



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

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

(11)



1-0048384

(51)^{2020.01} C07K 16/28; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2020-03103

(22) 28/11/2018

(86) PCT/US2018/062863 28/11/2018

(87) WO2019/108662 A1 06/06/2019

(30) 62/592,657 30/11/2017 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2020 392A

(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591 (US)

(72) CROLL Susan D. (US); GAO Min (US); HU Ying (US).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP HOẶC ĐOẠN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN
CỦA NÓ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI THỤ THỂ TROPOMYOSIN KINAZA B VÀ
ĐƯỢC PHÂN CHỨA CHÚNG

(21) 1-2020-03103

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết đặc hiệu với TrkB và các phương pháp sử dụng các kháng thể này. Bộc lộ. Các kháng thể chủ vận có tác dụng bảo vệ thần kinh, như được thể hiện qua tác dụng của chúng trong việc tăng cường khả năng sống sót của các tế bào hạch võng mạc *in vitro* là đã được bộc lộ, và các kháng thể chủ vận này có thể được sử dụng trong điều trị, chẳng hạn như các rối loạn về mắt, bao gồm cả bệnh tăng nhãn áp. Ngoài ra, các bệnh hoặc rối loạn thần kinh khác có được lợi ích từ việc điều trị bằng các kháng thể chủ vận này, bao gồm cả những bệnh được đặc trưng một phần bởi tổn thương tế bào thần kinh. Theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể liên kết TrkB và làm trung gian dẫn truyền tín hiệu tế bào. Các kháng thể của sáng chế có thể là các kháng thể hoàn toàn người, không có trong tự nhiên, được tạo chế phẩm với các tá dược để tiêm.

Lĩnh vực sáng chế được đề cập

Sáng chế liên quan đến các kháng thể đơn dòng kháng tropomyosin-receptor-kinaza B (TrkB). Cụ thể hơn, sáng chế liên quan đến các chế phẩm có chứa các kháng thể đơn dòng kháng TrkB và phương pháp sử dụng các kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể tropomyosin kinaza B (TrkB) thuộc họ thụ thể tyrosin kinaza xuyên màng đơn, bao gồm TrkA và TrkC. Những thụ thể kinaza này làm trung gian cho hoạt động của các tế bào thần kinh, mà chúng cần thiết cho sự sống sót và phát triển của tế bào thần kinh. Các tế bào thần kinh bao gồm, nhưng không giới hạn ở: yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF), yếu tố thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF), tế bào thần kinh-3 (NT-3), và tế bào thần kinh-4/5 (NT-4/5). (Lo, K Y et al., J. Biol. Chem., 280:41744-52 (2005)).

TrkB là thụ thể có ái lực cao đối với BDNF (Minichiello et al., Neuron 21: 335-45 (1998)), nhưng nó cũng được biết là tạo liên kết với NT4/5. Liên kết của BDNF với trkB làm cho thụ thể giảm dần, dẫn đến sự tự phosphoryl hóa các gốc tyrosin cụ thể trên thụ thể và sự hoạt hoá các con đường dẫn truyền tín hiệu có chứa protein kinaza hoạt hoá phân bào (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinaza (PI3), và phospholipaza C- γ (PLC- γ). (Jinget al. Neuron 9: 1067-1079 (1992); Barbacid, J. Neurobiol. 25: 1386-1403 (1994); Bothwell, Ann. Rev. Neurosci. 18: 223 253 (1995); Segal và Greenberg, Ann. Rev. Neurosci. 19: 463 489 (1996); Kaplan và Miller, Curr. Opinion Neurobiol. 10: 381 391 (2000)). Sau khi liên kết với BDNF thì TrkB làm trung gian cho nhiều tác động đến tế bào thần kinh, bao gồm sự biệt hóa và sống sót của tế bào thần kinh.

Vì TrkB đóng vai trò chính trong sự sống sót, biệt hóa và chức năng của tế bào thần kinh, nên các chất chủ vận TrkB có thể có tiềm năng trị liệu để điều trị

một số rối loạn thoái hóa thần kinh và rối loạn chuyển hóa.

Các chất chủ vận TrkB nhất định đã được mô tả trong US2010/0150914; US2003/0157099; US2010/0196390 và US2017/0157099. Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu đối với việc xác định và phát triển các chất chủ vận TrkB bổ sung mà cung cấp tính đặc hiệu được cải thiện cộng với thể hiện các đặc tính sống sót và bảo vệ thần kinh của các tế bào thần kinh, như được mô tả trong tài liệu này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế cung cấp các kháng thể đơn dòng được phân lập và các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với thụ thể tropomyosin-kinaza B (TrkB). Các kháng thể được phân lập và các mảnh gắn kết kháng nguyên của sáng chế rất hữu ích để điều trị các bệnh và các rối loạn liên quan đến hoạt tính hoặc biểu hiện của TrkB.

Theo khía cạnh rộng nhất của nó, sáng chế cung cấp các kháng thể chủ vận kháng TrkB, mà hoạt hóa TrkB và thúc đẩy sự sống sót của tế bào thần kinh. Những kháng thể này có thể được sử dụng để cải thiện chức năng thần kinh và điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ, được đặc trưng một phần bởi sự thoái hóa tế bào, bao gồm những hư tổn tế bào thần kinh liên quan đến thương tổn hệ thần kinh và/hoặc các bệnh thoái hóa thần kinh mạn tính.

Theo một số phương án nhất định, các kháng thể kháng TrkB có thể hữu ích để điều trị các bệnh hoặc rối loạn khác nhau của mắt và có thể được tạo chế phẩm để phân phối trong mắt hoặc nội hấp, để điều trị các bệnh về mắt, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, tăng nhãn áp.

Các kháng thể của sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ: kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ chứa một phần liên kết kháng nguyên (ví dụ: mảnh Fab, F(ab')₂ hoặc scFv) và có thể được cải biến để tác động đến chức năng, ví dụ, để loại bỏ các chức năng tác động gốc (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933).

Các kháng thể kháng TrkB điển hình của sáng chế được liệt kê trong Bảng 1 và 2 của tài liệu này. Bảng 1 đưa ra các nhận diện trình tự axit amin của các

vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), các vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và các vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng TrkB điển hình. Bảng 2 đưa ra các nhận diện trình tự axit nucleic của các HCVR, các LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của các kháng thể kháng TrkB điển hình.

Sáng chế cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa LCVR có trình tự axit amin được lựa chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa một cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR), có trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong bảng 1, được ghép đôi với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1. Theo một số phương án nhất định, sáng chế cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TrkB điển hình được liệt kê trong bảng 1.

Theo đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế cung cấp một kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với thụ thể tropomyosin kinaza B (TrkB), trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa ba vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các CDR) (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), được chứa trong vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình

tự axit amin như được nêu trong bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% kèm theo; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được chứa trong một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin như được nêu trong bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%.

