NO: 1 đến 6 được trình bày theo CCG (Chemical Computing Group như được minh họa trong Almagro et al., Proteins 2011; 79:3050-3066 và Maier et al, Proteins 2014; 82:1599-1610) trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

| CDR   | Trình tự CCG    | Vị trí CCG | SEQ ID NO: |
|-------|-----------------|------------|------------|
| HCDR1 | GFTFSSYAMS      | 26-35      | 1          |
| HCDR2 | SISRTGYTYAESVKG | 50-65      | 2          |
| HCDR3 | VGTAFDY         | 98-104     | 3          |
| LCDR1 | RASQSISSYLN     | 24-34      | 4          |
| LCDR2 | AASSLQS         | 50-56      | 5          |
| LCDR3 | QQSYSTPLT       | 89-97      | 6          |

Hệ thống đánh số bổ sung dựa trên việc đánh số Kabat được tổng kết trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3:

| CDR   | Trình tự Kabat  | Vị trí Kabat | SEQ ID NO: |
|-------|-----------------|--------------|------------|
| HCDR1 | SYAMS           | 31-35        | 7          |
| HCDR2 | SISRTGYTYAESVKG | 50-65        | 2          |

|       |             |        |   |
|-------|-------------|--------|---|
| HCDR3 | VGTAFDY     | 98-104 | 3 |
| LCDR1 | RASQSISSYLN | 24-34  | 4 |
| LCDR2 | AASSLQS     | 50-56  | 5 |
| LCDR3 | QQSYSTPLT   | 89-97  | 6 |

Hệ thống đánh số bổ sung dựa trên Chothia được trình bày trong bảng 4 dưới đây.

Bảng 4:

| CDR   | Trình tự Chothia | Vị trí Chothia | SEQ ID NO: |
|-------|------------------|----------------|------------|
| HCDR1 | GFTFSSY          | 26-32          | 8          |
| HCDR2 | SRTGY            | 51-57          | 9          |
| HCDR3 | VGTAFDY          | 98-104         | 3          |
| LCDR1 | RASQSISSYLN      | 24-34          | 4          |
| LCDR2 | AASSLQS          | 50-56          | 5          |
| LCDR3 | QQSYSTPLT        | 89-97          | 6          |

Do đó, theo khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- vùng biến đổi của chuỗi nặng 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 của chuỗi nhẹ chứa 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); hoặc
- vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 7 (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 của chuỗi nhẹ 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); hoặc

- vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 8 (H-CDR1); trình tự axit amin của SEQ ID NO: 9 (H-CDR2); và trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 (H-CDR3), và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa 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).

Kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế gắn kết với Nrp1A của người với ái lực cao. Theo một phương án liên quan đến khía cạnh này, kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế gắn kết với Nrp1A của người ở  $K_D < 50$  nM. Theo phương án khác, kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế gắn kết với Nrp1A của người ở  $K_D < 15$  nM, như được minh họa trong ví dụ 8.

Kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế còn gắn kết với Nrp1A của khỉ, Nrp1A của chuột nhắt, Nrp1A của chuột cống và Nrp1A của chuột nhảy.

Ái lực gắn kết cao của kháng thể theo sáng chế góp phần kéo dài thời gian trung hòa Nrp1A sau khi tiêm nội nhãn và còn cho phép giảm tần suất tiêm. Ái lực gắn kết cao hơn còn cho phép việc dùng liều thấp hơn, hạn chế các tác dụng phụ tiềm năng. Ái lực gắn kết được cải thiện và tần suất tiêm được giảm làm cải thiện đáng kể hiệu lực điều trị đối với bệnh nhân cần điều trị. Nó cũng tạo ra các lợi ích có giá trị cho bệnh nhân, đặc biệt là cải thiện sự tuân thủ theo việc dùng thuốc.

Kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế ngăn ngừa sự sụp đổ khung tế bào cảm ứng bởi Sema3A trong các tế bào võng mạc với hiệu lực chức năng nhỏ hơn 130 pM, tốt hơn là nhỏ hơn 110 pM, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 100 pM. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể kháng Nrp1 theo sáng chế ngăn ngừa sự sụp đổ khung tế bào cảm ứng bởi Sema3A trong các tế bào võng mạc với hiệu lực chức năng là 98 pM, như được minh họa trong ví dụ 4. Kết quả này chứng minh hiệu lực của kháng thể theo sáng chế trong việc ức chế sự đẩy mạch cảm ứng bởi Sema3A.

Kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế còn ức chế khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A với hiệu lực chức năng nhỏ hơn 4 nM, tốt hơn là nhỏ hơn 3 nM, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 1 nM. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế ngăn ngừa sự mất tính toàn vẹn của tế bào võng mạc cảm ứng bởi VEGF với hiệu lực chức năng là 0,74 nM, như được minh họa trong ví dụ

5. Kết quả này chứng minh hiệu lực của kháng thể theo sáng chế trong việc ức chế khả năng thâm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế được chứng minh là có nguy cơ sinh miễn dịch thấp như được mô tả trong ví dụ 9. Điều này dựa vào dự đoán *in silico* về khả năng sinh miễn dịch của kháng thể. Nguy cơ sinh miễn dịch thường được đánh giá bằng nhiều phương pháp khác nhau đã được biết rõ như bằng thuật toán máy tính để dự đoán các epitop tế bào T, yếu tố ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch chính. Thực vậy, đã có báo cáo rằng các trình tự chứa các epitop tế bào T có trong các protein quan tâm có thể được dự đoán bằng cách sử dụng thuật toán dựa trên phương pháp ma trận tính toán, có sẵn dưới tên EpiMatrix (được sản xuất bởi EpiVax). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tham khảo 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.

Kháng thể theo sáng chế khác với các phương pháp trị liệu dựa vào việc hướng đích Sema3. Thực vậy, kháng thể theo sáng chế ức chế khả năng thâm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF, tốt hơn là VEGF-A, trong khi tác dụng này không được thấy ở các hợp chất hướng đích Sema3A. Do đó, phương pháp trị liệu kháng Nrp1A dựa trên kháng thể theo sáng chế có ưu điểm là:

- ức chế tác dụng đẩy mạch của Sema3A;
- ức chế khả năng thâm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi Sema3A; và
- ức chế khả năng thâm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Kháng thể theo sáng chế khác với các phương pháp trị liệu dựa vào việc sự ức chế VEGF. Thực vậy, kháng thể theo sáng chế ức chế sự gắn kết của Sema3A với Nrp1, dẫn đến sự ức chế đẩy mạch cảm ứng bởi Sema3A, cuối cùng là dẫn đến sự cải thiện sự tái phân phối mạch đặc biệt là ở các bệnh nhân bị DMI.

Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã so sánh hiệu lực của kháng thể theo sáng chế với Avastin®, Eylea® và Lucentis®, cùng với những chất khác, trong thử nghiệm mất tính toàn vẹn của tế bào cảm ứng bởi VEGF như được minh họa trong ví dụ 5. Tất cả

các chất Avastin®, Eylea® và Lucentis® đều hướng đích VEGF, trong khi kháng thể theo sáng chế chỉ hướng đích miền A của Nrp1. Đáng chú ý là, hiệu lực của kháng thể theo sáng chế trong thử nghiệm mất tính toàn vẹn của tế bào cảm ứng bởi VEGF là tương tự với hiệu lực của Avastin® và Eylea®, và tốt hơn hiệu lực của Lucentis®. Do đó, các tác giả sáng chế đã phát triển kháng thể mà:

- ngăn ngừa sự gắn kết của Nrp1 và Sema3A, nhờ đó ức chế sự đẩy mạch và sự cảm ứng khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc bởi Sema3A, và
- tác động một cách bất ngờ đến khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế thể hiện nhiều đặc tính có lợi hơn so với các kháng thể hoặc các đoạn khác mà hướng đích Nrp1 như được nêu trong lĩnh vực này và được mô tả ở đây trong ví dụ 3. Các kháng thể khác này hướng đích các epitop khác nhau trên Nrp1. Các tác giả sáng chế đã so sánh các đặc tính của kháng thể theo sáng chế và:

- kháng thể được định hướng kháng miền A của Nrp1 (YW64.3); và
- kháng thể được định hướng kháng miền B của Nrp1 (YW107.4.87).

Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế là hiệu quả trong thử nghiệm sụp đổ khung tế bào cảm ứng bởi Sema3A, trong khi đó YW107.4.87 không có hiệu quả (ví dụ 4). Các kết quả này chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế ức chế sự đẩy mạch cảm ứng bởi Sema3A, dẫn đến các đặc tính được cải thiện đối với sự tái phân phối mạch, đặc biệt là ở các bệnh nhân bị DMI.

Các tác giả sáng chế còn chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế có độ ổn định nhiệt được cải thiện so với YW64.3, như được đo bởi DSC (ví dụ 11). Các kết quả này chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế vẫn giữ cấu trúc riêng và hoạt động của nó ở nhiệt độ sinh lý. Đáng chú ý là, điểm giữa chuyển tiếp nhiệt ( $T_m$ ) cao hơn sẽ phản ánh độ ổn định được cải thiện của protein ở nhiệt độ thấp hơn. Do đó, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế thể hiện đặc tính độ ổn định nhiệt được cải thiện góp phần vào việc cải thiện hiệu lực trị liệu trong khi cho phép

giảm liều và tần suất tiêm cho bệnh nhân. Ngoài ra,  $T_m$  là dấu hiệu chỉ báo thời hạn sử dụng dài hơn và độ ổn định được cải thiện trong thời hạn sử dụng sản phẩm trị liệu.

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

Các kháng thể kháng Nrp1A biến thể khác và các đoạn kháng thể có thể được xử lý dựa trên tập hợp các CDR được nhận diện dưới các trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 1 đến 6. Cần phải hiểu rằng trong các kháng thể kháng Nrp1A biến thể và các đoạn kháng thể nói trên, trình tự axit amin của các CDR vẫn không thay đổi nhưng các vùng xung quanh, ví dụ, các vùng FR có thể được xử lý. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể kháng Nrp1A có thể được điều chế bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào ADN của kháng thể kháng Nrp1A này, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các biến thể như vậy bao gồm, ví dụ, sự xóa bỏ khỏi, và/hoặc sự chèn vào và/hoặc sự thay thế, các gốc trong các trình tự axit amin của các kháng thể kháng Nrp1A theo các ví dụ ở đây. Sự tổ hợp của xóa bỏ, chèn, và thay thế bất kỳ được tạo ra để đạt được cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn. Các thay đổi axit amin cũng có thể làm thay đổi các quá trình sau dịch mã của kháng thể kháng Nrp1A biến đổi hoặc được làm giống như của người, chẳng hạn như thay đổi số lượng hoặc vị trí của các vị trí glycosyl hóa.

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

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 Nrp1A được mô tả ở đây. Các phân tử axit nucleic mã hóa các biến thể trình tự axit amin của kháng thể kháng Nrp1A được điều chế bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp các biến thể trình tự axit amin tồn tại trong tự nhiên) hoặc điều chế bằng cách gây đột biến qua trung gian oligonucleotit (hoặc hướng vào vị trí), đột biến PCR, và đột biến catxet biến thể được điều chế trước đó hoặc phiên bản không phải biến thể của kháng thể kháng Nrp1A.

Theo một số phương án, kháng thể kháng NrplA là một đoạn kháng thể. Có những kỹ thuật đã được phát triển để sản xuất các đoạn kháng thể. Các đoạn có thể được tạo ra thông qua quá trình phân giải protein của 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). Ngoài ra, các đoạn này có thể được tạo ra trực tiếp trong các tế bào chủ tái tổ hợp. Ví dụ, các đoạn Fab'-SH có thể được thu hồi trực tiếp từ *E. coli* và kết hợp hóa học để tạo thành các đoạn  $F(ab')_2$  (xem, ví dụ, Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167). Bằng cách tiếp cận khác, các đoạn  $F(ab')_2$  có thể được phân lập trực tiếp từ nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Các kỹ thuật khác để sản xuất các đoạn kháng thể sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

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

Theo một số phương án, có thể mong muốn sử dụng đoạn kháng thể kháng NrplA, chứ không phải là kháng thể nguyên vẹn. Có thể mong muốn cải biến đoạn kháng thể để tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của nó. Điều này có thể đạt được, ví dụ, bằng cách kết hợp epitop gắn kết thụ thể cứu hộ vào đoạn kháng thể. Theo một phương pháp, vùng thích hợp của đoạn kháng thể có thể được cải biến (ví dụ, bị đột biến), hoặc epitop có thể được kết hợp vào thể peptit mà sau đó được dung hợp với đoạn kháng thể ở đầu hoặc ở giữa, ví dụ, bằng cách tổng hợp ADN hoặc peptit. Xem, ví dụ, WO 96/32478.

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm các cải biến cộng hóa trị của kháng thể kháng NrplA. Các cải biến cộng hóa trị bao gồm cải biến gốc xysteiny, gốc histidyl, gốc lysinyl và gốc đầu tận cùng amino, gốc arginyl, gốc tyrosyl, nhóm bên carboxyl (aspartyl hoặc glutamyl), gốc glutaminyl và asparaginyl, hoặc gốc seryl, hoặc threonyl. Dạng cải biến cộng hóa trị khác bao gồm việc kết hợp bằng cách hóa học hoặc enzym các glycosit với kháng thể. Những cải biến như vậy có thể được thực hiện bằng tổng hợp hóa học hoặc sự phân cắt hóa học hoặc bằng enzym đối với kháng thể này, nếu có. Các dạng cải biến cộng hóa trị khác của kháng thể có thể được đưa vào phân tử bằng cách cho các gốc axit amin được nhắm đích của kháng thể phản ứng với

chất tạo dẫn xuất hữu cơ có khả năng phản ứng với các chuỗi bên được chọn hoặc các gốc đầu tận cùng amino hoặc carboxy.

Việc loại bỏ các nhóm hydrat cacbon bất kỳ có trên kháng thể có thể được thực hiện theo cách hóa học hoặc enzym. Quá trình khử glycosyl bằng 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. Có thể đạt được sự phân cắt các nhóm hydrat cacbon bằng enzym trên kháng thể bằng cách sử dụng nhiều loại nội và ngoại glycosidaza như được mô tả bởi Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol 138:350.

Dạng cải biến cộng hóa trị hữu ích khác bao gồm gắn kết kháng thể với một trong nhiều loại polyme không chứa protein, ví dụ, polyetylen glycol, polypropylen glycol, hoặc các polyoxyalkylen, theo cách được nêu trong một hoặc nhiều patent Mỹ số 4,640,835; Patent Mỹ số 4,496,689; Patent Mỹ số 4,301,144; Patent Mỹ số 4,670,417; Patent Mỹ số 4,791,192 và Patent Mỹ số 4,179,337.

#### Sự gắn kết epitop

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến kháng thể mà nhận biết "epitop Nrp1A" đặc hiệu. Cụ thể là, kháng thể theo sáng chế gắn kết với epitop của Nrp1A của người như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin 68-77 của Nrp1A người như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó mà gắn kết với trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 27.

Các trình tự SEQ ID NO: 26 và 27 được mô tả trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5

| Tên             | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | SEQ ID NO: |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Nrp1A của người | MERGLPLLCA VLALVLAPAG AFRNDKCGDT IKIESPGYLT SPGYPHSYHP<br>SEKCEWLIQA PDPYQRIMIN FNPFDLEDR DCKYDYVEVF DGENENGHFR<br>GKFCGKIAPP PVVSSGPFLF IKFVSDYETH GAGFSIRYEI FKRGPESQON<br>YTPSGVIKS PGFPEKYPNS LECTYIVFAP KMSEIILEFE SFDLEPDSNP<br>PGGMFCRYDR LEIWDGFPDV GPHIGRYCGQ KTPGRIRSSS GILSMVFYTD<br>SAIAKEGFSA NYSVLQSSVS EDFKCMEALG MESGEIHSDQ ITASSQYSTN | 26         |

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                 | WSAERSRLNY PENGWTPGED SYREWIQVDL GLLRFVTAVG TQGAISKETK<br>KKYYVKTYKI DVSSNGEDWI TIKEGNKPVL FQGNTNPTDV VVAVFPKPLI<br>TRFVRIKPAT WETGISMRFE VYGCKITDYP CSGMLGMVSG LISDSQITSS<br>NQGDRNWMPE NIRLVTSRSG WALPPAPHSY INEWLQIDLG EEKIVRGI II<br>QGGKHRENKV FMRKFKIGYS NNGSDWKMIM DDSKRKAKSF EGNNNYDTPE<br>LRTFPALSTR FIRIYPERAT HGGLGLRMEL LGCEVEAPTA GPTTPNGNLV<br>DECDDDQANC HSGTGDDFQL TGGTTVLATE KPTVIDSTIQ SEFPTYGFNC<br>EFGWGSHKTF CHWEHDNHVQ LKWSVLTSKT GPIQDHTGDG NFIYSQADEN<br>QKGKVARLVS PVVYSQNSAH CMTFWYHMSG SHVGTLRVKL RYQKPEEYDQ<br>LVWMAIGHQG DHWKEGRVLL HKSLKLYQVI FEGEIGKGNL GGIAVDDISI<br>NNHISQEDCA KPADLDKKNP EIKIDETGST PGYEGEGEGD KNISRKPGNV<br>LKTLDPILIT IIAMSALGVL LGAVCGVVLY CACWHNGMSE RNLSALENYN<br>FELVDGVKLG KDKLNTQSTY SEA |    |
| Epitop<br>Nrp1A | MINFNPFDL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 27 |

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “epitop Nrp1A” dùng để chỉ phân tử (ví dụ, peptit) hoặc một đoạn phân tử có khả năng gắn kết với kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó. Các thuật ngữ này còn bao gồm, ví dụ, yếu tố quyết định kháng nguyên Nrp1A được nhận diện bởi kháng thể hoặc đoạn kháng thể bất kỳ theo sáng chế, mà có tổ hợp CDR chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được chọn từ các CDR chuỗi nặng có các trình tự SEQ ID NO: 1 đến 3 và các CDR chuỗi nhẹ có các trình tự SEQ ID NO: 4 đến 6.