Theo một phương án, kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn gắn kháng nguyên của nó thể hiện một hoặc nhiều đặc tính được chọn từ nhóm các đặc tính gồm có:

- (a) là một kháng thể chủ vận;
- (b) liên kết với TrkB người, với K_D nhỏ hơn khoảng 200nM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C;
- (c) liên kết với TrkB người với chu kỳ bán thải phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 10 phút khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc ở 37°C;
- (d) hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong trường hợp không có yếu tố tế bào thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện TrkB người với EC_{50} nằm trong khoảng từ 35 đến 82 pM;
- (e) tăng cường sự phosphoryl hóa TrkB khi tiêm vào trong đôi hải mã của đồng hợp tử chuột nhất bằng thụ thể TrkB người ($TrkB^{hu/hu}$);
- (f) thúc đẩy sự giảm khối lượng khi tiêm vào đồng hợp tử chuột nhất bằng thụ thể TrkB người ($TrkB^{hu/hu}$);
- (g) làm tăng khả năng sống sót của tế bào hạch võng mạc (RGC) khi được đánh giá trong mô hình chuyển đổi thần kinh thị giác ở chuột cống TrkB được làm cho giống người;
- (h) hoạt hoá các con đường dẫn truyền tín hiệu MAPK/ERK và PI3K/Akt;
- (i) làm tăng khả năng sống sót của các tế bào thần kinh *in vitro*; và
- (j) ngăn chặn liên kết của TrkB với BDNF và/hoặc NT-4, với IC_{50} nhỏ hơn 5nM.

Theo một phương án, sáng chế cung cấp kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với thụ thể tropomyosin kinaza B (TrkB), trong

đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: (a) vùng xác định bổ sung (CDR) của một vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin như được nêu trong bảng 1; và (b) các CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin như được nêu trong bảng 1.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB có chứa ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) được chứa trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 và 68, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% kèm theo; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 và 72, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% kèm theo.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 và 68.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 và 72.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 và 68; và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 và 72.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa các CDR của một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 và 68/72.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa các CDR của một cặp trình tự

axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 và 68/72.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26 và 34/42.

Theo một phương án, các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR1 được liệt kê trong bảng 1 hoặc một trình tự thay về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự về cơ bản tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự của nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin

LCDR1 được liệt kê trong bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự của nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR2 được liệt kê trong bảng 1 hoặc một trình tự về cơ bản tương tự của nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được liệt kê trong bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự của nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa cặp trình tự axit amin HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3), có trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong bảng 1 được ghép đôi với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, có chứa một cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TrkB điển hình được liệt kê trong bảng 1. Theo một số phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có: 8/16, 24/32, 40/48, 52/56, 62/66 và 71/75.

Sáng chế cũng cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa một bộ sáu CDR (ví dụ, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TrkB được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương

án nhất định, bộ trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 được chọn từ nhóm gồm có: (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14, 16; (b) SEQ ID NO: 20, 22, 24, 28, 30, 32; (c) SEQ ID NO: 36, 38, 40, 44, 46, 48; (d) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 54, 55, 56; (e) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 64, 65, 66; và (f) SEQ ID NO: 69, 70, 71, 73, 74, 75.

Theo phương án có liên quan, sáng chế cung cấp các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa một bộ sáu CDR (ví dụ, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3), được chứa trong một cặp trình tự axit HCR/LCR như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TrkB điển hình được liệt kê trong bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa bộ trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCD, LCDR3, được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 và 68/72. Phương pháp và kỹ thuật để nhận diện các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và LCVR được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để nhận diện các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được bộc lộ ở đây. Các phương pháp tiếp cận thông thường điển hình có thể được sử dụng để nhận diện ranh giới của các CDR bao gồm, ví dụ: xác định Kabat, xác định Chothia và xác định AbM. Nói chung, xác định Kabat là dựa trên tính biến đổi trình tự, xác định Chothia dựa trên vị trí của các vùng vòng lặp cấu trúc, và xác định AbM là sự kết hợp giữa các phương pháp tiếp cận Kabat và Chothia. Xem, ví dụ, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Cơ sở dữ liệu dùng chung cũng đã có sẵn để nhận diện các trình tự CDR trong kháng thể.

Theo một phương án, sáng chế cung cấp kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa:

(a) một miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm

gồm có SEQ ID NO: 4, 20, 36, 50, 60 và 69;

(b) một miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 6, 22, 38, 51, 61 và 70;

(c) một miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 8, 24, 40, 52, 62 và 71;

(d) một miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 12, 28, 44, 54, 64 và 73;

(e) một miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 14, 30, 46, 55, 65 và 74; và

(f) một miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 16, 32, 48, 56, 66 và 75.

Theo một phương án, sáng chế cung cấp kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa:

(a) một miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 4, 20 và 36;

(b) một miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 6, 22 và 38;

(c) một miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 8, 24 và 40;

(d) một miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 12, 28 và 44;

(e) một miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 14, 30 và 46; và

(f) một miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 16, 32 và 48.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, có chứa một bộ 6 CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) được chọn từ nhóm gồm có: (a) SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; (b) SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32; (c) SEQ ID NO: 36-38-40-44-46-48; (d) SEQ ID NO: 50-51-52-54-55-56; (e) SEQ ID NO: 60-61-62-64-65-66; và (f) SEQ

ID NO: 69-70-71-73-74-75.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB, có chứa một kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh với một kháng thể tham chiếu để liên kết với TrkB, trong đó kháng thể tham chiếu này có chứa một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 và 68/72.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB, có chứa một kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với cùng một epitope như kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu có chứa một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 và 68/72.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với K_D nhỏ hơn khoảng 300 nM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với K_D nhỏ hơn khoảng 200 nM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với K_D nhỏ hơn khoảng 150 nM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với K_D nhỏ hơn khoảng 50 nM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với K_D nhỏ hơn khoảng 100 pM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với thời gian bán thải phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 10 phút khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ

25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 40 phút khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 120 phút khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong trường hợp không có BDNF trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện TrkB, với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 100 pM.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong trường hợp không có BDNF trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện TrkB, với EC_{50} từ khoảng 35pM đến khoảng 82pM.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ tăng cường việc hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong trường hợp có BDNF trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện TrkB, với EC_{50} nhỏ hơn khoảng 100 pM.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB, khi được tiêm vào trong đôi hải mã của chuột nhắt TrkB được làm cho giống người, chứng minh sự hoạt hoá TrkB, như được thể hiện bằng sự tăng phosphoryl hóa TrkB.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB, chứng minh sự hoạt hoá các con đường dẫn truyền tín hiệu MAPK/ERK và PI3K/Akt, như đã được chứng minh sau khi ủ các tế bào thần kinh vỏ não nguyên phát chuột nhắt với một kháng thể chủ vận kháng TrkB.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ tăng cường/làm tăng khả năng sống sót của

các tế bào hạch võng mạc như thể hiện trong mô hình chuyển đổi thần kinh thị giác ở chuột cống TrkB được làm cho giống người.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ tăng cường/làm tăng khả năng sống sót của các tế bào thần kinh *in vitro*.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ thúc đẩy sự giảm khối lượng ở chuột nhắt TrkB được làm cho giống người.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ thúc đẩy sự giảm khối lượng mỡ ở chuột nhắt TrkB được làm cho giống người.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ thúc đẩy sự giảm mức tiêu thụ thức ăn và nước ở chuột nhắt TrkB được làm cho giống người.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB sẽ thúc đẩy sự tăng hoạt động vận động ở chuột nhắt TrkB được làm cho giống người.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB và ngăn chặn TrkB liên kết với DBNF, với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 5nM.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB và ngăn chặn TrkB liên kết với DBNF, với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 500pM.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB và ngăn chặn TrkB liên kết với DBNF, với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 200pM.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho các kháng thể kháng TrkB hoặc các phần của chúng. Ví dụ, sáng chế cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong bảng 1; theo một số phương án nhất định,

phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1; theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR1 được liệt kê trong bảng 1; theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR1 được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong bảng 1; theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR2 được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong bảng 1; theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR3 được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR1 được liệt kê trong bảng 1; theo

một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR1 được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR2 được liệt kê trong bảng 1; theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR2 được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong bảng 1; theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR3 được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho một HCVR, trong đó HCVR có chứa một bộ ba CDR (ví như HCDR1, HCDR2, HCDR3), trong đó bộ trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3 như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TRKB được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho một LCVR, trong đó LCVR có chứa một bộ ba CDR (ví như HCDR1, HCDR2, HCDR3), trong đó bộ trình tự axit amin LCDR1, LCDR2, LCDR3 như đã được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TRKB được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng cung cấp các phân tử axit nucleic mã hóa cho cả HCVR và LCVR, trong đó HCVR có chứa một trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong bảng 1, và LCVR có chứa một trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1. Theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic có trình tự polynucleotit được

chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% kèm theo, và một trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%. Theo một số phương án nhất định theo khía cạnh thứ hai này của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa cho một HCVR và LCVR, trong đó cả HCVR và LCVR đều có nguồn gốc từ cùng một kháng thể kháng TrkB được liệt kê trong bảng 1.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế cung cấp các vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện một polypeptit, có chứa một vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của một kháng thể kháng TrkB. Ví dụ, sáng chế bao gồm các vector biểu hiện tái tổ hợp có chứa phân tử axit nucleic bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic được đề cập ở trên, tức là các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR, LCVR và/hoặc CDR được nêu trong bảng 1. Ngoài ra, cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế là các tế bào chủ mà các vector nêu trên đã được đưa vào, cũng như các phương pháp sản xuất các kháng thể hoặc các phần của chúng bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong các điều kiện cho phép sản xuất các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể và thu hồi các kháng thể và các đoạn kháng thể được sản xuất.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB có mô hình glycosyl hóa được cải biến. Theo một số phương án, sự cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể là hữu ích, hoặc một kháng thể thiếu một gốc fucoza có trên chuỗi oligosacarit, ví dụ, để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (xem Shield et al. (2002) 277: 26733). Trong các ứng dụng khác, sự cải biến galactosyl hóa có thể được thực hiện để cải biến chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế cung cấp một dược phẩm có chứa ít nhất một kháng thể của sáng chế hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc

hiệu với TrkB và một chất mang được dùng.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế một tá chế phẩm là sự kết hợp giữa kháng thể kháng TrkB và một tác nhân trị liệu thứ hai. Theo một phương án, tác nhân trị liệu thứ hai là tác nhân bất kỳ được kết hợp thuận lợi với kháng thể kháng TrkB. Tác nhân trị liệu thứ hai có thể hữu ích để làm giảm bớt ít nhất một triệu chứng của bệnh thoái hóa hoặc rối loạn thần kinh.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế cung cấp phương pháp để tăng cường hoạt tính sinh học qua trung gian TrkB, phương pháp này bao gồm cho TrkB tiếp xúc với lượng có hiệu quả sinh học của một kháng thể chủ vận kháng TrkB của Bảng 1, hoặc cho TrkB tiếp xúc với dược phẩm có chứa lượng có hiệu quả sinh học của một kháng thể chủ vận kháng TrkB của Bảng 1.

Theo một số phương án nhất định, hoạt tính sinh học là sự bảo vệ tế bào thần kinh hoặc khả năng sống sót của tế bào thần kinh, và sự bảo vệ tế bào thần kinh hoặc khả năng sống sót của tế bào thần kinh được tăng cường khi cho TrkB tiếp xúc với một kháng thể chủ vận kháng TrkB.

Theo một số phương án nhất định, hoạt tính sinh học là sự bảo vệ thần kinh và khả năng sống sót của các tế bào hạch võng mạc (các RGC).

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế cung cấp phương pháp trị liệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến hoạt động hoặc biểu hiện của TrkB, hoặc ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc rối loạn, bằng cách sử dụng kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của một kháng thể của sáng chế. Phương pháp trị liệu theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm sử dụng lượng có hiệu quả về mặt trị liệu của dược phẩm có chứa một kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể của sáng chế cho đối tượng cần điều trị. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ mà được cải thiện, trở nên tốt hơn, ức chế hoặc ngăn ngừa, bằng cách nhắm mục tiêu TrkB và/hoặc bằng cách hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu tế bào qua trung gian TrkB.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp ngăn ngừa tế bào thần kinh võng mạc khỏi bị thương tổn hoặc chết. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung

cấp phương pháp điều trị bệnh theo bệnh lý, trong đó có xảy ra sự thoái hóa võng mạc. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp điều trị mắt sống, trước hoặc sau phẫu thuật mắt, tiếp xúc với ánh sáng hoặc tổn thương môi trường khác, do đó ngăn chặn sự thoái hóa của các tế bào võng mạc. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp ngăn ngừa thương tổn và sự thoái hóa thụ thể quang ở mắt sống. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp bảo vệ tế bào thần kinh mắt mà không gây ra các tác dụng phụ, có thể do phản ứng chéo với các thụ thể khác, chẳng hạn như thụ thể p75. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp cho phép các thụ thể quang bị tổn thương phục hồi hoặc tái sinh.

Theo các phương án nhất định, bệnh hoặc rối loạn được điều trị bằng một kháng thể của sáng chế là bệnh hoặc rối loạn của mắt được chọn từ nhóm gồm có: tăng nhãn áp, võng mạc do tiểu đường, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thần kinh thị giác do thiếu máu cục bộ, viêm thần kinh thị giác, thiếu máu võng mạc, thoái hóa thụ thể quang, viêm sắc tố võng mạc, mù Leber bẩm sinh, mù Leber do di truyền thần kinh thị giác, hội chứng Usher, bệnh rối loạn di truyền võng mạc và tắc động mạch hoặc tĩnh mạch võng mạc.