Các epitop kháng nguyên Nrp1A có thể được bao gồm trong protein, các đoạn protein, peptit hoặc tương tự. Các epitop hầu hết là các protein, các oligopeptit ngắn, các dạng bất chức oligopeptit (tức là các hợp chất hữu cơ bất chức các đặc tính gắn kết kháng thể của kháng nguyên Nrp1) hoặc kết hợp của chúng.

Đã phát hiện ra rằng kháng thể theo sáng chế gắn kết với một epitop duy nhất của Nrp1A người. Tốt hơn là, kháng thể kháng Nrp1A nêu trên hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin trong các vùng axit amin 68-77 của miền ngoại bào của Nrp1A người, như được nêu trong SEQ ID NO: 26.

Trong ngữ cảnh gắn kết epitop, cụm từ “gắn kết trong các vùng axit amin X-Y...” có nghĩa là kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất một gốc axit amin, tốt hơn là tất cả các gốc axit amin, trong vùng axit amin được chỉ định trong trình tự.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 100% trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO: 27. Tốt hơn là, kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 27.

### Ứng dụng trị liệu

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng làm thuốc.

Như đã nêu, Sema3A là phối tử tự nhiên đối với NRP1. Chính xác hơn là, Sema3A gắn kết với miền A của Nrp1. Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng Semaphorin 3A được tiết ra bởi các tế bào hạch võng mạc thiếu oxy trong võng mạc thiếu máu cục bộ/không mạch và hoạt động như một tín hiệu đẩy mạch. Các tác giả sáng chế đã xác nhận rằng Sema3A thực chất đã đẩy lùi các mạch mới ra khỏi vùng thiếu máu cục bộ bằng cách cảm ứng sự sụp đổ khung tế bào ở các tế bào này, do đó ức chế sự tái sinh mạch của võng mạc và làm tăng cường sự tân tạo mạch tiền võng mạc bệnh lý.

Bằng cách hướng đích Nrp1, tốt hơn là miền A của Nrp1, kháng thể theo sáng chế ngăn ngừa sự gắn kết của Nrp1 và Sema3A. Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng việc điều biến tác động đẩy mạch bằng kháng thể Nrp1A làm gia tăng số lượng các tế bào đỉnh và chuyển hướng sự hình thành mạch đến các vùng thiếu máu cục bộ (ví dụ 6), như vùng không mạch ở hố thị giác mở rộng bệnh lý ở người bị thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường.

Ngoài việc ngăn ngừa sự gắn kết của miền A của Nrp1 và Sema3A, kháng thể theo sáng chế thể hiện đặc tính bất ngờ là ức chế khả năng thấm của võng mạc cảm ứng bởi VEGF, tốt hơn là VEGF-A. Như đã nêu trên, VEGF-A là phối tử tự nhiên đối với miền B của Nrp1. Kháng thể theo sáng chế hướng đích miền A của Nrp1 và không hướng đích một cách đặc hiệu sự gắn kết của Nrp1B và VEGF-A. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế đã quan sát rằng kháng thể theo sáng chế ức chế khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A. Không bị giới hạn bởi lý thuyết, tác giả sáng chế đã đưa ra giả thuyết rằng sự ức chế khả năng thấm của võng mạc cảm ứng

bởi VEGF-A của kháng thể kháng miền A của Nrp1, tốt hơn là của kháng thể theo sáng chế, là do sự can thiệp không gian vào phức hợp thụ thể toàn phần truyền tín hiệu bao gồm Nrp1, thụ thể VEGF 2 và các đồng thụ thể bổ sung.

VEGF-A được tiết ra bởi các tế bào hình sao thiếu oxy, trong số các loại khác. VEGF-A là yếu tố quan trọng trong việc phát triển cả DME và DR tăng sinh, làm thay đổi khả năng thấm mao mạch võng mạc bằng cách điều biến các phân tiếp hợp bám dính như VE-Cadherin hoặc các phân tiếp hợp chặt như các occludin. VEGF-A kích thích các tế bào nội mô để giải phóng các metalloproteinaza nền (matrix metalloproteinase -MMP) và yếu tố hoạt hóa plasminogen kiểu urokinaza, dẫn đến sự thoái hóa các màng cơ sở và làm cho tế bào có thể di chuyển.

Do đó, sự tiết của VEGF-A trong điều kiện thiếu oxy là yếu tố làm trầm trọng thêm vì nó góp phần vào khả năng thấm của võng mạc, làm tình trạng phù hoàng điểm trở nên xấu đi. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng cả Sema3A và VEGF-A đều thúc đẩy khả năng thấm của mạch bằng cách gắn kết với Nrp1, dẫn đến sự rò rỉ mạch, do đó góp phần vào sự phù hoàng điểm.

Các tác giả sáng chế đã hướng đến tình trạng bệnh lý này bằng cách phát triển các kháng thể hướng đích Nrp1A, mà đã chứng tỏ là rất hữu ích trong việc:

- chuyển hướng hình thành mạch tới các vùng thiếu máu cục bộ, để cải thiện sự tái phân phối mạch của võng mạc;
- ngăn ngừa sự tân tạo mạch bệnh lý của vùng thủy tinh thể;
- ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc do Sema3A gây ra; và
- ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc do VEGF-A gây ra.

Do đó, bằng cách kết hợp hai tác dụng bất ngờ, kháng thể theo sáng chế đã chứng minh là có lợi ích lớn trong việc:

- cải thiện sự tái phân phối mạch của vùng không mạch thiếu máu cục bộ, điển hình là ở võng mạc của các bệnh nhân bị PDR, đặc biệt là bị DME;
- ngăn ngừa sự rò rỉ mạch cảm ứng bởi sự tiết Sema3A, điển hình là ở các bệnh nhân bị PDR, đặc biệt là bị DME; và

- ngăn ngừa sự rò rỉ mạch cảm ứng bởi sự tiết VEGF-A, điển hình là ở các bệnh nhân bị PDR, đặc biệt là bị DME.

Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh về mắt hoặc võng mạc.

Đáng chú ý là kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự gắn kết của VEGF và Nrp1 như được minh họa trong ví dụ 12. Kháng thể theo sáng chế không ảnh hưởng đến sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF (vì kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự tăng sinh tế bào nội mô cảm ứng bởi VEGF-A) và chỉ tác động đến khả năng thấm của võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Các tác giả sáng chế đã chứng minh thực chất rằng kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự tăng sinh tế bào nội mô như được minh họa trong ví dụ 13. Các tác giả sáng chế còn chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế không tác động đến sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF trong thử nghiệm hình thành mạng cảm ứng bởi VEGF (ví dụ 14), cũng như sự tân tạo mạch màng mạch cảm ứng bởi laze (ví dụ 15). Do đó, các tác giả sáng chế đã xác nhận rằng kháng thể theo sáng chế không ức chế sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF-A.

Như được giải thích trong phần mô tả sáng chế, kháng thể theo sáng chế ức chế tác dụng đẩy mạch của Sema3A, do đó cho phép chuyển hướng sự hình thành mạch đến các vùng thiếu máu cục bộ. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi cả Sema3A và VEGF-A. Mặc dù tác dụng ức chế của nó đối với khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A, kháng thể theo sáng chế bất ngờ là lại không có tác dụng đối với sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF-A.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự tái phân phối mạch. Do đó nó sẽ không cản trở sự hình thành mạch của các vùng thiếu máu cục bộ. Do đó, kháng thể theo sáng chế là cực kỳ hữu ích trong trường hợp lâm sàng mà sự tái phân phối mạch cần được thúc đẩy, ví dụ để cải thiện sự tái phân phối mạch của vùng không mạch thiếu máu cục bộ, điển hình là ở võng mạc của các bệnh nhân bị PDR, đặc biệt là bị DMI.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sử dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh vồng mạc, bệnh vồng mạc tăng sinh như bệnh vồng mạc ở trẻ sinh non, bệnh vồng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh vồng mạc tiểu đường bao gồm bệnh vồng mạc tiểu đường tăng sinh và bệnh vồng mạc tiểu đường không tăng sinh, bệnh phù hoàng điểm do tiểu đường, bệnh thiếu máu hoàng điểm do tiểu đường, thoái hóa hoàng điểm liên quan đến tuổi tác, viêm vồng mạc sắc tố, loạn dưỡng vồng mạc di truyền, thoái hóa do cận thị, tắc nghẽn tĩnh mạch vồng mạc, tắc nghẽn động mạch vồng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng mạch nhỏ, phù hoàng điểm dạng nang, bệnh màng tân mạch màng mạch thứ phát đối với bệnh vồng mạc bất kỳ, bệnh thần kinh thị giác, bệnh cườm nước, bong vồng mạc, bệnh vồng mạc do chất độc, bệnh vồng mạc do bức xạ, bệnh vồng mạc do chấn thương, bệnh mạch máu vồng mạc do thuốc, tân tạo mạch vồng mạc, bệnh mạch máu màng mạch dạng polyp, bệnh viêm mạch vồng mạc, phình mao mạch vồng mạc, loạn dưỡng Fuch, giãn mao mạch hoàng điểm, hội chứng Usher, và bệnh Stargardt.

Kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh vồng mạc tiểu đường bao gồm bệnh vồng mạc tiểu đường tăng sinh và bệnh vồng mạc tiểu đường không tăng sinh, bệnh vồng mạc thiếu máu cục bộ, phù hoàng điểm do tiểu đường, thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường, phù hoàng điểm liên quan đến tuổi tác, tân tạo mạch vồng mạc và tân tạo mạch màng mạch.

Theo phương án được ưu tiên, bệnh nêu trên là thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường và kháng thể theo sáng chế thúc đẩy sự tái sinh mạch trong vồng mạc thiếu máu cục bộ (tái phân phối mạch) và ngăn ngừa sự tân tạo mạch bệnh lý của vùng thủy tinh thể của mắt.

Theo phương án được ưu tiên khác, bệnh nêu trên là phù hoàng điểm do tiểu đường và kháng thể theo sáng chế làm giảm khả năng thấm của hàng rào máu vồng mạc cảm ứng bởi Sema3A và VEGF-A.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để ức chế sự thoái triển mạch cảm ứng bởi Sema3A từ các vùng thiếu máu cục bộ, ức chế khả năng thấm của hàng rào máu vồng

mạch cảm ứng bởi Sema3A và ức chế khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Như được sử dụng ở đây, các diễn đạt “ức chế khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc (BRB)”, “ức chế khả năng thấm của võng mạc” và “ức chế khả năng thấm của mạch”, có thể được sử dụng thay thế nhau và được dùng để chỉ sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc có khả năng dẫn đến sự rò rỉ mạch. Sự rò rỉ mạch nêu trên một mặt có thể được cảm ứng bởi Sema3A và mặt khác bởi VEGF, tốt hơn là VEGF-A. Các tác giả sáng chế hiện đã phát triển kháng thể mà có thể ức chế khả năng thấm của BRB cảm ứng bởi Sema3A cũng như ức chế khả năng thấm của BRB cảm ứng bởi VEGF-A. Do đó, kháng thể theo sáng chế ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc, và ngăn ngừa sự mất tính toàn vẹn của tế bào võng mạc cảm ứng bởi Sema3A và/hoặc VEGF-A.

Theo khía cạnh được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế là hữu ích để điều trị bệnh phù hoàng điểm do tiểu đường (DME) và/hoặc thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường (DMI). Theo phương án được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế là hữu dụng để điều trị bệnh nhân bị DME và DMI. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị DMI như được xác định bởi sự mở rộng trên 15%, 20%, 25%, và tốt hơn là trên 30% vùng không mạch ở hố thị giác (foveal avascular zone - FAZ).

Sáng chế chứng tỏ cực kỳ hữu ích đối với các bệnh nhân bị DMI và DME vì kháng thể theo sáng chế ức chế khả năng thấm của võng mạc được cảm ứng bởi VEGF-A mà không tác động đến các tác dụng tiền sinh mạch mà VEGF-A có thể có đối với sự tái sinh mạch trong võng mạc thiếu máu cục bộ.

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

Kháng thể kháng NrplA hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng bằng đường thích hợp bất kỳ, bao gồm đường 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 NrplA được sử dụng thích hợp bằng cách truyền từng đợt, đặc biệt 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 ngăn ngừa hay mãn tính. Tốt hơn là kháng thể kháng Nrp1A được dùng bằng cách tiêm nội nhãn vào mắt.

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

Theo phương án được ưu tiên, khoảng liều kháng thể theo sáng chế có thể áp dụng cho một lần tiêm thường là từ 1 mg/mắt đến 10 mg/mắt, tốt hơn là từ 1,5 mg/mắt đến 5 mg/mắt, tốt hơn nữa là từ 2 mg/mắt đến 3 mg/mắt và thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 2,5 mg/mắt.

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

Chế phẩm kháng thể sẽ được bào chế, định lượng, và sử dụng theo cách phù hợp với thực hành y tế tốt. Các yếu tố cần xem xét trong bối cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể đang được điều trị, động vật có vú cụ thể đang được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối tác nhân, phương pháp sử dụng, phác đồ sử dụng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sĩ. “Liều 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 các bệnh của mắt hoặc võng mạc được hướng đích bằng 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 hữu hiệu của các tác nhân khác như vậy phụ thuộc vào lượng kháng thể kháng Nrp1A có trong công thức bào chế, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận ở trên. Các chất này thường được dùng với liều giống như và với các kiểu đường dùng như được sử dụng ở đây hoặc từ khoảng 1 đến 99% liều được dùng trên đây.

Phương pháp điều trị

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn bao gồm phương pháp bất kỳ để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở mắt hoặc ổ mắt ở bệnh nhân cần điều trị, phương pháp này bao gồm việc dùng kháng thể kháng Nrp1A 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 ức chế mạch của SemaA3. Tốt hơn là, sáng chế đề cập đến phương pháp nêu trên để cải thiện sự tái phân phối mạch của võng mạc.

Tốt hơn là, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở mắt hoặc võng mạc bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng một lượng có hiệu quả về mặt dược lý của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn là bệnh này bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh võng mạc, bệnh võng mạc tăng sinh như bệnh võng mạc ở trẻ sinh non, bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ, bệnh võng mạc tiểu đường bao gồm bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh và bệnh võng mạc tiểu đường không tăng sinh, bệnh phù hoàng điểm do tiểu đường, bệnh thiếu máu hoàng điểm do tiểu đường, thoái hóa hoàng điểm liên quan đến tuổi tác, viêm võng mạc sắc tố, loạn dưỡng võng mạc di truyền, thoái hóa do cận thị, tắc nghẽn tĩnh mạch võng mạc, tắc nghẽn động mạch võng mạc, viêm nội nhãn, viêm màng mạch nhỏ, phù hoàng điểm dạng nang, bệnh màng tân mạch màng mạch thứ phát đối với bệnh võng mạc bất kỳ, bệnh thần kinh thị giác, bệnh cườm nước, bong võng mạc, bệnh võng mạc do chất độc, bệnh võng mạc do bức xạ, bệnh võng mạc do chấn thương, bệnh mạch máu võng mạc do thuốc, tân tạo mạch võng mạc, bệnh mạch máu màng mạch dạng polyp, bệnh viêm mạch võng mạc, phình mao mạch võng mạc, loạn dưỡng Fuch, giãn mao mạch hoàng điểm, hội chứng Usher, và bệnh Stargardt. Tốt hơn nữa là, bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh võng mạc tiểu đường bao gồm bệnh võng mạc tiểu đường tăng sinh và bệnh võng mạc tiểu đường không tăng sinh, bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ, phù hoàng điểm do tiểu đường, thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường, phù hoàng điểm liên quan đến tuổi tác, tân tạo mạch võng mạc, bệnh cườm nước và tân tạo mạch màng mạch. Theo phương án được ưu tiên hơn nữa, bệnh này là phù hoàng điểm do tiểu đường và/hoặc thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường.

Tất cả các dấu hiệu kỹ thuật được mô tả ở đây đều có khả năng áp dụng cho phương pháp điều trị nêu trên.

## Dược phẩm và cách dùng

Chế phẩm chứa kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng cho đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh về mắt hoặc võng mạc. Sáng chế còn mô tả việc sử dụng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó để sản xuất thuốc để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh có liên quan đến Nrp1A. Thuật ngữ "đối tượng" như được sử dụng ở đây nghĩa là động vật có vú bất kỳ mà kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng cho, bao gồm, ví dụ, động vật có vú là người và không phải người, như động vật linh trưởng, loài gặm nhấm và chó. Các đối tượng được dự định cụ thể để điều trị bằng các phương pháp được mô tả trong tài liệu này bao gồm người. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn 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 phân phối kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó. Các phương pháp để đưa vào bao gồm nhưng không giới hạn ở, phương pháp dùng qua đường 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 Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách truyền, tiêm nhanh hoặc tiêm, và có thể được sử dụng cùng với các hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ. Theo các phương án được ưu tiên, việc sử dụng là bằng cách tiêm 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.

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

chứa nước hoặc nước muối loại được dụng vô khuẩn. Trường hợp được 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, được phẩm có thể được cung cấp dưới dạng một bộ kit được bao gồm (a) đồ chứa có chứa kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó ở dạng đông khô và (b) đồ chứa thứ hai có chứa chất pha loãng được dụng (ví dụ, nước vô trùng) để tiêm. Chất pha loãng được dụng có thể được sử dụng để hoàn nguyên hoặc pha loãng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn 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 được 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 Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó là hữu hiệu để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh về 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 được sử dụng tùy ý để giúp xác định khoảng liều lượng tối ưu. Liều chính xác được sử dụng trong chế phẩm phối chế cũng sẽ phụ thuộc vào đường dùng và giai đoạn rối loạn, và nên được quyết định theo phán đoán của bác sĩ và từng trường hợp của bệnh nhân. Các liều hữu hiệu có thể được ngoại suy từ các đường cong đáp ứng liều thu được từ các hệ thống thử nghiệm mô hình in vitro hoặc động vật.

Ví dụ, độc tính và hiệu quả điều trị của kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn kháng nguyên của nó có thể được xác định trong nuôi cấy tế bào hoặc động vật thí nghiệm bằng các quy trình được tiêu chuẩn để xác định ED<sub>50</sub> (liều có hiệu lực điều trị trong 50% quần thể). Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó thể hiện chỉ số điều trị lớn là được ưu tiên.

Số liệu thu được từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào và các nghiên cứu trên động vật có thể được sử dụng trong việc phối chế khoảng liều để sử dụng cho người. Liều lượng của kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó thường nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn bao gồm ED<sub>50</sub> với ít hoặc không có độc tính. Liều lượng này có thể thay đổi trong khoảng này tùy thuộc vào dạng liều lượng được sử dụng và cách dùng. Đối với kháng thể kháng Nrp1A bất kỳ hoặc đoạn gắn kết

kháng nguyên của nó được sử dụng trong phương pháp này, liệu có hiệu lực điều trị có thể được ước tính ban đầu từ các thử nghiệm nuôi cấy tế bào. Liệu có thể được phối chế trong các mô hình động vật để đạt được khoảng nồng độ trong huyết tương tuân 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 cách sắc ký lỏng hiệu năng cao, ELISA và phương pháp tương tự.

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

Theo một phương án, kháng thể kháng NrplA được dùng một lần 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 NrplA theo sáng chế được dùng một lần mỗi 3 tháng.

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

Kháng thể theo sáng chế có thể được phối chế ở các liều rất cao mà bao gồm, nhưng không giới hạn ở 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, hoặc 100 mg/ml. Tốt hơn là, các kháng thể theo sáng chế có thể được phối chế ở dạng chế phẩm lỏng có hàm lượng 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 NrplA được phối chế với đệm histidin 10 mM, sucroza 240 mM, 0,02% khối lượng/thể tích polysorbat 20 ở độ pH 5,5 với nồng độ protein cuối là 60 mg/mL.

Theo một số phương án, các được phẩm bao gồm kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó còn có thể chứa tác nhân trị liệu, được liên hợp hoặc không được liên hợp với tác nhân liên kết.

Đối với các phác đồ trị liệu cho việc sử dụng phối hợp, theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó được sử dụng đồng thời với một tác nhân trị liệu. Theo một phương án cụ thể khác, tác nhân trị liệu được sử dụng trước hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, ít nhất một giờ và đến vài tháng, ví dụ ít nhất một giờ, năm giờ, 12 giờ, một ngày, một tuần, một tháng hoặc ba tháng, trước hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó.

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

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế bao gồm các polynucleotit được phân lập chứa trình tự mã hóa kháng thể kháng Nrp1A, các vector và các tế bào chủ chứa các polynucleotit, và các kỹ thuật tái tổ hợp để sản xuất kháng thể. Các polynucleotit được phân lập có thể mã hóa dạng kháng thể kháng Nrp1A mong muốn bất kỳ, bao gồm, ví dụ, các kháng thể đơn dòng chiều dài đầy đủ, các đoạn Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, và Fv, các diabody, các kháng thể thẳng, các phân tử kháng thể đơn chuỗi, và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các đoạn kháng thể.

(Các) polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn hoặc chuỗi của nó có thể được dung hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa hoặc đối chứng, như đã biết trong lĩnh vực này, và có thể có trong vector biểu hiện hoặc tế bào chủ thích hợp như đã biết trong lĩnh vực này. Mỗi phân tử polynucleotit mã hóa các miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có thể được dung hợp độc lập với trình tự polynucleotit mã hóa miền hằng định, như miền hằng định của người, cho phép sản xuất các kháng thể nguyên vẹn. Ngoài ra, các polynucleotit, hoặc các phần của chúng, có thể được dung hợp với nhau, tạo ra khuôn mẫu để sản xuất kháng thể chuỗi đơn.

Để sản xuất tái tổ hợp, polynucleotit mã hóa kháng thể được lồng vào vector sao chép được 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 chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều thành phần sau: trình tự tín hiệu, điểm

khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, đoạn khởi đầu, và trình tự kết thúc phiên mã.

Các kháng thể kháng Nrp1A cũng có thể được sản xuất dưới dạng polypeptit dung hợp, trong đó kháng thể được dung hợp với polypeptit khác loại, như trình tự tín hiệu hoặc polypeptit khác có vị trí phân cắt cụ thể ở đầu amin của protein hoặc polypeptit thành thực. Trình tự tín hiệu khác loại được chọn thường là trình tự được nhận biết và xử lý (ví dụ, được phân cắt bởi peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Đối với các tế bào chủ nhân nguyên thủy không nhận biết và xử lý trình tự tín hiệu kháng thể kháng Nrp1A, trình tự tín hiệu có thể được thay thế bằng trình tự tín hiệu nhân nguyên thủy. Trình tự tín hiệu này có thể là, ví dụ, phosphatase kiềm, penicillinase, 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 invertase của nấm men (bao gồm các trình tự dẫn đầu yếu tố  $\alpha$  của *Saccharomyces* và *Kluyveromyces*), phosphatase axit, *C. albicans* glucoamylase, hoặc tín hiệu được mô tả trong WO90/13646. Trong các tế bào động vật có vú, các trình tự tín hiệu của động vật có vú cũng như các trình tự dẫn đầu tiết virus, ví dụ, tín hiệu herpes simplex gD, có thể được sử dụng. ADN cho vùng tiền chất như vậy được ghép với ADN mã hóa kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người trong khung đọc.

Vectơ biểu hiện và tách dòng chứa trình tự axit nucleic mà làm cho vectơ sao chép trong một hoặc nhiều tế bào chủ được chọn. Thông thường, trong các vectơ tách dòng, trình tự này là trình tự làm cho vectơ 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 plasmit pBR322 thích hợp đối với hầu hết các vi khuẩn gram âm, điểm khởi đầu sao chép 2- $\nu$ . của plasmit thích hợp đối với nấm men, và nhiều điểm khởi đầu sao chép của virus khác nhau (SV40, polyoma, adenovirus, VSV, và BPV) hữu dụng trong các vectơ tách dòng ở tế bào động vật có vú. Thông thường, thành phần điểm khởi đầu sao chép không cần đối với các vectơ biểu hiện động vật có vú (điểm khởi đầu sao chép SV40 thường có thể được dùng vì nó chứa đoạn khởi đầu sớm).

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

Một ví dụ về mục đích chọn lọc sử dụng thuốc để làm ngừng sự sinh trưởng của tế bào chủ. Các tế bào mà được biến nạp thành công với gen khác loại tạo ra protein kháng thuốc và do đó sống sót trong chế độ dinh dưỡng chọn lọc. Ví dụ về các phương pháp chọn lọc ưu thế sử dụng các thuốc neomycin, axit mycophenolic, và hygromycin. Các chất đánh dấu có thể chọn lọc phổ biến cho các tế bào động vật có vú là các chất cho phép xác định các tế bào có khả năng hấp thụ axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Nrp1A được làm giống như của người, như DHFR (dihydrofolat reductase), thymidine kinase, metallothionein-I và -II (như các gen metallothionein của động vật linh trưởng), adenosine deaminase, ornithine decarboxylase, và tương tự. Các tế bào được biến nạp với gen chọn lọc DHFR đầu tiên được nhận dạng bằng cách nuôi cấy tất cả các thể biến nạp trong môi trường nuôi cấy chứa 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 (Chinese hamster ovary-CHO) thiếu hoạt tính của DHFR (ví dụ, DG44).

Theo cách khác, các tế bào chủ (cụ thể là các tế bào chủ kiểu đại chứa DHFR nội sinh) được biến nạp hoặc cùng biến nạp với các trình tự ADN mã hóa kháng thể kháng Nrp1, protein DHFR kiểu đại, và chất đánh dấu chọn lọc khác như aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) có thể được chọn bằng cách nuôi tế bào trong môi trường chứa tác nhân chọn lọc đối với chất đánh dấu chọn lọc được như kháng sinh aminoglycosidic, ví dụ, kanamycin, neomycin, hoặc G418. Ví dụ, xem trong patent Mỹ số 4,965,199.

Khi việc sản xuất tái tổ hợp được thực hiện trong tế bào nấm men làm tế bào chủ, gen TRP1 có trong plasmit YRp7 của nấm men (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) có thể được sử dụng làm chất đánh dấu chọn lọc. Ví dụ, gen TRP1 tạo ra chất

đánh dấu chọn lọc cho chủng nấm men đột biến thiếu khả năng phát triển trong tryptophan, ví dụ, ATCC No. 44076 hoặc PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). Sự có mặt của *trp1* trong hệ gen tế bào chủ nấm men khi đó tạo ra môi trường hữu hiệu để phát hiện biến nạp nhờ sự sinh trưởng khi không có tryptophan. Tương tự, các chủng nấm men thiếu hụt *Leu2p* như ATCC 20,622 hoặc 38,626 được bổ sung các plasmit đã biết là mang gen *LEU2*.

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

Các vector biểu hiện và tách dòng thường chứa đoạn khởi đầu mà được nhận biết bởi sinh vật chủ và được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng *Nrp1A* hoặc chuỗi peptit của nó. Các đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng với tế bào chủ nhân nguyên thủy bao gồm đoạn khởi đầu *phoA*, hệ thống đoạn khởi đầu  $\beta$ -lactamaza và lactoza, đoạn khởi đầu phosphataza kiềm, hệ thống đoạn khởi đầu tryptophan (*trp*), và các đoạn khởi đầu lai như đoạn khởi đầu *tac*. Các đoạn khởi đầu vi khuẩn đã biết khác cũng là thích hợp. Các đoạn khởi đầu để sử dụng trong hệ thống vi khuẩn cũng chứa trình tự Shine-Dalgarno (S.D.) được liên kết theo kiểu hoạt động được với ADN mã hóa kháng thể kháng *Nrp1A* được làm giống như của người.

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

Ví dụ về các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng với tế bào chủ nấm men bao gồm các đoạn khởi đầu cho 3-phosphoglycerat kinaza hoặc các enzym đường

phân khác, như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza, phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza, và glucokinaza.

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

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

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

Yếu tố hữu ích khác có thể được sử dụng trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp là trình tự tăng cường, trình tự này được sử dụng để làm tăng sự phiên mã ADN mã hóa kháng thể kháng NrplA bởi các sinh vật nhân điển hình cao hơn. Nhiều trình tự tăng cường hiện đã biết từ gen của động vật có vú (ví dụ, globin, elastaza, albumin,  $\alpha$ -

fetoprotein, và insulin). Tuy nhiên, thông thường sẽ sử dụng trình tự tăng cường từ virut ở tế bào nhân điển hình. Các ví dụ bao gồm trình tự tăng cường SV40 ở phía sau của điểm khởi đầu sao chép (bp 100-270), trình tự tăng cường đoạn khởi đầu sớm của cytomegalovirut, trình tự tăng cường của polyoma ở phía sau của điểm khởi đầu sao chép, và trình tự tăng cường của adenovirut. Tương tự, xem tài liệu Yaniv, 1982, Nature 297:17-18 mô tả về các yếu tố tăng cường để hoạt hóa các đoạn khởi đầu của tế bào nhân điển hình. Trình tự tăng cường có thể được ghép vào vectơ ở vị trí 5' hoặc 3' so với trình tự mã hóa kháng thể kháng Nrp1A, nhưng tốt hơn là nằm ở vị trí 5' tính từ đoạn khởi đầu.

Các vectơ biểu hiện được sử dụng trong tế bào chủ nhân điển hình (nấm men, nấm mốc, côn trùng, thực vật, động vật, người, hoặc tế bào có nhân từ các sinh vật đa bào khác) cũng sẽ chứa các trình tự cần để kết thúc sự phiên mã và để ổn định mRNA. Các trình tự như vậy thường có ở đầu 5' và, đôi khi ở đầu 3', các vùng không được dịch mã của ADN hoặc cADN của sinh vật nhân điển hình hoặc virut. Các vùng này chứa các đoạn nucleotit được phiên mã dưới dạng đoạn polyadenyl hóa trong phần không được dịch mã của mRNA mã hóa kháng thể kháng Nrp1A. Một thành phần kết thúc phiên mã hữu dụng là vùng polyadenyl hóa hormon sinh trưởng của bò. Xem WO94/11026 và vectơ biểu hiện được bộc lộ trong tài liệu này. Theo một vài phương án, kháng thể kháng Nrp1A có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ CHEF. (Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,888,809; phần mô tả của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn).

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện ADN trong các vectơ ở đây là tế bào nhân nguyên thủy, nấm men, hoặc tế bào nhân điển hình bậc cao hơn được mô tả trên đây. Các sinh vật nhân nguyên thủy thích hợp cho mục đích này bao gồm vi khuẩn thật, như các sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ, *Enterobacteriaceae* như *Escherichia*, ví dụ, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, ví dụ, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ, *Serratia marcescans*, và *Shigella*, cũng như *Bacilli* như *B. subtilis* và *B. licheniformis* (ví dụ, *B. licheniformis* 41P được bộc lộ trong DD 266,710 công bố ngày 12/04/1989), *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, và *Streptomyces*. Một tế bào chủ tách dòng *E. coli* được ưu tiên là *E. coli* 294 (ATCC 31,446), mặc dù các chủng khác như *E. coli* B, *E.*

*coli* X1776 (ATCC 31,537), và *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) cũng là thích hợp. Các ví dụ này minh họa chứ không hạn chế.

Ngoài các sinh vật nhân nguyên thủy, các vi khuẩn nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện đối với các vector mã hóa kháng thể kháng Nrp1A. *Saccharomyces cerevisiae*, hay thường gọi là nấm men bánh mỳ, là vi sinh vật thường dùng nhất trong số các vi sinh vật chủ nhân điển hình bậc thấp hơn. Tuy nhiên, một số chi, loài, và chủng thường có sẵn và hữu dụng ở đây, như *Schizosaccharomyces pombe*; vật chủ *Kluyveromyces* như, ví dụ, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis*; và nấm sợi như, ví dụ, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, và vật chủ *Aspergillus* như *A. nidulans* và *A. niger*.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể kháng Nrp1A được glycosyl hóa thu được từ các sinh vật đa bào. Các ví dụ về các tế bào động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng, bao gồm, ví dụ, nhiều chủng baculovirus và biến thể và các tế bào chủ côn trùng chấp nhận được tương ứng từ vật chủ như *Spodoptera frugiperda* (sâu bướm), *Aedes aegypti* (muỗi), *Aedes albopictus* (muỗi), *Drosophila melanogaster* (ruồi giấm), và *Bombyx mori* (con tằm). Nhiều chủng virus để chuyển nhiễm là sẵn có 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, đặc biệt để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

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

Kháng thể kháng Nrp1A theo sáng chế cũng có thể được kết hợp trong các vector virus, tức là polynucleotit mã hóa cho kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn 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 một khía cạnh khác, việc biểu hiện kháng thể kháng Nrp1A được thực hiện trong các tế bào động vật có xương sống. Việc nhân giống các tế bào động vật có xương sống trong nuôi cấy (nuôi cấy mô) đã trở thành quy trình thường quy và các kỹ thuật được phổ biến rộng rãi. Ví dụ về các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu dụng là dòng tế bào thận khỉ CV1 được biến nạp bởi SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), dòng tế bào thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293 được tách dòng phụ để nuôi 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 carxinom 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 hoặc tách dòng được mô tả trên đây để sản xuất kháng thể kháng Nrp1A và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến nếu thích hợp để cảm ứng các đoạn khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp, hoặc khuếch đại các gen mã hóa các trình tự mong muốn.