Các tình trạng bệnh lý khác có thể điều trị bằng một hoặc nhiều kháng thể kháng TrkB của sáng chế bao gồm: bong võng mạc, bệnh võng mạc do quang hóa, bệnh võng mạc do phẫu thuật (kể cả do cơ học hoặc do ánh sáng gây ra), bệnh võng mạc do nhiễm độc, bệnh võng mạc do sinh non, bệnh võng mạc do virus như bệnh võng mạc CMV hoặc HIV liên quan đến AIDS; viêm màng bồ đào; bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ do tắc tĩnh mạch hoặc động mạch hoặc rối loạn mạch máu khác, bệnh võng mạc do thương tích hoặc tổn thương xuyên vào mắt, bệnh lý màng cứng ngoại biên hoặc thoái hóa võng mạc do di truyền.

Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn của mắt được điều trị bằng kháng thể chủ vận kháng TrkB của sáng chế là bệnh tăng nhãn áp.

Khía cạnh thứ 7 của sáng chế là cung cấp phương pháp để đạt được sự giảm khối lượng cơ thể ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng kháng thể

chủ vận TrkB của Bảng 1, hoặc một dược phẩm có chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế cung cấp phương pháp để đạt được sự giảm khối lượng mỡ ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng kháng thể chủ vận TrkB của bảng 1, hoặc dược phẩm có chứa các kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng.

Khía cạnh thứ 8 của sáng chế là cung cấp phương pháp thúc đẩy khả năng sống sót của tế bào thần kinh ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng lượng có hiệu quả về mặt trị liệu của kháng thể chủ vận TrkB của Bảng 1, hoặc dược phẩm có chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng.

Theo một phương án, phương pháp được mô tả ở trên có thể đạt được bằng cách sử dụng kháng thể chủ vận kháng TrkB hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó cho đối tượng cần điều trị, trong đó kháng thể chủ vận kháng TrkB có chứa 3 vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (các CDR) (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) được chứa trong vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), có chứa một trình tự axit amin như được nêu trong Bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% kèm theo; và 3 CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được chứa trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), có chứa một trình tự axit amin như được nêu trong bảng 1, hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% kèm theo.

Theo một phương án, phương pháp của sáng chế này có thể đạt được bằng cách sử dụng kháng thể chủ vận TrkB của sáng chế, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa 3 CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2, HCDR1) được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 và 68 hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% kèm theo; và có chứa 3 CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, LCDR3) được chứa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự LCVR được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 và 72 hoặc một trình tự về cơ bản tương tự nó, có độ tương đồng trình tự ít nhất là

90% kèm theo.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa một HCVR có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 và 68.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa một LCVR có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 và 72.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa một HCVR có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2, 18, 34, 49, 59 và 68; và một LCVR có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 10, 26, 42, 53, 63 và 72.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa các CDR của một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR, được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 và 68/72.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa một cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR, được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 49/53, 59/63 và 68/72.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa:

- (a) một miền HCDR1 có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 4, 20, 36, 50, 60 và 69;
- (b) một miền HCDR2 có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 6, 22, 38, 51, 61 và 70;
- (c) một miền HCDR3 có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 8, 24, 40, 52, 62 và 71;
- (d) một miền LCDR1 có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 12, 28, 44, 54, 64 và 73;
- (e) một miền LCDR2 có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO: 14, 30, 46, 55, 65 và 74;
- (f) một miền LCDR3 có một trình tự axit amin được chọn từ nhóm

gồm có SEQ ID NO: 16, 32, 48, 56, 66 và 75.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa một bộ 6 CDR (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) được chọn từ nhóm gồm có: (a) SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16; (b) SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32; (c) SEQ ID NO: 36-38-40-44-46-48; (d) SEQ ID NO: 50-51-52-54-55-56; (e) SEQ ID NO: 60-61-62-64-65-66; và (f) SEQ ID NO: 69-70-71-73-74-75.

Theo một phương án, bệnh hoặc rối loạn được điều trị bằng kháng thể kháng TrkB của sáng chế là béo phì và biến chứng bất kỳ do béo phì.

Người ta hình dung rằng bệnh hoặc rối loạn bất kỳ liên quan đến hoạt động hoặc biểu hiện của TrkB là đều có thể điều trị bằng kháng thể của sáng chế. Những bệnh này có thể bao gồm bệnh bất kỳ mà có sự thoái hóa tế bào rõ ràng, chẳng hạn như tình trạng thoái hóa thần kinh, hoặc sau một chấn thương thần kinh.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng từ việc xem xét mô tả chi tiết tiếp theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Thể hiện các western blot đánh giá tổng mức TRKB và mức phospho-TRKB ở đồng hợp tử chuột nhất TRKB được làm cho giống người tại thời điểm 1 giờ, 4 giờ và 18 giờ sau khi tiêm trực tiếp vào đồi hải mã bằng kháng thể chủ vận TRKB H4H9816P2 hoặc kháng thể đối chứng isotype.

Hình 2. Thể hiện kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2, hoạt hoá các con đường xuôi chiều của MAPK/ERK và PI3K/Akt. Hình vẽ thể hiện western blot của phospho-TrkB, tổng TrkB, phospho-Akt, tổng AKT, phospho-ERK và tổng ERK, tại thời điểm 15 phút và 2 giờ sau khi xử lý các tế bào thần kinh vỏ não nguyên phát đã được phân lập từ đồng hợp tử chuột nhất con TRKB được làm cho giống người sau sinh 1 ngày với các kháng thể chủ vận TrkB khác nhau hoặc BDNF.

Hình 3. Thể hiện liều lượng 3 kháng thể chủ vận TrkB làm tăng khả năng sống sót của các tế bào SH-SY5Y *in vitro* một cách phụ thuộc. Kháng thể đối

chúng isotype không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của tế bào.

Hình 4. Thể hiện biên dạng dược động học của kháng thể chủ vận kháng TrkB H4H9816P2 ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu} và chuột nhắt loại hoang dã. Chuột nhắt được tiêm một liều 10 mg/kg dưới da vào ngày thứ 0. Nồng độ của H4H9816P2 toàn phần trong huyết thanh được xác định bằng xét nghiệm miễn dịch Gyros. Các dữ liệu tại các thời điểm sau tiếp nhận liều là 6 giờ, 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 và 30 ngày chỉ ra nồng độ trung bình của kháng thể. Tổng nồng độ kháng thể H4H9816P2 được biểu diễn dưới dạng đường tròn màu đen đối với chuột nhắt TrkB^{hu/hu} và hình vuông màu đen cho chuột nhắt loại hoang dã. Dữ liệu được dựng đồ thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ SD.