Các tế bào chủ được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng Nrp1A được mô tả ở đây có thể được nuôi cấy trong nhiều môi trường khác nhau. Các môi trường có bán trên thị trường như Ham's F10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), môi trường thiết yếu tối thiểu ((Minimal Essential Medium - MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.), và môi trường Dulbecco's Modified Eagle's ((DMEM), Sigma-Aldrich Co.) là thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ. Ngoài ra, môi trường bất kỳ được mô tả trong một hoặc nhiều tài liệu Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, patent Mỹ số 4,767,704, patent Mỹ số 4,657,866; Patent Mỹ số 4,927,762; Patent Mỹ số 4,560,655; Patent Mỹ số 5,122,469, WO 90/103430, và WO 87/00195 có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy cho tế bào

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

Khi sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, kháng thể có thể được sản xuất nội bào, trong khoang chu chất, hoặc được tiết trực tiếp vào môi trường. Nếu kháng thể được sản xuất nội bào, các tế bào có thể bị phá vỡ để giải phóng protein ở bước thứ nhất. Các mảnh vụn dạng hạt, hoặc tế bào chủ hoặc đoạn 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, hỗn hợp nhão tế bào được làm tan giá với sự có mặt của natri axetat (độ pH=3,5), EDTA, và phenylmetylsulfonylflorua (PMSF) trong khoảng 30 phút. Các mảnh vụn tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm. Nếu kháng thể được tiết vào môi trường, dịch nổi từ hệ biểu hiện như vậy 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 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  $\text{CH}_3$ , 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, muối nồng độ khoảng 0-0,25M).

Cũng được bao gồm là các axit nucleic lai trong các điều kiện nghiêm ngặt thấp, trung bình và cao, như được định nghĩa ở đây, với tất cả hoặc một phần (ví dụ, phần mã hóa vùng biến đổi) của trình tự nucleotit được đặc trưng bởi (các) trình tự polynucleotit được phân lập mà mã hóa kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn kháng thể. Phần lai của axit nucleic lai thường có độ dài ít nhất là 15 (ví dụ, 20, 25, 30 hoặc 50) nucleotit. Phần lai của axit nucleic lai tương đồng ít nhất 80%, ví dụ, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc ít nhất 98%, với trình tự của một phần hoặc tất cả axit nucleic mã hóa polypeptit kháng Nrp1A (ví dụ, vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ), hoặc phần hỗ trợ của nó. Có thể sử dụng các axit nucleic lai thuộc loại được mô tả trong tài liệu này, ví dụ, như mẫu dò tách dòng, đoạn mồi, ví dụ, đoạn mồi PCR, hoặc mẫu dò chẩn đoán.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến polynucleotit hoặc các polynucleotit được phân lập chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO:

24 hoặc SEQ ID NO: 25 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 19 hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11.

Cần phải hiểu rằng trong các kháng thể kháng Nrp1A và đoạn kháng thể này, trình tự axit nucleic mã hóa cho CDR duy trì không thay đổi (không thay đổi đối với axit amin mà chúng mã hóa, dạng tương đương của trình tự ADN do sự thoái hóa của các codon là có thể) nhưng các khu vực xung quanh, ví dụ, các vùng FR có thể được xử lý.

### Vật phẩm sản xuất

Theo một khía cạnh khác, vật phẩm sản xuất có chứa các vật liệu hữu ích để điều trị các rối loạn được mô tả ở trên được bao gồm. Vật phẩm sản xuất bao gồm đồ chứa và nhãn. Các đồ chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi lanh, và ống nghiệm. Các đồ chứa có thể được tạo ra từ nhiều vật liệu như thủy tinh hoặc chất dẻo. Đồ chứa giữ chế phẩm hữu hiệu để điều trị tình trạng bệnh và có thể có lỗ nạp vô trùng. Ví dụ, đồ chứa có thể là túi dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút mà có thể chọc thủng được bằng kim tiêm dưới da. Các hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó. Nhãn ở trên hoặc được kết hợp với đồ chứa chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lựa chọn. Vật phẩm sản xuất có thể bao gồm thêm đồ chứa thứ hai bao gồm dung dịch đệm được dùng, như nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Vật phẩm sản xuất có thể bao gồm thêm các nguyên liệu khác theo nhu cầu thương mại hoặc của người dùng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, chất độn, kim, xi lanh, và tờ rời trong bao gói với hướng dẫn sử dụng.

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

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều hòa tăng Sema3A trong thủy tinh thể của các bệnh nhân bị DME và PDR

Sự biểu hiện của Sema3A trong võng mạc của các mẫu từ những người cho có lịch sử bị bệnh võng mạc tiểu đường được nghiên cứu bằng phương pháp hóa mô miễn dịch. Quy trình nhuộm miễn dịch là như sau:

1. Rã đông các lam kính và để các mẫu khô trong không khí trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng (RT);
2. Vẽ hộp bút pap và để khô;
3. Thu hồi kháng nguyên trong 1% SDS trong 5 phút ở nhiệt độ trong 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 ở nhiệt độ trong phòng;
6. Pha loãng kháng thể thứ nhất của thử kháng Sema3a (abcam, ab23393) với tỷ lệ 1:200 trong dung dịch phong bế. Ủ các phần trên lam kính ở nhiệt độ trong phòng qua đêm;
7. Tráng rửa các lam kính 3 lần trong PBS trong 5 phút;
8. Ủ kháng thể thứ hai với kháng thể của lừa kháng thử Alexa fluor546 (invitrogen, A10040) ở tỷ lệ pha loãng 1:400 trong dung dịch DAPI/0,3% Triton X100/ PBS. Ủ các phần trên lam kính trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng;
9. Tráng rửa các lam kính 3 đến 5 lần trong PBS trong 5 phút;
10. Che phủ các phần này bằng Aquamount và để khô bằng không khí;
11. Chụp các phần và phân loại cường độ ở độ phóng đại 40 lần.

Tập hợp ba phần đối với mỗi người cho được nhuộm miễn dịch đối với Sema3A. Việc gắn nhãn Sema3A được đánh giá một cách độc lập trong mỗi vùng trong số các vùng này bởi những người quan sát đã được đào tạo cho nhiệm vụ cụ thể này sử dụng sơ đồ phân loại 5 điểm (0=không phát hiện thấy, 1=cường độ thấp, một vài điểm, 2=cường độ vừa phải, một số điểm, 3=cường độ sáng, nhuộm lan rộng và 4=cường độ rất sáng, phát hiện thấy nhiều). Những người quan sát không hề hay biết về tình trạng sức khỏe của những người cho mắt. Trong võng mạc, Sema3A được liên kết với thành mạch của mạch máu võng mạc. Biểu hiện của Sema3A trong mạch máu

võng mạc và nhu mô võng mạc tăng lên ở bệnh nhân phù hoàng điểm do tiểu đường so với bệnh nhân tiểu đường không có bệnh lý về mắt (Fig.1).

#### Ví dụ 2: Ức chế khả năng thấm cảm ứng bởi VEGF

Khả năng thấm được đo trong võng mạc của các con chuột Brown Norway. VEGF-A người tái tổ hợp (250 ng/2,5  $\mu$ l) được tiêm nội nhãn để cảm ứng tăng khả năng thấm. Các kháng thể được tiêm đồng thời với VEGF. Thuốc nhuộm xanh Evans (45 mg/ml) được tiêm trong tĩnh mạch 24 giờ sau khi xử lý VEGF vào Vena caudalis mediana (1 ml/kg). 30 phút sau, các mắt được khoét nhãn và được cố định trong formalin. Flatmount võng mạc được chuẩn bị và huỳnh quang xanh Evans ở bước sóng 620 nm được đo bằng kính hiển vi huỳnh quang đồng tiêu và phần mềm phân tích hình ảnh.

Các kết quả được mô tả trên Fig.2. Kháng thể theo sáng chế ức chế hoàn toàn khả năng thấm cảm ứng bởi VEGF. Kết quả này tương tự như kết quả quan sát được đối với bất kỳ VEGF aflibercept (Eylea®). Kháng thể kháng phối tử Nrp1 semaphorin 3A không ức chế khả năng thấm cảm ứng bởi VEGF-A trong võng mạc. Điều này xác nhận rằng kháng thể theo sáng chế được định hướng kháng miền A của Nrp1 đã ức chế các tác dụng qua trung gian VEGF-A và khả năng này phân biệt nó với kháng thể được định hướng kháng phối tử Nrp1 semaphorin 3A. Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng kháng thể được định hướng kháng Sema3A đã ức chế hoàn toàn khả năng thấm cảm ứng bởi Sema3A, nhưng không ức chế khả năng thấm cảm ứng bởi VEGF-A. Các tác giả sáng chế đã đưa ra giả thuyết rằng sự ức chế khả năng thấm của võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A của kháng thể kháng miền A của Nrp1 là do sự can thiệp không gian vào phức hợp thụ thể toàn phần truyền tín hiệu bao gồm Nrp1, thụ thể VEGF 2 và các đồng thụ thể bổ sung.

#### Ví dụ 3: Tạo ra các kháng thể được định hướng kháng Nrp1A và Nrp1B nhằm mục đích so sánh

Nhằm mục đích so sánh, các tác giả sáng chế đã phát triển các kháng thể được định hướng lần lượt kháng Nrp1A và Nrp1B, như được bộc lộ trong WO2008143666 và WO2007056470. Các kháng thể này bao gồm:

- kháng thể được định hướng kháng Nrp1A, được đề cập là “YW64.3”; và
- kháng thể được định hướng kháng Nrp1B, được đề cập là “YW107.4.87”.

Kháng thể kháng Nrp1A được bộc lộ dưới dạng dòng “YW64.3” trong WO2007056470 với các dấu hiệu sau:

- miền biến đổi của chuỗi nặng là trình tự được đánh số 4 trong WO2007056470, và
- miền biến đổi của chuỗi nhẹ là trình tự được đánh số 3 trong WO2007056470.

Kháng thể kháng Nrp1B được bộc lộ dưới dạng dòng “YW107.4.87” trong WO2007056470 với các dấu hiệu sau:

- chuỗi nặng là trình tự được đánh số 6 trong WO2007056470, và
- chuỗi nhẹ là trình tự được đánh số 5 trong WO2007056470.

Các trình tự của YW64.3 và YW107.4.87 được tổng kết như dưới đây trong bảng 6 dưới đây.

Bảng 6:

| Tên       | Trình tự                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | SEQ ID NO:       |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| YW64.3-HC | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPISWV<br>RQAPGKGLEWVSSITGKNGYTTYADSVKGRFTISA<br>DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYG<br>MDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT<br>AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL<br>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV<br>DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP<br>PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF | SEQ ID NO:<br>28 |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                  |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|                | SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                  |
| YW64.3-LC      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLAWYQ<br>QKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLT<br>ISSLQPEDFATYYCQQYMSVPITFGQGTKVEIKRTVA<br>APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSK<br>ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                           | SEQ ID NO:<br>29 |
| YW64.3-VH      | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPISWV<br>RQAPGKGLEWVSSITGKNGYTTYADSVKGRFTISA<br>DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYG<br>MDVWGQGTLVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | SEQ ID NO:<br>30 |
| YW64.3-VL      | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLAWYQ<br>QKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTLT<br>ISSLQPEDFATYYCQQYMSVPITFGQGTKVEIKR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | SEQ ID NO:<br>31 |
| YW107.4.87- HC | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS<br>WVRQAPGKGLEWVSQISPAGGYTNYADSVKGRFTI<br>SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGELPYR<br>MSKVMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS<br>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP<br>SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY<br>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQ<br>GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | SEQ ID NO:<br>32 |
| YW107.4.87- LC | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQYFSSYLAWY<br>QQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTL<br>TISSLQPEDFATYYCQQYLGSPPTFGQGTKVEIKRTV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | SEQ ID NO:<br>33 |

|                    |                                                                                                                                       |                  |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|                    | AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKV<br>QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS<br>KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                    |                  |
| YW107.4.<br>87- VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSYAMSW<br>VRQAPGKGLEWVSQISPAGGYTNYADSVKGRFTIS<br>ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARELPYYRM<br>SKVMDVWGQGTLLTVSS | SEQ ID NO:<br>34 |
| YW107.4.<br>87- VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYFSSYLAWY<br>QQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSGTDFTL<br>TISSLQPEDFATYYCQQYLGSPPTFGQGTKVEIKR                  | SEQ ID NO:<br>35 |

Ví dụ 4: Thử nghiệm sụp đổ khung tế bào cảm ứng bởi Sema3A - Hiệu lực của kháng thể theo sáng chế trong việc làm giảm trở kháng cảm ứng bởi Sema3A và so sánh giữa kháng thể theo sáng chế và các dòng YW64.3 và YW107.4.87

Hoạt tính tế bào của các kháng thể Nrp1 được đánh giá bằng phương pháp đo sự sụp đổ khung tế bào trong các tế bào nội mô vi mạch võng mạc người (HRMEC) sử dụng hệ thống XCELLigence (Dụng cụ phân tích tế bào thời gian thực -Real Time Cell Analysis Instruments, như được thương mại hóa bởi ACEA Biosciences). Hệ thống đo sự gắn kết, sự hợp dòng và tính toàn vẹn của tế bào thông qua trở kháng tế bào. HRMEC biểu hiện nội sinh Neuropilin-1 (Nrp1) và plexins, là các thành phần của thụ thể toàn phần Semaphorin nhóm-3. Bằng cách gắn kết với phức hợp thụ thể này, các semaphorin cảm ứng sự sụp đổ của các sợi F-actin trong nội mô. Trong 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 người đã làm giảm trở kháng tế bào do sự sụp đổ khung tế bào và sự co rút sau đó của tế bào, được đo dưới dạng mức giảm trở kháng tế bào.

Ngắn gọn là, E-Plates được phủ yếu tố gắn kết (Attachment Factor). Các tế bào được gieo cấy với mật độ 20000 tế bào/lỗ và sau đó được để sinh trưởng trong đơn lớp dưới các điều kiện sinh trưởng thông thường của chúng bên trong thiết bị XCELLigence qua đêm. Các kết hợp của Sema3A cùng và không cùng với kháng thể

được bổ sung với sự có mặt của 3mM  $\text{CaCl}_2$ . Chỉ số tế bào được chuẩn hóa đến thời điểm trước khi bổ sung các chất. Các tính toán được thực hiện 5 giờ sau khi kích thích.

Để xác định hiệu lực chức năng và so sánh giữa kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL), các dòng YW64.3 và YW107.4.87 và kháng thể được định hướng kháng Sema3A trong thử nghiệm sục đồ khung tế bào, các đường cong đáp ứng nồng độ Sema3A được kết hợp với các nồng độ gia tăng của kháng thể dưới dạng các thử nghiệm thay đổi  $\text{IC}_{50}$ . Biểu đồ Gaddum Schild được thực hiện để tính giá trị  $\text{pA}_2$  (logarit âm của nồng độ kháng thể cần thiết để thay đổi đường cong đáp ứng nồng độ Sema3A với hệ số bằng 2). Hiệu lực tính theo M được tính từ giá trị  $\text{pA}_2$  là  $=\text{POTENCY}(10; -X)$ , và được bộc lộ trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

| Hiệu lực trong thử nghiệm sục đồ (thay đổi $\text{IC}_{50}$ ) |                   |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|
| Kháng thể theo sáng chế                                       | 98pM              |
| YW64.3                                                        | 56pM              |
| YW107.4.87                                                    | không có tác dụng |
| Kháng thể được định hướng kháng Sema3A                        | 69pM              |

Ví dụ 5: Thử nghiệm mất tính toàn vẹn tế bào cảm ứng bởi VEGF - Hiệu lực của kháng thể theo sáng chế trong việc làm giảm trở kháng cảm ứng bởi VEGF-A và so sánh giữa kháng thể theo sáng chế, các dòng YW64.3 và YW107.4.87 và bẫy VEGF

VEGF-A cảm ứng sự nối lỏng tiếp xúc tế bào-tế bào mà có thể đo được dưới dạng sự giảm trở kháng tạm thời trong các tế bào nội mô. Kháng thể theo sáng chế ngăn ngừa sự giảm trở kháng cảm ứng bởi VEGF-A chức năng. Hoạt tính tế bào của các kháng thể Nrp1 trong việc ngăn chặn sự mất tính toàn vẹn tế bào cảm ứng bởi VEGF được đánh giá bằng cách đo sự giảm trở kháng ở các tế bào nội mô vi mạch võng mạc người (HRMEC) sử dụng hệ thống XCELLigence (Dụng cụ phân tích tế bào thời gian thực -Real Time Cell Analysis Instruments, như được thương mại hóa bởi ACEA Biosciences). HRMEC biểu hiện nội sinh Neuropilin-1 (Nrp1) và VEGFR2, là

các thành phần của thụ thể toàn phần VEGF. VEGF-A cảm ứng sự nối lỏng sự kết nối tế bào giữa các tế bào nội mô. Trong thử nghiệm này, sự bổ sung protein VEGF-A tái tổ hợp vào lớp hợp dòng của các tế bào nội mô vi mạch võng mạc người đã làm giảm trở kháng tế bào do sự mất tính toàn vẹn tế bào.

Ngắn gọn là, E-Plates được phủ yếu tố gắn kết (Attachment Factor). Các tế bào được gieo cấy với mật độ 20000 tế bào/lỗ và sau đó được để sinh trưởng trong đơn lớp dưới các điều kiện sinh trưởng thông thường của chúng bên trong thiết bị XCELLigence qua đêm. Môi trường nuôi cấy được thay đổi thành môi trường không huyết thanh chứa 0,5% BSA trong 3 giờ trước khi VEGF-A và các kháng thể được bổ sung. Chỉ số tế bào được chuẩn hóa đến thời điểm trước khi bổ sung các chất. Việc tính toán được thực hiện đối với trở kháng cảm ứng bởi VEGF tối thiểu khoảng 30 phút sau khi kích thích.

Để xác định hiệu lực chức năng, EC50 của kháng thể để ngăn ngừa sự mất tính toàn vẹn tế bào cảm ứng bởi nồng độ cố định của VEGF-A người tái tổ hợp được đo. Giá trị trung bình hình học của các giá trị EC50 của các thử nghiệm riêng rẽ được tính. Các kết quả được tổng kết trong bảng 8 dưới đây đối với kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL) và một số phân tử so sánh.

Bảng 8

| IC50 (nM) gây mất tính toàn vẹn tế bào cảm ứng bởi VEGF |       |
|---------------------------------------------------------|-------|
| Kháng thể theo sáng chế                                 | 0,74  |
| YW64.3                                                  | 12,57 |
| YW107.4.87                                              | 13,74 |
| Avastin®                                                | 0,92  |
| Lucentis®                                               | 5,94  |
| Eylea®                                                  | 0,33  |

Ví dụ 6: Tác dụng của việc điều trị kháng VEGF và kháng thể kháng Nrp1A đối với mật độ tế bào đỉnh, vùng không mạch và các búi tiền võng mạc ở mô hình OIR chuột nhắt

Tác dụng của kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL) đối với sự tái phân phối mạch của vùng không mạch thiếu máu cục bộ được nghiên cứu trên mô hình bệnh võng mạc cảm ứng bởi oxy (oxygen-induced retinopathy - OIR) ở chuột nhắt. Các lứa đẻ của chuột nhắt C57Bl/6J được tiếp xúc với khí quyển gồm 75% oxy từ ngày 7 sau sinh đến ngày 12 sau sinh. Điều này dẫn đến sự thoái triển mạch máu ở võng mạc trung tâm và sự hình thành vùng không mạch. Sau khi quay trở lại các điều kiện không độc hại, vùng này trở nên thiếu máu cục bộ. Các con chuột con nhận liều tiêm nội nhãn đơn 10  $\mu$ g kháng thể trong 0,5  $\mu$ l dung dịch vào mỗi mắt trong điều kiện gây mê bằng isofluran vào ngày 12 sau sinh. Vào ngày 17 sau sinh, các con vật được làm chết và các mắt được khoét lấy nhãn. Các mắt được cố định trong formalin và flatmount võng mạc được chuẩn bị trong đó các mạch máu võng mạc được nhuộm bằng isolectin B4. Số lượng tế bào đỉnh (các tế bào nội mô chuyên biệt khởi đầu sự hình thành của các mạch mới) được đếm ở phía trước vùng không mạch dọc theo toàn bộ võng mạc (ranh giới giữa vùng biên có mạch và vùng trung tâm không mạch của võng mạc). Các tế bào đỉnh được nhận diện bằng hình thái học đặc biệt của chúng thể hiện sự kéo dài chân giả dạng sợi. Để phân tích, số lượng tế bào đỉnh được chuẩn hóa trên độ dài của vùng phía trước vùng 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. Mắt đối bên được sử dụng để phân chia mô học của cốc mắt và nhãn tiền võng mạc đã được đếm.

Kháng thể theo sáng chế làm gia tăng mật độ tế bào đỉnh trong mô hình OIR trên chuột nhắt (Fig.3A). Hơn nữa, nó thể hiện sự giảm vùng không mạch (Fig.3C). Ngược lại, bẫy VEGF aflibercept (Eylea®) không làm gia tăng mật độ tế bào đỉnh cũng như không làm giảm vùng không mạch. Có sự tương quan âm tính giữa mật độ tế bào đỉnh và kích thước vùng không mạch (Fig.3B), điều này chỉ ra sự phụ thuộc cơ học của hai thông số này. Nói chung, kháng thể theo sáng chế làm giảm kích thước vùng không mạch thiếu máu cục bộ ở mô hình bệnh võng mạc cảm ứng bởi oxy ở

động vật, điều này thể hiện tác dụng có lợi đối với bệnh thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường. Sự tân tạo mạch bệnh lý ở thủy tinh thể như được chứng minh bởi các nhân tiền võng mạc được ức chế bởi aflibercept trong khi kháng thể theo sáng chế thể hiện sự giảm vừa phải tình trạng bệnh lý này (Fig.3D).

Ví dụ 7: So sánh  $t_{1/2}$  của kháng thể theo sáng chế và Avastin trên mắt thỏ

Các tác giả sáng chế đã đo thời gian bán hủy của kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL) trong các điều kiện khác nhau. Kết quả được tổng kết trong bảng 9 dưới đây.

Bảng 9:

| $t_{1/2}$ tính được (ngày) |                                |                |
|----------------------------|--------------------------------|----------------|
|                            | <i>Kháng thể theo sáng chế</i> | <i>Avastin</i> |
| Thủy tinh thể              | 4,8                            | 4,4            |
| Võng mạc                   | 3,5                            | 4,8            |
| Nước                       | 4,5                            | 4,5            |

Thời gian bán hủy tính được là 4,8, 3,5 và 4,5 ngày lần lượt trong thủy tinh thể, võng mạc và dịch nước. Các thời gian bán hủy này là tương tự như các thời gian được báo cáo trong tài liệu tham khảo đối với kháng thể IgG1 đơn dòng tái tổ hợp được làm giống như của người Avastin (kháng thể kháng VEGF, bevacizumab, Bakri et al., Ophthalmology, 2007), mà cũng được xác nhận về mặt thực nghiệm. Các kết quả này là như được trông đợi, vì sự thanh thải nội nhãn của các IgG có chiều dài đầy đủ phụ thuộc chủ yếu vào kích thước phân tử của chúng, kích thước này là tương tự giữa kháng thể theo sáng chế và Avastin®. Do đó, PK ở người, bao gồm thời gian bán hủy ở mắt của kháng thể theo sáng chế và Avastin® được kỳ vọng là tương tự nhau. Thời gian bán hủy ở mắt người của Avastin® được báo cáo là  $9,73 \pm 1,48$  ngày (Hutton-Smith, 2016).

Ví dụ 8: Ái lực gắn kết với NrplA người

Các tác giả sáng chế đã đánh giá ái lực gắn kết của kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL).

Dung dịch đệm chạy cho thử nghiệm này và tất cả các dung dịch pha loãng (ngoại trừ trường hợp đã nêu) được thực hiện trong PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20 [100  $\mu$ l 100% Tween20 được bổ sung vào 2L PBS-T-EDTA để tạo ra nồng độ Tween 20 cuối cùng là 0,01%]. Chip cảm biến GLM được chuẩn hóa và được đặt điều kiện trước theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Chip cảm biến này được hoạt hóa bằng hỗn hợp với lượng như nhau của EDC/s-NHS theo hướng ngang trong 300 giây ở lưu lượng 30  $\mu$ l/phút và được cố định bằng protein tái tổ hợp A/G (6  $\mu$ g/ml trong 10 mM axetat pH bằng 4,5) theo hướng ngang trong 300 giây ở lưu lượng 30  $\mu$ l/phút dẫn đến ~ 4370-4875 RU Protein A/G trên bề mặt. Chip cảm biến được khử hoạt hóa bằng 1M etanolamin HCl theo hướng ngang trong 300 giây ở lưu lượng 30  $\mu$ l/phút. Chip cảm biến được cố định với 0,85% axit phosphoric trong 18 giây ở lưu lượng 100  $\mu$ l/phút 3 lần theo hướng ngang và 3 lần theo hướng dọc.

Kháng thể theo sáng chế (0,6  $\mu$ g/ml) được bắt giữ trên bề mặt Protein A/G theo hướng dọc trong 300 giây ở lưu lượng 30  $\mu$ l/phút dẫn đến mức bắt giữ ~1678 RU. Đường cơ sở được ổn định bằng cách tiêm PBS-T-EDTA trong 60 giây với lưu lượng 100  $\mu$ l/phút theo hướng ngang với độ phân ly 120 giây. Chất phân tích được tiêm theo hướng ngang lên kháng thể được bắt giữ trong 300 giây với lưu lượng 30  $\mu$ l/phút và phân ly trong 1800 giây. Nồng độ của chất phân tích là 0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM và 100 nM. Bề mặt được tái tạo bằng cách tiêm 0,85% dung dịch axit phosphoric trong 18 giây với lưu lượng 100  $\mu$ l/phút một lần theo hướng ngang và một lần theo hướng dọc. PBS-T-EDTA được tiêm trong 60 giây với lưu lượng 100  $\mu$ l/phút một lần theo hướng dọc và một lần theo hướng ngang.

Điểm giao nhau (tương tác với bề mặt cảm biến) và mẫu trống (PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20 hoặc 0 nM của chất phân tích) được trừ khỏi dữ liệu thô. Các biểu đồ cảm biến sau đó được làm phù hợp toàn bộ với gắn kết Langmuir 1:1 để cung cấp các giá trị tốc độ liên kết ( $k_a$ ), tốc độ phân ly ( $k_d$ ) và ái lực  $K_D$ .

Kết quả được tổng kết trong bảng 10 dưới đây.

Bảng 10:

|  | Ái lực ( $K_a$ ) [nM] đối với Nrp1 người |             |                   |                   |               |
|--|------------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------|---------------|
|  | <i>Người</i>                             | <i>Cyno</i> | <i>Chuột cống</i> | <i>Chuột nhắt</i> | <i>Gerbil</i> |

|                            |      |      |      |     |      |
|----------------------------|------|------|------|-----|------|
| Kháng thể<br>theo sáng chế | 11,1 | 15,2 | 10,5 | 7,7 | 13,9 |
|----------------------------|------|------|------|-----|------|

Ví dụ 9: Đánh giá khả năng sinh miễn dịch của kháng thể theo sáng chế

Các tác giả sáng chế đã đánh giá khả năng sinh miễn dịch dự đoán của kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL). Nhằm mục đích này, các tác giả sáng chế đã sử dụng công cụ *in silico* để dự đoán các epitop tế bào T (EpiMatrix phát triển bởi EpiVax).

Bằng cách sàng lọc các trình tự của nhiều thể phân lập kháng thể người, EpiVax đã nhận diện một số phối tử HLA được bảo tồn cao mà được tin là có tiềm năng điều hòa. Bằng chứng thực nghiệm cho thấy nhiều peptit trong số các peptit này có khả năng dung nạp tích cực ở hầu hết các đối tượng. Các epitop tế bào T được bảo tồn cao, điều hòa, và pha tạp được biết là các Tregitop (De Groot et al. Blood. 2008 Oct 15;112(8):3303-11). Tiềm năng sinh miễn dịch của các epitop mới được chứa trong các kháng thể được làm giống như của người có thể được kiểm soát một cách hữu hiệu với sự có mặt của một số lượng đáng kể các Tregitop.

Nhằm mục đích phân tích khả năng sinh miễn dịch của kháng thể, EpiVax bao gồm điểm EpiMatrix được điều chỉnh bởi Tregitop và dự đoán tương ứng về đáp ứng kháng kháng thể điều trị. Để tính điểm EpiMatrix được điều chỉnh bởi Tregitop, các điểm số của các Tregitop được trừ khỏi điểm số protein EpiMatrix. Các điểm số được điều chỉnh bởi Tregitop đã được thể hiện là tương quan tốt với đáp ứng miễn dịch lâm sàng quan sát được đối với tập hợp gồm 23 kháng thể thương mại (De Groot et al. Clin Immunol. 2009 May;131(2):189-201).

Các kết quả đối với thang đo EpiMatrix được tổng kết trên bảng 11 dưới đây.

Bảng 11:

| Phân tử                       | Chuỗi nặng (% người) |       | Epivax<br>(VH) | Epivax<br>(VK) | Chuỗi nhẹ (% người) |       |
|-------------------------------|----------------------|-------|----------------|----------------|---------------------|-------|
|                               | FR                   | Gen V |                |                | FR                  | Gen V |
| Kháng thể<br>theo sáng<br>chế | 90                   | 88    | 10,02          | -3,12          | 100                 | 96    |

Các trình tự của kháng thể theo sáng chế ghi điểm ở đầu dưới của thang EpiMatrix, điều này chỉ ra rằng kháng thể theo sáng chế có tiềm năng sinh miễn dịch bị giới hạn mạnh. Thang đo EpiMatrix nêu trên đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và có thể được thấy, trong số những tài liệu khác, trên fig.2 của công bố của Mufarrege et al. Clin Immunol., 2017 Mar;176:31-41.

Ví dụ 10: So sánh ái lực gắn kết với Nrpl người của kháng thể theo sáng chế, YW64.3 và YW107.4.87

Các tác giả sáng chế đã đánh giá ái lực gắn kết của kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL) với Nrpl người cũng như ái lực gắn kết của YW64.3 và YW107.4.87 với Nrpl người.

Dung dịch đệm chạy cho thử nghiệm này và tất cả các dung dịch pha loãng (ngoại trừ trường hợp đã nêu) được thực hiện trong PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20 [100 µl 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 đặt điều kiện trước theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Chip cảm biến này được hoạt hóa bằng hỗn hợp với lượng như nhau của EDC/s-NHS theo hướng ngang trong 300 giây ở lưu lượng 30 µl/phút và được cố định bằng protein tái tổ hợp A/G (60 µg/ml trong 10 mM axetat pH bằng 4,5) theo hướng ngang trong 300 giây ở lưu lượng 30 µl/phút. Chip cảm biến được khử hoạt hóa bằng 1M etanolamin HCl theo hướng ngang trong 300 giây ở lưu lượng 30 µl/phút. Chip cảm biến được cố định với 0,85% axit phosphoric trong 18 giây ở lưu lượng 100 µl/phút 3 lần theo hướng ngang và 3 lần theo hướng dọc.

Kháng thể ví dụ theo sáng chế và YW64.3 và YW107.4.87 được bắt giữ trên bề mặt Protein A/G trên 3 trong số 6 kênh dọc. NrplA người được chuẩn bị trong dung dịch đệm PBS-T-EDTA ở nồng độ 100, 50, 25, 12,5, 6,25, và 0 nM. Việc tiêm dung dịch đệm PBS-T-EDTA được sử dụng làm đối chứng kép cho việc phân tích dữ liệu động học. Mỗi trong số các dung dịch NrplA người và dung dịch đệm PBS-T-EDTA được tiêm đồng thời qua 6 kênh ngang trong 5 phút ở lưu lượng 40 µL/phút sau đó là pha phân ly 30 phút. Các bề mặt được tái sinh bằng việc tiêm trong 18 giây axit

phosphoric 0,85% ở lưu lượng 100  $\mu\text{L}$ /phút sau đó tiêm trong 60 giây PBS-T-EDTA ở lưu lượng 100  $\mu\text{L}$ /phút. Điểm giao nhau (tương tác với bề mặt cảm biến) và mẫu trống (PBS-T-EDTA với 0,01% Tween20 hoặc 0 nM của chất phân tích) được trừ khỏi dữ liệu thô. Các biểu đồ cảm biến sau đó được làm phù hợp toàn bộ với gắn kết Langmuir 1:1 để cung cấp các giá trị tốc độ liên kết ( $k_a$ ), tốc độ phân ly ( $k_d$ ) và ái lực  $K_D$ .

Dữ liệu động lực và ái lực của kháng thể theo sáng chế, YW64.3 và YW107.4.87 gắn kết với Nrp1 người lần lượt được liệt kê trong bảng 12 dưới đây.

Bảng 12:

| Tên mẫu                            | Kd đối với Nrp1 người |
|------------------------------------|-----------------------|
| kháng thể kháng Nrp1A (YW64.3)     | 11,3 nM               |
| kháng thể kháng Nrp1B (YW107.4.87) | 37,5 nM               |
| Kháng thể theo sáng chế            | 11,1 nM               |

Ví dụ 11: So sánh độ ổn định nhiệt của protein của kháng thể theo sáng chế và YW64.3

Phương pháp đo nhiệt lượng quét vi sai (Differential scanning calorimetry - DSC) là kỹ thuật nhiệt động lực học, để đo nhiệt dung dưới dạng hàm số của nhiệt độ và là phương pháp chính xác nhất để đánh giá độ ổn định nhiệt của cấu trúc protein. DSC được sử dụng rộng rãi để đánh giá độ ổn định nhiệt của protein và các thay đổi về cấu tạo của protein. Tín hiệu từ tế bào mẫu được so sánh với tế bào đối chứng thiếu protein trong môi trường dung dịch giống nhau. Khi nhiệt độ của tế bào được gia tăng, các chênh lệch nhiệt độ giữa tế bào đối chứng và tế bào mẫu được đo liên tục và được hiệu chỉnh thành các đơn vị năng lượng. Kênh dữ liệu này được đề cập là tín hiệu DP hoặc năng lượng vi phân (differential power) giữa tế bào đối chứng và tế bào mẫu. Tín hiệu DP được chuyển hóa thành nhiệt dung. Nhiệt dung liên tục được ghi lại dưới dạng hàm số của nhiệt độ. Sau khi trừ dung dịch đệm và phân tích nhiệt đồ thu được, entanpi và các điểm giữa chuyển tiếp nhiệt (biểu kiến) ( $T_m$ ) đối với mỗi chuyển tiếp có thể thu được.

Nhiệt độ của sự duỗi nếp gấp protein ( $T_m$ ) được gắn với độ ổn định của kháng thể, đặc biệt là với sự tập hợp trong quá trình bảo quản và độ ổn định trong thời gian

dài của sản phẩm trị liệu. Sự chuyển tiếp nhiệt của các miền CH2 và CH3 của kháng thể đơn dòng thường là bất biến đối với các kháng thể khác nhau trong một isotyp, với miền CH2 duỗi nếp gấp trước miền CH3.