Hình 5. Gồm có hình 5A và hình 5B, thể hiện khả năng của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB chuột nhắt để ngăn chặn sự tương tác giữa TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống với phối tử BDNF của nó (yếu tố thần kinh có nguồn gốc từ não). Các phương pháp dựa trên ELISA được sử dụng để đánh giá sự gắn kết của TrkB.hFc chuột nhắt (hình 5A với hai đồ thị) và TrkB.mmh chuột cống (hình 5B với hai đồ thị) với đĩa được phủ BDNF trong trường hợp có mặt của một khoảng các nồng độ của kháng TrkB chuột và mAbs đối chứng isotype. Việc chèn vào (hình 5A với hai đồ thị) biểu thị đường cong phản ứng với liều dùng của TrkB.hFc chuột nhắt (REGN2277) liên kết với BDNF với giá trị EC₅₀ là 780 pM. Việc chèn vào (hình 5B với hai đồ thị) biểu thị đường cong phản ứng liều dùng của TrkB.mmh chuột cống (REGN1808) liên kết với BDNF với giá trị EC₅₀ là 2,2 nM. Nồng độ phân tử gam (M) chỉ ra nồng độ kháng thể cho mAbs. Thanh sai số thể hiện cho độ lệch chuẩn.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp và điều kiện thí nghiệm cụ thể được mô tả, vì các phương pháp và điều kiện này có thể khác nhau. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong tài liệu này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và nó không phải nhằm mục đích giới hạn trong đó, vì phạm vi của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn

bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Trừ khi được định nghĩa khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây đều có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng", khi được sử dụng để tham chiếu đến một giá trị số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa là giá trị này có thể thay đổi so với giá trị được trích dẫn không quá 1%. Ví dụ: như được sử dụng ở đây, biểu diễn "khoảng 100" thì bao gồm cả 99 và 101 và tất cả các giá trị ở giữa chúng (ví dụ: 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong tài liệu này, có thể được sử dụng trong thực tế hoặc thử nghiệm của sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu ưu tiên được mô tả tại đây. Tất cả các bằng sáng chế, đơn và các công bố không phải bằng sáng chế được đề cập trong bản mô tả này được kết hợp để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

Định nghĩa

Biểu diễn "TrkB" và tương tự, còn được gọi là "thụ thể tropomyosin kinase B", đề chỉ thụ thể người (trừ khi được chỉ định là từ loài khác), có chứa trình tự axit amin như được nêu trong các gốc axit amin 32 đến 430 của số truy cập NP_001018074.1. TrkB người chứa thể myc-myc-hexahistidin, được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 76 (với các gốc axit amin 1-399 là TrkB người và các gốc axit amin 400-427 là thể myc-myc-hexahistidin). Các dạng khác chứa protein TrkB người được mô tả trong tài liệu này, gồm có SEQ ID NO: 77, là TrkB người (các gốc 1-399) với vùng Fc chuột nhất (các gốc 400-632); và SEQ ID NO: 78, là TrkB người (các gốc 1-399) với vùng Fc người (các gốc 400-626). TrkB chuột nhất có trình tự axit amin như được nêu trong các gốc axit amin 32 đến 429 của số truy cập NP_001020245. TrkB chuột nhất có chứa thể myc-myc-hexahistidin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 79 (với các gốc axit amin 1-398 là TrkB chuột nhất và các gốc axit amin 399-426 là thể myc-myc-hexahistidin). Các dạng khác chứa các protein TrkB chuột nhất được mô tả trong tài liệu này, gồm có SEQ ID NO: 80, là TrkB chuột nhất (các gốc 1-398) với vùng Fc chuột nhất (các gốc

399-631); và SEQ ID NO: 81, là TrkB chuột nhắt (các gốc 1-398) với vùng Fc chuột nhắt (các gốc 399-625). TrkB thỏ có trình tự axit amin như được nêu trong các gốc axit amin từ 32 đến 430 của số truy cập XP_002721319.1. TrkB thỏ chứa thể myc-myc-hexahistidin được thể hiện dưới dạng trình tự SEQ ID NO: 82 (với các gốc axit amin 1-399 là TrkB của thỏ và các gốc axit amin 400-427 là thể myc-myc-hexahistidin). Các dạng khác chứa protein TrkB thỏ được mô tả trong tài liệu này, bao gồm trình tự SEQ ID NO: 83, đó là TrkB của thỏ (các gốc 1-399) với vùng Fc của chuột (các gốc 400-632). TrkB của chuột bao gồm trình tự axit amin như nêu trên trong các gốc axit amin từ 32 đến 429 của số truy cập NP_036863.1. TrkB của chuột chứa thể myc-myc-hexahistidin được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 84 (với các gốc axit amin 1-398 là TrkB chuột nhắt và các gốc axit amin 399-426 là thể myc-myc-hexahistidin). Các dạng khác chứa các protein TrkB chuột nhắt được mô tả trong tài liệu này, gồm có ID SEQ NO: 85, là TrkB chuột nhắt (các gốc 1-398) với vùng Fc chuột nhắt (các gốc 399-631). TrkB khỉ Rhesus (*Macaca mulatta*) được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 95 (các axit amin từ 32 đến 838 của số truy cập NP_001248226.1) và TrkB khỉ cynomolgus (*Macaca fascicularis*) được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 96 của số truy cập XP_005582102.1).

Protein "TrkA" người được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 86, với các axit amin 1-375 là TrkA (các axit amin 34-414 của số truy cập NP_001012331.1 với V263L, C300S), các axit amin 376-378 là cầu liên kết GPG và các axit amin 379-605 là Fc người.

Protein "TrkC" người được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 87, với các axit amin 1-398 là TrkC (các axit amin 32-429 của số truy cập NP_001012338.1) và các axit amin 399-426 là thể myc-myc-his.

Protein "TrkC" chuột nhắt được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 88, với các axit amin 1-398 là TrkC (các axit amin 32-429 của số truy cập NP_032772.3) và axit amin 399-426 là thể myc-myc-his.

Protein "TrkC" của khỉ cynomolgus được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 89, với các axit amin 1-398 là TrkC (các axit amin 32-429 của số truy cập

XP_015308837.1) và các axit amin 399-426 là thẻ myc-myc-his.