Các tác giả sáng chế đã so sánh  $T_m$  của:

- kháng thể theo sáng chế, chính xác hơn là “dòng I” có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL, và
- dòng YW64.3, như được bộc lộ ở đây trong ví dụ 3, được sử dụng nhằm mục đích so sánh.

Sự kết tụ và sự duỗi nếp gấp do nhiệt của hợp chất dẫn đầu và YW64.3 ở nồng độ 1 mg/ml trong 10 mM Histidin, pH = 6,0 được theo dõi từ 25°C đến 110°C ở tốc độ quét 60°C/giờ thông qua phương pháp đo nhiệt lượng quét vi sai mao quản tự động (MicroCal, LLC). Dữ liệu được phân tích sử dụng phần mềm Origin 7.0 (Origin-Lab). Tất cả các nhiệt độ được hiệu chỉnh trên đường cơ sở và được khớp bằng cách sử dụng mô hình 2-trạng thái trong Origin để thu được các nhiệt độ điểm giữa biểu kiến ( $T_m$ ) đối với sự duỗi nếp gấp.

Các đường cong nóng chảy của hợp chất dẫn đầu và YW64.3 được bộc lộ trong 13 dưới đây.

Bảng 13:

|                         | $T_{m1}$ (°C) | $T_{m2}$ (°C) | $T_{m3}$ (°C) |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Kháng thể theo sáng chế | 68,33         | 83,23         | 89,70         |
| Dòng YW64.3             | 68,50         | 81,96         | 84,65         |

Đối với kháng thể theo sáng chế trong 10 mM Histidin, pH = 6,  $T_m$  thứ nhất diễn ra ở 68,33°C, điều này có thể tương ứng với sự duỗi nếp gấp của miền CH2. Hai  $T_m$  bổ sung, 83,23°C và 89,70°C, lần lượt tương ứng với miền CH3 và vùng Fab. Tương tự, đối với YW64.3, miền CH2 duỗi nếp gấp ở 68,5°C sau đó là CH3 duỗi nếp gấp ở 81,96°C và cuối cùng là miền Fab duỗi nếp gấp ở 84,65°C. Do đó, nhiệt độ duỗi

nếp gấp của Fab đối với kháng thể theo sáng chế là cao hơn khoảng 5°C so với YW64.3.

Giá trị  $T_m$  cao hơn có nghĩa là có ít phân tử hơn ở trạng thái duỗi nếp gấp ở nhiệt độ đã định. Do đó, giá trị  $T_m$  cao hơn là có lợi đối với các thuốc protein trị liệu vì giá trị  $T_m$  cao duy trì cấu trúc hoạt tính ở nhiệt độ sinh lý.

Ví dụ 12: Kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự gắn kết của Nrp1 với VEGF

Các tác giả sáng chế đã chứng minh thêm rằng kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL) có thể gắn kết với Nrp1 người, thậm chí trong trường hợp VEGF có mặt và gắn kết với Nrp1 trong thử nghiệm cạnh tranh.

Nhằm mục đích này, yếu tố sinh trưởng nội mô mạch người được biotinyl hóa 165 (hVEGF165) được bắt giữ trên đầu cảm biến streptavidin (Molecular Devices, LLC. San Jose CA) bằng cách nhúng chìm mỗi cảm biến trong 10ug/mL dung dịch hVEGF165 được biotinyl hóa được điều chế trong 1x dung dịch đệm động học (Molecular Devices) trong 2 phút trong đĩa mẫu. Sau đó các cảm biến được di chuyển vào các lỗ có 1x dung dịch đệm động học để rửa trôi các phân tử không liên kết trong 2 phút. 100nM Nrp1 người được chuẩn bị trong 1x dung dịch đệm động học sau đó được bắt giữ qua hVEGF165 trong 10 phút. Cuối cùng, các cảm biến được nhúng chìm trong các dung dịch nồng độ khác nhau của kháng thể theo sáng chế (100nM và 400nM) trong 10 phút.

Dữ liệu từ các cảm biến hoạt động được so sánh với một số đối chứng không chứa bất kỳ hVEGF165, không chứa hNrp1 và không chứa kháng thể.

Dữ liệu thể hiện rằng kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết với Nrp1 người, thậm chí trong trường hợp VEGF có mặt và gắn kết với Nrp1 (Fig.4).

Điều này chỉ ra rằng kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự gắn kết của VEGF và Nrp1 người.

Ví dụ 13: Kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự tăng sinh tế bào nội mô cảm ứng bởi VEGF-A

VEGF-A là một trong số các yếu tố sinh trưởng quan trọng nhất đối với các tế bào nội mô mà cảm ứng sự tăng sinh. Sự tăng sinh tế bào nội mô được nghiên cứu trên các tế bào nội mô vi mạch võng mạc của người (human retinal microvascular endothelial cells - HRMEC) sử dụng hệ thống Incucyte (Sartorius). Trong thử nghiệm chức năng này, việc bổ sung protein VEGF-A tái tổ hợp vào lớp hợp dòng phụ của HRMEC cảm ứng sự tăng sinh của chúng.

Ngắn gọn là, các đĩa 96 lỗ được phủ bằng gelatin. Các tế bào được gieo cấy với mật độ 3000 tế bào/lỗ và sau đó được để gắn kết trong môi trường sinh trưởng nội mô đầy đủ trong 18 giờ. Các tế bào được rửa một lần bằng môi trường cơ sở nội mô được bổ sung 2% FCS và sau đó được ủ trong môi trường giống như vậy trong 8 giờ. VEGF-A và/hoặc các kháng thể, bao gồm kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL) được bổ sung và các tế bào được để sinh trưởng bên trong thiết bị Incucyte. Hình ảnh tương phản pha được chụp 4 giờ một lần trong tổng số 96 giờ. Các hình ảnh được sử dụng để đánh giá số lượng tế bào. Số lượng tế bào được chuẩn hóa đến thời điểm trước khi bổ sung các chất. Diện tích dưới đường cong được tính từ các đường cong sinh trưởng và các giá trị cơ sở được trừ đi (Fig.5).

Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự tăng sinh tế bào nội mô cảm ứng bởi 10ng/mL VEGF-A, trong khi đó aflibercept bẫy VEGF (Eylea®) thể hiện sự giảm phụ thuộc liều sự tăng sinh HRMEC cảm ứng bởi VEGF-A.

Ví dụ 14: Thử nghiệm hình thành mạng cảm ứng bởi VEGF - Hiệu quả của kháng thể theo sáng chế trong việc hình thành cấu trúc giống mạng nội mô cảm ứng bởi VEGF-A trong nuôi cấy đồng thời với các nguyên bào sợi và so sánh giữa kháng thể theo sáng chế và bẫy VEGF

VEGF-A là yếu tố điều hòa chính của sự hình thành mạch, cảm ứng một cách có hiệu lực sự sinh trưởng của các mạch máu mới từ các mạch máu có trước. Sự hình thành mạch có thể được đo *in vitro* dưới dạng khả năng của các tế bào nội mô trong việc sắp xếp các cấu trúc giống mạng, khi được nuôi cấy trên đỉnh của lớp tế bào nguyên bào sợi. Sự hình thành mạng có thể được định lượng sau khi nhuộm tế bào nội mô dấu chuẩn CD31.

Các tác giả sáng chế đã đánh giá và so sánh khả năng ngăn ngừa sự hình thành mạng nội mô cảm ứng bởi VEGF của:

- kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL), và
- kháng thể kháng VEGF (bevacizumab, Avastin®).

Chính xác hơn là, hoạt tính tế bào của các hợp chất nêu trên trong việc ngăn ngừa sự hình thành mạng nội mô cảm ứng bởi VEGF được đánh giá bằng khả năng của chúng trong việc ngăn ngừa sự hình thành các cấu trúc mạng nội mô cảm ứng bởi VEGF-A trong nuôi cấy đồng thời với các nguyên bào sợi. HUVEC biểu hiện nội sinh Neuropilin-1 (Nrp1) và VEGFR2, là các thành phần của thụ thể toàn phần VEGF. Trong thử nghiệm chức năng này, việc bổ sung protein VEGF-A tái tổ hợp vào các tế bào nội mô được gieo cấy trên đỉnh của lớp hợp dòng của các nguyên bào sợi làm gia tăng sự hình thành các mạng nội mô.

Ngắn gọn là, các nguyên bào sợi da người bình thường từ bao quy đầu của thanh thiếu niên (normal human dermal fibroblast - NHDF) được gieo cấy trong các đĩa 96 lỗ CellCarrier Ultra ở mật độ 25000 tế bào/lỗ trong hỗn hợp của môi trường EGM và FGM-2 với các phần bằng nhau. Các NHDF được nuôi cấy trong các điều kiện sinh trưởng bình thường trong 7 ngày với một lần thay đổi môi trường. Môi trường được loại bỏ và các tế bào nội mô tĩnh mạch rốn của người (human umbilical vein endothelial cell - HUVEC) được gieo cấy ở mật độ 5000 tế bào/lỗ trong hỗn hợp EGM/EBM 1/10 trên đỉnh của các NHDF.

Các HUVEC được để gắn trong thiết bị ủ trong 4 giờ. Môi trường được loại bỏ và các tế bào sau đó được kích thích bằng VEGF-A người tái tổ hợp ở nồng độ cố định và các đường cong đáp ứng nồng độ của các kháng thể trong môi trường EGM/EBM 1/10. Các tế bào được nuôi cấy trong 7 ngày trong điều kiện nuôi cấy bình thường với sự thay đổi sang môi trường kích thích mới được chuẩn bị ở ngày 3.

Sau đó các tế bào được cố định trong 70% Etanol/H<sub>2</sub>O trên đá trong 30 phút, sau đó phong bế trong 30 phút trong DPBS + 1% BSA. Các tế bào nội mô được nhuộm bằng kháng thể CD31 (Miltenyi 130-108-038) trong 60 phút ở nhiệt độ trong

phòng. Sau khi rửa 3 lần bằng DPBS, kháng thể thứ cấp được gắn nhãn 488 (kháng thể kháng IgG của chuột PAb-A488 PLUS; Thermo A32723) và Hoechst được bổ sung và ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Các tế bào được rửa 3 lần bằng DPBS. Các đĩa được chụp ảnh sử dụng Opera Phenix với 5x vật kính không khí ở các kênh đối với AF488 và Hoechst. Việc nhuộm Hoechst của nhân chỉ có tác dụng xác nhận rằng các lớp tế bào là nguyên vẹn sau quy trình nhuộm, nhưng không được đưa vào quá trình phân tích hình ảnh. Vùng mạng dương tính với 488 trên mỗi lỗ được tính bằng cách sử dụng phần mềm Harmony 4.9.

Để xác định hiệu lực chức năng,  $IC_{50}$  của các kháng thể để ngăn ngừa sự hình thành mạng nội mô cảm ứng bởi nồng độ cố định của VEGF-A người tái tổ hợp được đo.

Vùng mạng cảm ứng bởi VEGF-A được tính (= vùng mạng cảm ứng bởi VEGF-A trung bình - vùng mạng cơ sở trung bình) và được đặt là 100%. Các kết quả được thể hiện trên Fig.6.

Dữ liệu được thể hiện liên quan đến tác dụng VEGF-A là giá trị trung bình  $\pm$  SD. Giá trị trung bình hình học của các giá trị  $IC_{50}$  của các thử nghiệm riêng rẽ được tính. Hiệu quả tối đa được tính ở các nồng độ kháng thể cao nhất dưới dạng phần trăm ức chế của vùng mạng cảm ứng bởi VEGF và giá trị trung bình được tính. Kết quả được tổng kết trong bảng 14.

Bảng 14:

|                         | Hiệu quả<br>(phần trăm ức chế) | Hiệu lực<br>$IC_{50}$ (nM) |
|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Kháng thể theo sáng chế | 12,6                           | Không áp dụng được         |
| Avastin®                | 84,2                           | 0,25                       |

Các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế không có tác dụng đáng kể đối với sự hình thành mạch *in vitro* cảm ứng bởi VEGF-A. Ngược lại, bẫy VEGF (bevacizumab, Avastin®) ngăn ngừa một cách có hiệu quả và có hiệu lực sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF-A.

Các kết quả này xác nhận tính chất bất ngờ và đáng ngạc nhiên của kháng thể theo sáng chế là không tác động đến sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF-A, trong khi ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A.

Ví dụ 15: Sự tân tạo mạch màng mạch cảm ứng bởi laze ở chuột Brown Norway - Hiệu quả của kháng thể theo sáng chế đối với sự tân tạo mạch màng mạch cảm ứng bởi laze ở chuột Brown Norway và so sánh giữa kháng thể theo sáng chế và bẫy VEGF

VEGF-A là yếu tố điều hòa chính của sự hình thành mạch, cảm ứng một cách có hiệu lực sự sinh trưởng của các mạch máu mới từ các mạch máu có trước. Sự hình thành mạch có thể được đo ở mắt *in vivo* dưới dạng sự tân tạo mạch màng mạch phụ thuộc VEGF-A sau khi tạo ra các tổn thương ở biểu mô sắc tố võng mạc (retinal pigment epithelium - RPE) và màng Bruch bằng sự quang đông laze. Sự tân tạo mạch có thể được định lượng sau khi nhuộm các tổn thương bằng isolectin B4 ở các flatmount của RPE, màng mạch và màng cứng. Mô hình thử nghiệm *in vivo* này dựa vào tổn thương do laze để đục lỗ màng Bruch, dẫn đến tuyến mộ mạch máu dưới võng mạc từ màng mạch. Điều này chứng minh là hữu dụng cho thử nghiệm các liệu pháp chống tạo mạch thử nghiệm.

Các tác giả sáng chế đã đánh giá và so sánh tác dụng đối với sự tân tạo mạch màng mạch cảm ứng bởi laze của:

- kháng thể ví dụ theo sáng chế (dòng I có trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 10 làm VH và trình tự được mô tả trong SEQ ID NO: 11 làm VL), và
- bẫy VEGF (aflibercept, Eylea®).

Các con chuột đực Brown Norway (BN/Crl) có thể trọng nằm trong khoảng từ 160 g đến 180 g được mua từ Charles River Labs (Sulzfeld, Germany). Trong điều kiện gây mê, các con vật được đặt trước một máy quay đáy mắt để định vị dây thần kinh thị giác ở trung tâm của hình ảnh. Việc xử lý laze được thực hiện với laze Argon xanh lá (Merilas) có bước sóng 532 nm sử dụng hệ thống Micron IV (Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA).

Đường kính của chùm tia laze được khớp với đường kính của dây thần kinh thị giác và các xung laze có năng lượng 400 mW và thời gian 150 mili giây được sử dụng để tạo ra 4 tổn thương trên mỗi mắt.

Các tổn thương được đặt giữa các mạch máu lớn với khoảng cách từ dây thần kinh thị giác khoảng gấp đôi đường kính của nó. Sự phá vỡ thành công màng Bruch

được ghi nhận bằng sự tạo thành các bong bóng ngay sau khi chiếu chùm laze và được xác nhận bằng việc quét OCT.

Để tiêm nội nhãn, các con chuột được gây mê bằng cách tiêm vào màng bụng ketamin (67 mg/kg) và xylazin (6,7 mg/kg). Các đồng tử được làm giãn nở bằng cách dùng tại chỗ thuốc nhỏ mắt Mydrum và ngoài ra, các con vật nhận cả thuốc nhỏ mắt giảm đau (Novesine 0,4%). Việc tiêm nội nhãn được thực hiện bằng kim tiêm 34G Hamilton ở khớp Ora serrata. Mỗi mắt nhận hai liều tiêm nội nhãn với thể tích 5  $\mu$ l. Lần tiêm nội nhãn thứ nhất được thực hiện ngay sau khi xử lý laze (trong cùng quá trình gây mê) vào ngày 1, và lần tiêm nội nhãn thứ hai được thực hiện vào ngày 8.

Các con vật được làm chết 14 ngày sau khi xử lý laze bằng cách làm gãy khớp cổ trong điều kiện gây mê. Các mắt được khoét nhãn và cắt dọc theo khớp Ora serrata. Giác mạc, mống mắt, kính áp tròng, thủy tinh thể và võng mạc được lấy ra và cốc mắt còn lại (bao gồm RPE, màng mạch và màng cứng) được cố định trong PFA (4%) trong 1 giờ ở 4°C và sau đó được chuyển vào PBS chứa 0,1% Triton X-100 trong 1 giờ ở 4°C. Trong bóng tối ở nhiệt độ phòng, cốc mắt được nhuộm qua đêm bằng isolectin B4 gắn nhãn FITC (10  $\mu$ g/ml trong dung dịch nước muối) và rửa 3 lần bằng PBS. Cốc mắt này được chuyển đến lam kính và cắt bốn lần để thu được cấu trúc phẳng giống như cỏ ba lá. Mô được phủ bằng môi trường gắn kết (Vectashield H-1200 chứa DAPI) và tấm che phủ được đặt lên đỉnh để thu được flatmount RPE/màng mạch/màng cứng (phía RPE hướng lên). Các mẫu được phân tích ở bước sóng 488 nm bằng kính hiển vi-quét laze đồng tiêu LSM 700 (Carl Zeiss, Jena) và kích thước tổn thương được xác định bằng phân tích hình ảnh.

Các kết quả được thể hiện trên Fig.7. Kháng thể theo sáng chế không có tác dụng đối với vùng tổn thương trong khi bất VEGF Eylea® làm giảm vùng tổn thương khoảng 24%. Do đó, kháng thể theo sáng chế không ảnh hưởng đến sự tân tạo mạch màng mạch phụ thuộc VEGF-A ở chuột Brown Norway.

Các kết quả này xác nhận rằng kháng thể theo sáng chế không ức chế sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF-A. Điều này xác nhận rằng kháng thể theo sáng chế là cực kỳ có ích trong tình huống lâm sàng trong đó sự tái phân phối mạch được thúc đẩy, ví dụ ở bệnh nhân bị thiếu máu cục bộ hoàng điểm do tiểu đường mà sẽ có lợi từ sự tái phân phối mạch của võng mạc.

Như được giải thích trong phần mô tả sáng chế, kháng thể theo sáng chế ức chế tác dụng đẩy mạch của Sema3A, do đó cho phép chuyển hướng sự hình thành mạch đến các vùng thiếu máu cục bộ. Ngoài ra, nó còn ngăn ngừa sự phá vỡ hàng rào máu võng mạc cảm ứng một mặt là bởi Sema3A và mặt khác là bởi VEGF-A.

Mặc dù có tác động ức chế đối với khả năng thấm của hàng rào máu võng mạc cảm ứng bởi VEGF-A, nhưng kháng thể theo sáng chế ngạc nhiên là lại không có tác động đối với sự hình thành mạch cảm ứng bởi VEGF-A.

Do đó, như được thể hiện ở đây, kháng thể theo sáng chế không ngăn ngừa sự tái phân phối mạch, điều này chỉ ra rằng nó không cản trở sự hình thành mạch của các vùng thiếu máu cục bộ. Do đó, các kết quả này xác nhận rằng kháng thể theo sáng chế là rất có lợi để cải thiện sự tái phân phối mạch của vùng không mạch thiếu máu cục bộ, điển hình là ở võng mạc của các bệnh nhân bị PDR, đặc biệt là bị DMI.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng miền A của Neuropilin-1 (Nrp1A) hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa 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 của chuỗi nhẹ chứa 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 Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin tương đồng ít nhất 95% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

3. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các trình tự axit amin của SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 hoặc SEQ ID NO: 17; và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

4. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 hoặc SEQ ID NO: 25; và

chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

5. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- b. chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- c. chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- d. chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- e. chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- f. chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19; hoặc
- g. chuỗi nặng chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và chuỗi nhẹ chỉ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

6. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- a. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- b. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- c. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- d. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- e. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19;
- f. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ chứa trình tự

axit amin của SEQ ID NO: 19; hoặc

g. chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

7. Kháng thể kháng Nrp1A theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 4 và 6, chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

8. Kháng thể kháng Nrp1A theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 4 và 6, chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

9. Kháng thể kháng Nrp1A theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 4 và 6, chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

10. Kháng thể kháng Nrp1A theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 4 và 6, chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

11. Kháng thể kháng Nrp1A theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 4 và 6, chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

12. Kháng thể kháng Nrp1A theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 4 và 6, chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

13. Kháng thể kháng Nrp1A theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 4 và 6, chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

14. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin

của SEQ ID NO: 10 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

15. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

16. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 13 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

17. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

18. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

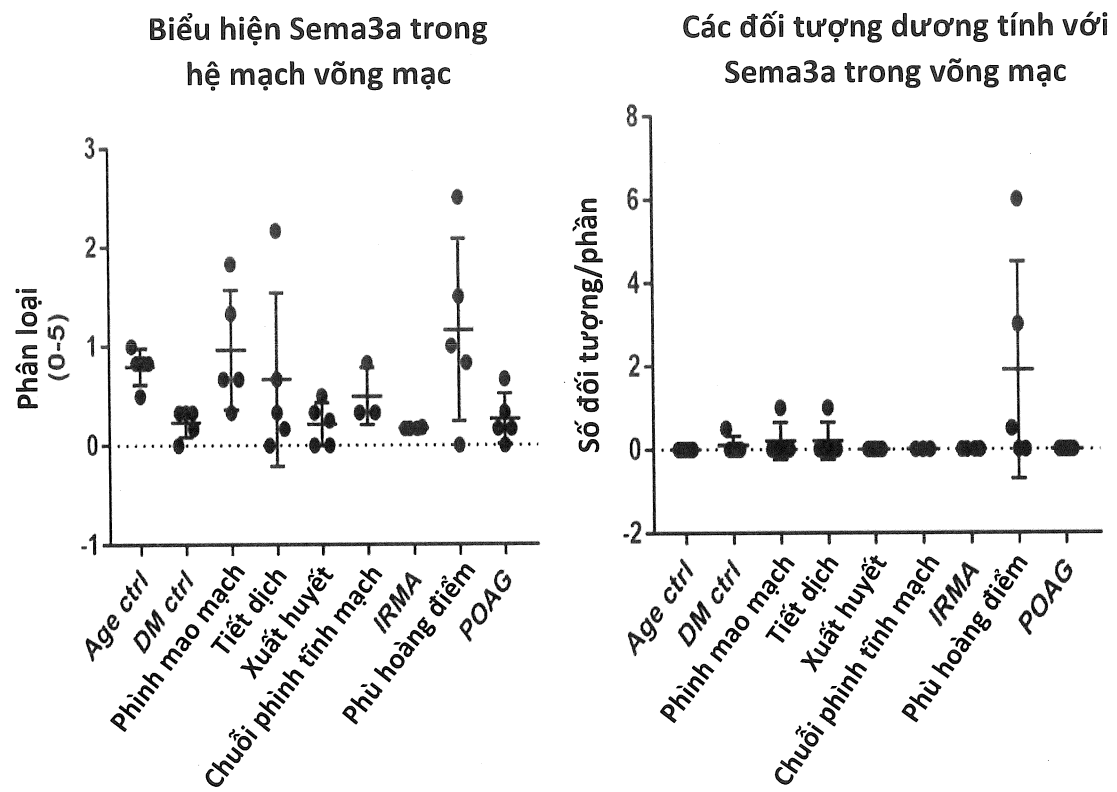
19. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

20. Kháng thể kháng Nrp1A hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 3, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11.

21. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó và chất mang dược dụng.

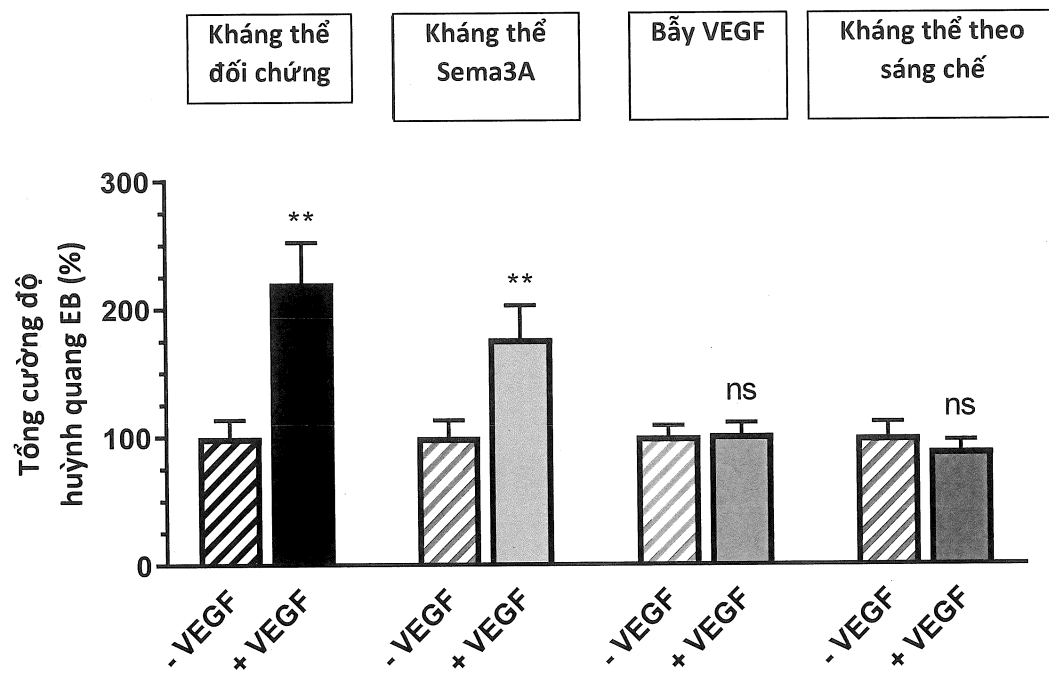
1/7

FIG.1



2/7

FIG.2



3/7

FIG.3

FIG.3A

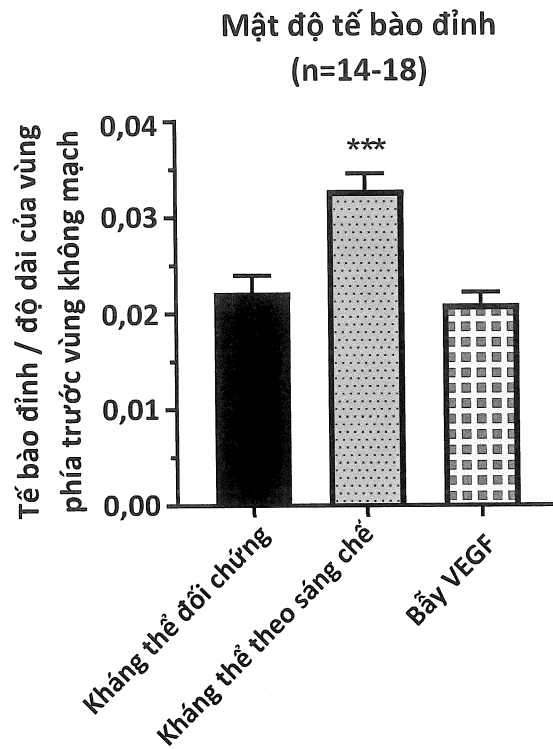
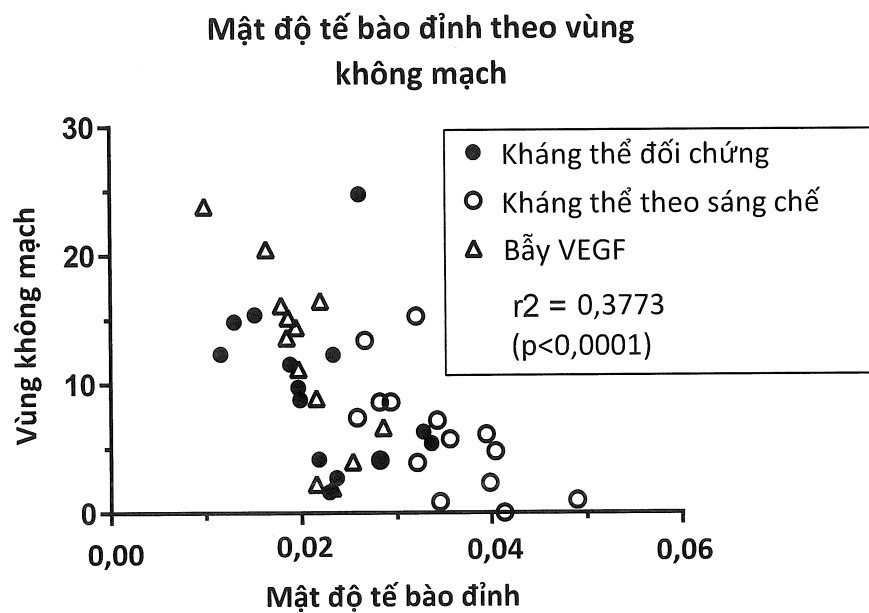


FIG.3B



4/7

FIG.3C

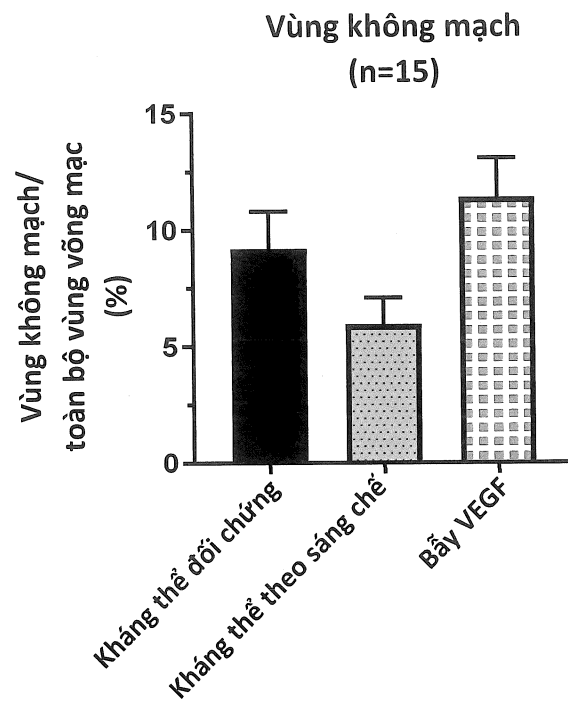
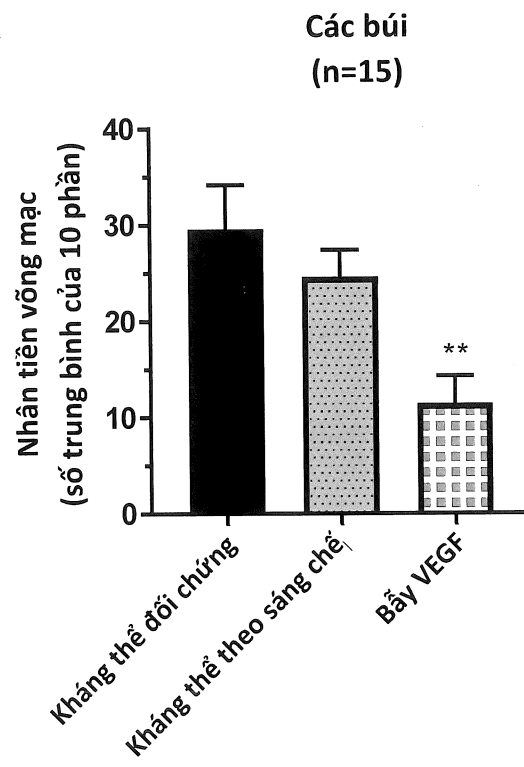
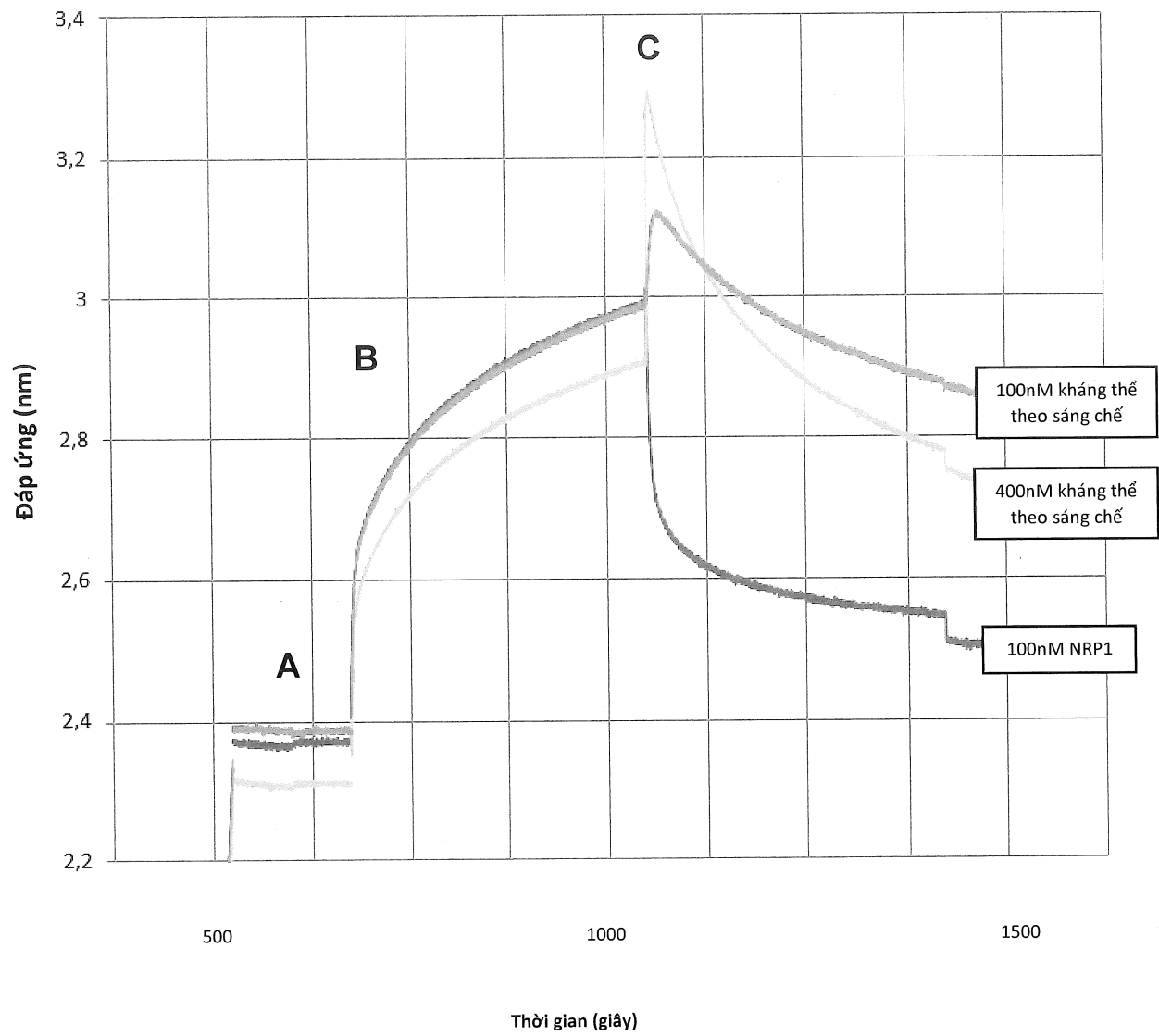