Theo một số trường hợp nhất định, các dòng tế bào đã được điều chế biểu hiện các protein TrkB, có chứa miền ngoài, cũng như các miền xuyên màng và tế bào chất của protein TrkB. Ví dụ: trình tự SEQ ID NO: 91 là protein TrkB người chứa cả ba miền được chứa trong các axit amin 32-822 của số truy cập NP_001018074.1 hoặc Uniprot Q16620-1, với các axit amin 1-398 là miền ngoài, và vùng xuyên màng/tế bào chất được xác định bởi các gốc axit amin 399-790. Theo một trường hợp, một dòng tế bào TrkB đã được điều chế biểu hiện TrkB chuột nhất (các axit amin 32-476 của số truy cập NP_032771.1; xem thêm trình tự ID SEQ NO: 92). Theo trường hợp khác, một dòng tế bào đã được điều chế biểu hiện protein TrkB khảm gen, với miền ngoài của TrkB chuột từ các axit amin 32-429 của số truy cập NP_001020245.1 (xem thêm trình tự SEQ ID NO: 93) hoặc số Uniprot P15209-1 và các miền xuyên màng và tế bào chất TrkB người (các axit amin 431-822 của số truy cập NP_001018074.1 (xem thêm SEQ ID NO: 91). Một dòng tế bào cũng được điều chế biểu hiện TrkB Khỉ xanh châu Phi (*Chlorocebus sabaeus*) (các axit amin 32-822 của số truy cập XP_007967815.1 (xem thêm ID SEQ SỐ: 94)).

Thuật ngữ "yếu tố gây suy nhược thần kinh có nguồn gốc từ não" hoặc "BDNF" dùng để chỉ phối tử cho TrkB và trình tự axit amin của BDNF được thể hiện trong SEQ ID NO: 90 (isoform A 1-120, với các axit amin 129-247 của số truy cập NP_733928.1 với Met được thêm vào đầu N). Theo một số thí nghiệm cụ thể được mô tả trong tài liệu này, nguồn BDNF là từ R & D Systems, 248-BD/CF.

Tất cả các tham chiếu về các protein, polypeptit và các đoạn protein trong tài liệu này đều để chỉ protein, polypeptit hoặc đoạn protein tương ứng người, trừ khi được chỉ định rõ ràng là từ một loài khác. Do đó, biểu diễn "TrkB" có nghĩa là TrkB người trừ khi được chỉ định là từ một loài khác không phải người, ví dụ: "TrkB khỉ", "TrkB chuột nhất", "TrkB chuột cống", v.v.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể kháng TrkB" bao gồm cả các kháng thể đơn dòng với một tính đặc hiệu duy nhất, cũng như các kháng thể

đặc hiệu kép bao gồm một nhánh đầu tiên gắn với TrkB và một nhánh thứ hai gắn với kháng nguyên (đích) thứ hai, trong đó nhánh kháng TrkB có chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR như được nêu trong Bảng 1 trong tài liệu này. Thuật ngữ "kháng thể kháng TrkB" cũng bao gồm các thể liên hợp thuốc kháng thể (ADC) có chứa một kháng thể kháng TrkB hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó được liên hợp với thuốc hoặc độc tố (tức là tác nhân gây độc tế bào). Thuật ngữ "kháng thể kháng TrkB" cũng bao gồm các thể liên hợp nuclit phóng xạ kháng thể (ARC) có chứa một kháng thể kháng TrkB hoặc phần gắn kháng nguyên của nó được liên hợp với một nuclit phóng xạ.

Thuật ngữ "kháng thể kháng TrkB", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là phân tử hoặc phức hợp phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ ó chứa ít nhất một vùng xác định bổ sung (CDR) liên kết đặc hiệu hoặc tương tác với TrkB hoặc một phần của TrkB. Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các phân tử globulin miễn dịch có chứa bốn chuỗi polypeptit với hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, cũng như các đa phân của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng có chứa một vùng biến đổi chuỗi nặng (viết tắt ở đây là HCVR hoặc V_H) và một vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng có chứa ba miền, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ có chứa một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (viết tắt ở đây là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ có chứa một miền (C_{L1}). Các vùng V_H và V_L có thể tiếp tục được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng xác định bổ sung (CDR), xen kẽ với các vùng mà được bảo tồn hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L có chứa ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác nhau của sáng chế, các FR của kháng thể kháng TrkB (hoặc phần gắn kháng nguyên của nó) có thể là giống hệt với các trình tự mầm người, hoặc có thể được biến đổi tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định dựa trên phân tích song song của hai hoặc nhiều CDR.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng ở đây, cũng bao gồm các đoạn liên kết kháng nguyên của các phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ. Các thuật

ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "đoạn liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng ở đây, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein được thiết kế bất kỳ thu được bằng cách enzym hóa, tổng hợp hoặc biến đổi gen mà liên kết đặc hiệu với một kháng thể để tạo thành một phức. Các đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tách ra từ, ví dụ từ các phân tử kháng thể đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn phù hợp bất kỳ, chẳng hạn như các kỹ thuật tiêu hóa phân giải protein hoặc thiết kế gen tái tổ hợp, liên quan đến thao tác và biểu hiện của ADN mã hoá cho các miền biến đổi và tùy ý hằng định của kháng thể. ADN này được biết đến và/hoặc có sẵn, ví dụ, từ các nguồn thương mại, thư viện ADN (gồm có, ví dụ thư viện kháng thể thực khuẩn) hoặc có thể được tổng hợp. ADN này có thể được giải trình tự và xử lý bằng phương pháp hóa học hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều miền biến đổi và/hoặc hằng định thành một cấu hình phù hợp, hoặc để đưa vào trong các bộ ba mã hoá, tạo ra các gốc xystein, cải biến, thêm hoặc xóa bỏ các axit amin v.v.

Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các đoạn liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) đoạn Fab; (ii) đoạn F(ab')₂; (iii) đoạn Fd; (iv) đoạn Fv; (v) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv); (vi) các đoạn dAb; và (vii) các đơn vị nhận diện tối thiểu có chứa các gốc axit amin mà sao chép vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ: vùng xác định bổ sung đã được phân lập (CDR) như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 bị ràng buộc. Các phân tử được thiết kế khác, chẳng hạn như các kháng thể đặc hiệu miền, các kháng thể đơn miền, kháng thể được xóa miền, các kháng thể thể khảm, các kháng thể ghép CDR, các diabody, triabody, tetrabody, minibody, nanobody (ví dụ các nanobody hoá trị một và các nanobody hoá trị hai v.v.), được phẩm miễn dịch mô-đun nhỏ (SMIP) và miền IgNAR biến đổi cá mập, cũng được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn liên kết kháng nguyên", như được sử dụng ở đây.

Một đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể thường sẽ có chứa ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường sẽ có chứa ít nhất một CDR, mà liền kề hoặc trong khung với

một hoặc nhiều trình tự khung. Trong các đoạn liên kết kháng nguyên có một miền V_H kết hợp với miền V_L , miền V_H và V_L có thể được đặt tương đối với nhau theo sự sắp xếp phù hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là đối xứng hai bên và có chứa các bộ đối xứng V_H-V_H , V_H-V_L hoặc V_L-V_L . Ngoài ra, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể có chứa miền V_H hoặc V_L đơn phân.

Theo một số phương án nhất định, một đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền hằng định. Các cấu hình điển hình không nhằm mục đích giới hạn về các miền biến đổi và hằng định mà có thể được tìm thấy trong một đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể của sáng chế gồm có: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-CH3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-CH3$; (vi) V_H-C_H2-CH3 ; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-CH3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-CH3$; (xiii) V_L-C_H2-CH3 ; và (xiv) V_L-C_L . Trong cấu hình bất kỳ của miền biến đổi và hằng định, gồm có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình điển hình được liệt kê ở trên, cả miền biến đổi và miền hằng định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bởi vùng bản lề toàn bộ hoặc một phần hoặc vùng liên kết. Một vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 axit amin (ví dụ: 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn), mà dẫn đến cầu liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa các miền biến đổi và/hoặc hằng định liền kề trong một phân tử polypeptit duy nhất. Ngoài ra, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể của sáng chế có thể có chứa nhị phân cùng loại hoặc nhị phân khác loại (hoặc đa phân khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình miền biến đổi và hằng định được liệt kê ở trên trong liên kết không cộng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền đơn phân V_H hoặc V_L (ví dụ: bằng (các) liên kết disulfua).

Như đối với các phân tử kháng thể hoàn chỉnh, các đoạn liên kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Đoạn gắn kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường sẽ có chứa ít nhất hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên riêng biệt hoặc với một epitope khác nhau trên cùng một kháng nguyên. Định dạng kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, bao gồm các định dạng kháng

thể đặc hiệu kép điển hình được bộc lộ ở đây, có thể được điều chỉnh để sử dụng dưới dạng một đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể của sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường có sẵn trong lĩnh vực này.

Theo một số trường hợp nhất định, có thể mong muốn đối kháng TrkB, ví dụ, để ức chế sự sinh trưởng hoặc tăng sinh của, ví như một tế bào khối u thần kinh. Tuy nhiên, các kháng thể của sáng chế hoạt động như là các kháng thể chủ vận, đóng vai trò là các chất tăng cường khả năng sống sót của tế bào thần kinh và là chất bảo vệ thần kinh. Các kháng thể của sáng chế có thể hoạt động bằng cách tăng cường sự tương tác giữa TrkB và phối tử của nó BDNF. Ngoài ra, các kháng thể của sáng chế có thể làm trung gian dẫn truyền tín hiệu TrkB thông qua cơ chế mà không liên quan đến việc tăng cường tương tác TrkB với phối tử của nó.

Thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng ở đây, nhằm để chỉ các kháng thể người không có trong tự nhiên. Thuật ngữ này bao gồm các kháng thể được sản xuất bằng cách tái tổ hợp ở động vật có vú không phải người hoặc trong các tế bào của động vật có vú không phải người. Thuật ngữ này không nhằm để chỉ các kháng thể đã được phân lập hoặc tạo ra ở đối tượng người.

Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế có thể là các kháng thể người tái tổ hợp và/hoặc không có trong tự nhiên. Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp người", như được sử dụng ở đây, nhằm mục đích để chỉ tất cả các kháng thể người mà được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập theo cách tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vec tơ biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào trong tế bào chủ (được mô tả thêm bên dưới), các kháng thể đã được phân lập từ thư viện kháng thể người tái tổ hợp, tổ hợp (mô tả thêm bên dưới), các kháng thể đã được phân lập từ động vật (ví dụ như chuột nhắt), mà chuyển gen cho các gen globulin miễn dịch người (xem ví dụ, Taylor et al (1992) Nucl.Acids Res. 20:6287-6295), hoặc các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách bất kỳ khác có liên quan đến việc cắt nối các trình tự gen globulin miễn dịch người với các trình tự ADN khác. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể tái tổ hợp người như vậy trải qua đột biến in vitro (hoặc

khi chuyển gen động vật cho các trình tự Ig người được sử dụng, gây đột biến gen soma in vivo) và do đó các trình tự axit amin của các vùng V_H và V_L của các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà trong khi liên quan đến các trình tự dòng mầm V_H và V_L người, có thể không xuất hiện tự nhiên trong các danh mục dòng mầm kháng thể người in vivo.

Các kháng thể người có thể tồn tại ở hai dạng, liên quan đến sự không đồng nhất bản lẻ. Ở dạng thứ nhất, phân tử globulin miễn dịch có chứa cấu trúc chuỗi bốn ổn định có khối lượng khoảng 150-160 kDa, trong đó các dime được giữ với nhau bằng liên kết disulfua chuỗi nặng liên chuỗi. Ở dạng thứ hai, các dime không được liên kết thông qua các liên kết disulfua liên chuỗi và một phân tử nặng khoảng 75-80 kDa được tạo thành bao gồm chuỗi nặng và nhẹ được liên kết cộng hóa trị (một nửa kháng thể). Các dạng này rất khó để tách, ngay cả sau khi thanh lọc ái lực.

Tần số xuất hiện của dạng thứ hai ở các isotype IgG nguyên dạng khác nhau là do, nhưng không giới hạn ở sự khác biệt về cấu trúc có liên quan đến isotype vùng bản lẻ của kháng thể. Một sự thể axit amin duy nhất trong vùng bản lẻ của bản lẻ IgG4 người có thể làm giảm đáng kể sự xuất hiện của dạng thứ hai (Angal et al. (1993), Miễn dịch phân tử 30:105) xuống mức thường được quan sát bằng cách sử dụng bản lẻ IgG1 người. Sáng chế bao gồm các kháng thể có một hoặc nhiều đột biến ở vùng bản lẻ C_H2 hoặc C_H3 , mà có thể được mong muốn, ví dụ trong sản xuất để cải thiện hiệu suất của dạng kháng thể mong muốn.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", hay "liên kết đặc hiệu với" hoặc tương tự, có nghĩa là một kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tạo thành một phức hợp với kháng nguyên mà tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Liên kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bởi hằng số cân bằng phân ly ít nhất khoảng 1×10^{-6} M hoặc nhỏ hơn (ví dụ: với K_D nhỏ hơn biểu thị liên kết chặt chẽ hơn). Các phương pháp xác định xem hai phân tử có liên kết đặc hiệu hay không đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, lọc máu cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt và tương tự. Như được mô tả trong tài liệu này, các kháng thể đã được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ,

BIACORE™, mà liên kết đặc hiệu với TrkB. Hơn nữa, các kháng thể đa đặc hiệu liên kết với protein TrkB và một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung hoặc đặc hiệu kép mà liên kết với hai vùng khác nhau của TrkB dù sao cũng được coi là các kháng thể “liên kết đặc hiệu”, như được sử dụng ở đây.