FIG.3D



5/7

FIG.4



6/7

FIG.5

## Sự tăng sinh HRMEC cảm ứng bởi VEGF-A

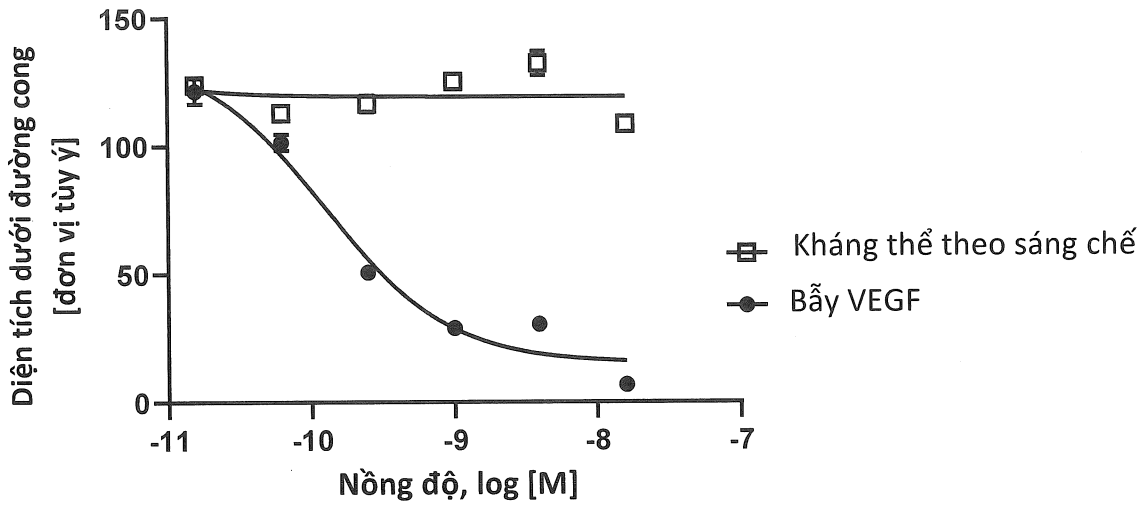
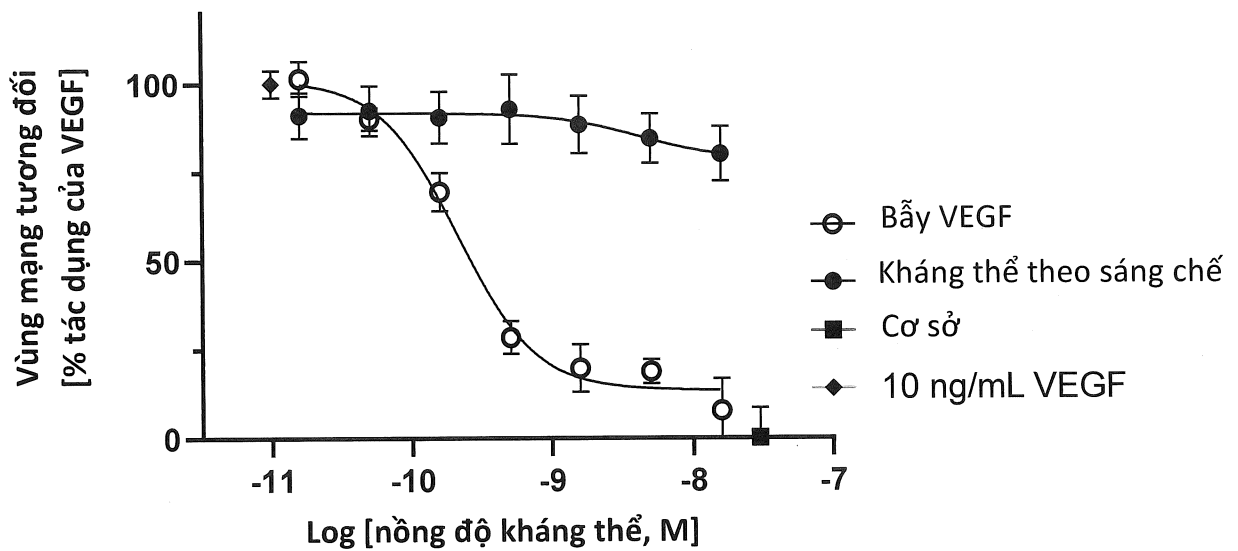


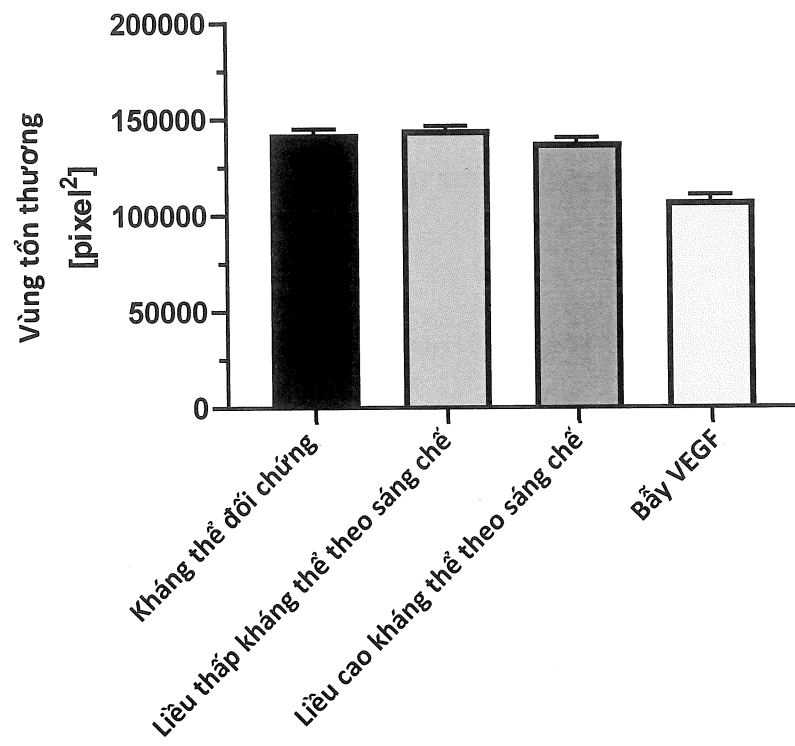
FIG.6

## Sự hình thành mạng nội mô cảm ứng bởi VEGF-A



7/7

FIG.7



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Boehringer Ingelheim International GMBH

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG NRPIA ĐỂ ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH VỀ MẮT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 01-3397

<150> EP20150942.9

<151> 2020-01-09

<150> EP19199099.3

<151> 2019-09-24

<160> 35

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1

5

10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2

<400> 2

Ser Ile Ser Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly

1

5

10

15

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3

<400> 3

Val Gly Thr Ala Phe 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 Ser Ser Tyr Leu Asn

1                      5                      10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1                      5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1

5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 - Kabat

<400> 7

Ser Tyr Ala Met Ser

1

5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 - Chothia

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1

5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 - Chothia

<400> 9

Ser Arg Thr Gly Tyr

1

5

<210> 10

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH - biến thể 1

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

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

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL - biến thể a

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                          5                          10                          15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
                           20                          25                          30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                           35                          40                          45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

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

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH - biến thể 2

<400> 12

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

Arg Val Gly Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
                   100                  105                  110  
 Val Ser Ser  
                   115

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH - biến thể 3

<400> 13

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

115

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH- biến thể 4

&lt;400&gt; 14

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys

50

55

60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65

70

75

80

Gln Met Gln Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Val Gly Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

&lt;210&gt; 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH- biến thể 5

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Arg Thr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Val Gly Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH- biến thể 6

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VH- biến thể 7

<400> 17

```

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

```

<210> 18

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng - Dòng I

<400> 18

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

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

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ - Dòng I

<400> 19

```

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

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng - Dòng II

<400> 20

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

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440

<210> 21

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng - Dòng III

<400> 21

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Gln Thr Leu Tyr Leu |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala |     | 80  |
|                                                                 | 85  | 90  |
| Arg Val Gly Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr |     | 95  |
|                                                                 | 100 | 105 |
| Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro |     | 110 |
|                                                                 | 115 | 120 |
| Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val |     | 125 |
|                                                                 | 130 | 135 |
| Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala |     | 140 |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly |     | 160 |
|                                                                 | 165 | 170 |
| Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly |     | 175 |
|                                                                 | 180 | 185 |
| Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys |     | 190 |
|                                                                 | 195 | 200 |
| Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys |     | 205 |
|                                                                 | 210 | 215 |
| Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu |     | 220 |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu |     | 240 |
|                                                                 | 245 | 250 |
| Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys |     | 255 |
|                                                                 | 260 | 265 |
| Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys |     | 270 |
|                                                                 | 275 | 280 |
| Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu |     | 285 |

<210> 22

$\langle 211 \rangle$  444

&lt;212&gt; PRT

### <213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Chuỗi nặng- Dòng IV

<400> 22

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

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

<210> 23

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng- Dòng V

<400> 23

```

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

```

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

420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440

<210> 24

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng- Dòng VI

<400> 24

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

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln  
 405 410 415  
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 420 425 430  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440

<210> 25

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng- Dòng VII

<400> 25

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

|                                                                 |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65                                                              |     | 70  |     | 75  |     | 80  |
| Gln Met Gln Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 85  |     | 90  |     | 95  |     |
| Arg Val Gly Thr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 100 |     | 105 |     | 110 |     |
| Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 115 |     | 120 |     | 125 |     |
| Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 130 |     | 135 |     | 140 |     |
| Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala |     |     |     |     |     |     |
| 145                                                             |     | 150 |     | 155 |     | 160 |
| Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 165 |     | 170 |     | 175 |     |
| Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 180 |     | 185 |     | 190 |     |
| Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 195 |     | 200 |     | 205 |     |
| Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 210 |     | 215 |     | 220 |     |
| Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu |     |     |     |     |     |     |
| 225                                                             |     | 230 |     | 235 |     | 240 |
| Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 245 |     | 250 |     | 255 |     |
| Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 260 |     | 265 |     | 270 |     |
| Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 275 |     | 280 |     | 285 |     |
| Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 290 |     | 295 |     | 300 |     |
| Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys |     |     |     |     |     |     |

29

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

Gly Phe Ser Ala Asn Tyr Ser Val Leu Gln Ser Ser Val Ser Glu Asp  
 260 265 270  
 Phe Lys Cys Met Glu Ala Leu Gly Met Glu Ser Gly Glu Ile His Ser  
 275 280 285  
 Asp Gln Ile Thr Ala Ser Ser Gln Tyr Ser Thr Asn Trp Ser Ala Glu  
 290 295 300  
 Arg Ser Arg Leu Asn Tyr Pro Glu Asn Gly Trp Thr Pro Gly Glu Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Tyr Arg Glu Trp Ile Gln Val Asp Leu Gly Leu Leu Arg Phe Val  
 325 330 335  
 Thr Ala Val Gly Thr Gln Gly Ala Ile Ser Lys Glu Thr Lys Lys Lys  
 340 345 350  
 Tyr Tyr Val Lys Thr Tyr Lys Ile Asp Val Ser Ser Asn Gly Glu Asp  
 355 360 365  
 Trp Ile Thr Ile Lys Glu Gly Asn Lys Pro Val Leu Phe Gln Gly Asn  
 370 375 380  
 Thr Asn Pro Thr Asp Val Val Val Ala Val Phe Pro Lys Pro Leu Ile  
 385 390 395 400  
 Thr Arg Phe Val Arg Ile Lys Pro Ala Thr Trp Glu Thr Gly Ile Ser  
 405 410 415  
 Met Arg Phe Glu Val Tyr Gly Cys Lys Ile Thr Asp Tyr Pro Cys Ser  
 420 425 430  
 Gly Met Leu Gly Met Val Ser Gly Leu Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr  
 435 440 445  
 Ser Ser Asn Gln Gly Asp Arg Asn Trp Met Pro Glu Asn Ile Arg Leu  
 450 455 460  
 Val Thr Ser Arg Ser Gly Trp Ala Leu Pro Pro Ala Pro His Ser Tyr  
 465 470 475 480  
 Ile Asn Glu Trp Leu Gln Ile Asp Leu Gly Glu Glu Lys Ile Val Arg  
 485 490 495

Gly Ile Ile Ile Gln Gly Gly Lys His Arg Glu Asn Lys Val Phe Met  
 500 505 510  
 Arg Lys Phe Lys Ile Gly Tyr Ser Asn Asn Gly Ser Asp Trp Lys Met  
 515 520 525  
 Ile Met Asp Asp Ser Lys Arg Lys Ala Lys Ser Phe Glu Gly Asn Asn  
 530 535 540  
 Asn Tyr Asp Thr Pro Glu Leu Arg Thr Phe Pro Ala Leu Ser Thr Arg  
 545 550 555 560  
 Phe Ile Arg Ile Tyr Pro Glu Arg Ala Thr His Gly Gly Leu Gly Leu  
 565 570 575  
 Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ala Gly Pro  
 580 585 590  
 Thr Thr Pro Asn Gly Asn Leu Val Asp Glu Cys Asp Asp Asp Gln Ala  
 595 600 605  
 Asn Cys His Ser Gly Thr Gly Asp Asp Phe Gln Leu Thr Gly Gly Thr  
 610 615 620  
 Thr Val Leu Ala Thr Glu Lys Pro Thr Val Ile Asp Ser Thr Ile Gln  
 625 630 635 640  
 Ser Glu Phe Pro Thr Tyr Gly Phe Asn Cys Glu Phe Gly Trp Gly Ser  
 645 650 655  
 His Lys Thr Phe Cys His Trp Glu His Asp Asn His Val Gln Leu Lys  
 660 665 670  
 Trp Ser Val Leu Thr Ser Lys Thr Gly Pro Ile Gln Asp His Thr Gly  
 675 680 685  
 Asp Gly Asn Phe Ile Tyr Ser Gln Ala Asp Glu Asn Gln Lys Gly Lys  
 690 695 700  
 Val Ala Arg Leu Val Ser Pro Val Val Tyr Ser Gln Asn Ser Ala His  
 705 710 715 720  
 Cys Met Thr Phe Trp Tyr His Met Ser Gly Ser His Val Gly Thr Leu  
 725 730 735

Arg Val Lys Leu Arg Tyr Gln Lys Pro Glu Glu Tyr Asp Gln Leu Val  
 740 745 750  
 Trp Met Ala Ile Gly His Gln Gly Asp His Trp Lys Glu Gly Arg Val  
 755 760 765  
 Leu Leu His Lys Ser Leu Lys Leu Tyr Gln Val Ile Phe Glu Gly Glu  
 770 775 780  
 Ile Gly Lys Gly Asn Leu Gly Gly Ile Ala Val Asp Asp Ile Ser Ile  
 785 790 795 800  
 Asn Asn His Ile Ser Gln Glu Asp Cys Ala Lys Pro Ala Asp Leu Asp  
 805 810 815  
 Lys Lys Asn Pro Glu Ile Lys Ile Asp Glu Thr Gly Ser Thr Pro Gly  
 820 825 830  
 Tyr Glu Gly Glu Gly Glu Gly Asp Lys Asn Ile Ser Arg Lys Pro Gly  
 835 840 845  
 Asn Val Leu Lys Thr Leu Asp Pro Ile Leu Ile Thr Ile Ile Ala Met  
 850 855 860  
 Ser Ala Leu Gly Val Leu Leu Gly Ala Val Cys Gly Val Val Leu Tyr  
 865 870 875 880  
 Cys Ala Cys Trp His Asn Gly Met Ser Glu Arg Asn Leu Ser Ala Leu  
 885 890 895  
 Glu Asn Tyr Asn Phe Glu Leu Val Asp Gly Val Lys Leu Lys Lys Asp  
 900 905 910  
 Lys Leu Asn Thr Gln Ser Thr Tyr Ser Glu Ala  
 915 920

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> Người hiện đại

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Epitop

&lt;400&gt; 27

Met Ile Asn Phe Asn Pro His Phe Asp Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 449

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; YW64.3- HC

&lt;400&gt; 28

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 Ser Phe Ser Ser Glu

20 25 30

Pro Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445  
 Lys

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> YW64.3-LC

<400> 29

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

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

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; YW64.3-VH

&lt;400&gt; 30

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

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> YW64.3-VL

<400> 31

```

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

```

<210> 32

<211> 453

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> YW107.4.87- HC

<400> 32

```

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

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270  
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 33

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> YW107.4.87- LC

<400> 33

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Gly Ser Pro Pro
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 34

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> YW107.4.87- VH

<400> 34

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 35

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> YW107.4.87- VL

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Gly Ser Pro Pro

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105