Các kháng thể của sáng chế có thể là các kháng thể đã được phân lập. Một "kháng thể đã được phân lập", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là một kháng thể đã được xác định và phân tách và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần trong môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, một kháng thể đã được tách hoặc loại bỏ khỏi ít nhất một thành phần của một tổ chức sống, hoặc từ mô hoặc tế bào, trong đó kháng thể tồn tại tự nhiên hoặc là được sản xuất theo cách tự nhiên, là "kháng thể đã được phân lập" cho mục đích của sáng chế. Một kháng thể đã được phân lập cũng bao gồm một kháng thể tại chỗ trong tế bào tái tổ hợp. Các kháng thể đã được phân lập là kháng thể đã trải qua ít nhất một bước tinh chế hoặc phân lập. Theo các phương án nhất định, một kháng thể đã được phân lập có thể hoàn toàn không chứa các nguyên liệu tế bào và/hoặc hóa chất khác.

Các kháng thể kháng TrkB được bộc lộ ở đây có thể có chứa một hoặc nhiều sự thể axit amin, chèn vào và/hoặc xóa bỏ trong khung và/hoặc các vùng CDR của các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các đột biến như vậy có thể dễ dàng được xác định bằng cách so sánh các trình tự axit amin được bộc lộ ở đây với các trình tự có sẵn, ví dụ từ các cơ sở dữ liệu về trình tự kháng thể chung. Sau khi thu được, các kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên mà có chứa một hoặc nhiều đột biến, có thể dễ dàng được kiểm tra cho một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tính đặc hiệu liên kết được cải thiện, ái lực liên kết tăng lên, các đặc tính sinh học đối vận hoặc chủ vận được cải thiện hoặc tăng cường (như trường hợp có thể), tạo miễn dịch giảm xuống, v.v. Các kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên thu được theo cách chung này cũng được bao gồm trong sáng chế.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng TrkB có chứa các biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR được bộc lộ ở đây, có một hoặc nhiều sự thể bảo tồn. Ví dụ, sáng chế bao gồm các

kháng thể kháng TrkB có các trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR với, ví như 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v sự thể axit amin bảo tồn so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR được nêu trong Bảng 1 ở đây.

Thuật ngữ "epitope" dùng để chỉ một yếu tố quyết định kháng nguyên mà tương tác với một vị trí gắn kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của một phân tử kháng thể, được gọi là vị trí nhận diện kháng nguyên. Một kháng nguyên riêng biệt có thể có nhiều hơn một epitope. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các khu vực khác nhau trên một kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Epitope có thể là hình khối hoặc tuyến tính. Epitope có hình khối được tạo bởi các axit amin kề nhau về không gian từ các phân đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit mạch thẳng. Epitope tuyến tính được tạo ra bởi các gốc axit amin liền kề trong chuỗi polypeptit. Theo một số trường hợp nhất định, một epitope có thể bao gồm các gốc của các nhóm sacarit, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Thuật ngữ "độ tương đồng đáng kể" hoặc "về cơ bản giống nhau", để đề cập đến một axit nucleic hoặc đoạn của nó chỉ ra rằng khi được sắp xếp tối ưu với các sự chèn vào hoặc xóa đi nucleotit thích hợp với một axit nucleic khác (hoặc dải bù của nó), thì có độ tương đồng trình tự nucleotit ít nhất là khoảng 95%, và tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các bazơ nucleotit, như được xác định bằng thuật toán nhận diện trình tự được biết đến rộng rãi bất kỳ, chẳng hạn như FASTA, BLAST hoặc Gap, như được thảo luận dưới đây. Một phân tử axit nucleic có độ tương đồng đáng kể so với phân tử axit nucleic tham chiếu, có thể theo một số trường hợp nhất định mã hóa cho một polypeptit có trình tự axit amin giống nhau hoặc về cơ bản tương tự như polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Khi áp dụng cho polypeptit, thuật ngữ "tương tự nhau đáng kể" hoặc "về cơ bản tương tự" có nghĩa là hai trình tự peptit khi được sắp xếp tối ưu, chẳng hạn như bởi các chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng trọng số khoảng trống mặc định, có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, thậm chí tốt hơn

nữa là ít nhất là 98% hoặc 99%. Tốt hơn là, các vị trí gốc mà không giống nhau được phân biệt bằng các sự thể axit amin bảo tồn. Một "sự thể axit amin bảo tồn" là sự thể mà trong đó gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin khác có một chuỗi bên (nhóm R) có tính chất hóa học tương tự (ví dụ: điện tích hoặc tính kỵ nước). Nói chung, một sự thể axit amin bảo tồn về cơ bản sẽ không làm thay đổi đáng kể các tính chất chức năng của protein. Trong trường hợp hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi các sự thể bảo tồn, tỉ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự hoặc mức độ tương tự có thể được điều chỉnh tăng lên để điều chỉnh tính chất bảo tồn của sự thể. Các phương pháp để thực hiện sự điều chỉnh này được biến đến rộng rãi đối với các chuyên gia trong lĩnh vực này. Xem, ví như phương pháp Pearson (1994) Mol. Biol. 24:307-331, ở đây được kết hợp bởi tài liệu tham khảo. Các ví dụ về các nhóm axit amin có chuỗi bên với tính chất hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) chuỗi bên béo-hydroxyl: serin và threonin; (3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin và tryptophan; (5) chuỗi bên bazơ: lysin, arginin và histidin; (6) chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và (7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh là xystein và metionin. Các nhóm thể axit amin bảo tồn được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat và asparagin-glutamin. Ngoài ra, một sự thay thế bảo tồn là thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận logarit độ hợp lý PAM250 được bộc lộ trong Gonnet et al (1992), Khoa học 256: 1443-1445, được đưa vào đây bằng cách tham khảo. Sự thay thế "bảo tồn vừa phải" là thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận logarit độ hợp lý PAM250.

sự tương đồng trình tự đối với các polypeptit, còn được gọi là độ tương đồng trình tự, thường được xác định bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein so khớp các trình tự tương tự bằng cách sử dụng các thước đo sự tương tự được chỉ định cho các sự thể, xóa bỏ hoặc cải biến khác nhau, bao gồm cả sự thể axit amin bảo tồn. Ví dụ, phần mềm GCG chứa các chương trình như Gap và Bestfit mà có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định tính tương đồng trình tự hoặc độ tương đồng trình tự giữa các

polypeptit liên quan chặt chẽ, chẳng hạn như các polypeptit tương đồng từ các loài khác nhau của các tổ chức sống hoặc giữa protein dạng tự nhiên và đột biến của nó. Xem, ví dụ, GCG phiên bản 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh bằng cách sử dụng FASTA, sử dụng các tham số mặc định hoặc được khuyến nghị, chương trình trong GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ: FASTA2 và FASTA3) cung cấp sự sắp xếp và tỉ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự của các vùng có sự trùng lặp tốt nhất giữa các trình tự truy vấn và tìm kiếm (Pearson (2000) *supra*). Một thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự của sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa số lượng lớn các trình tự từ các tổ chức sống khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, sử dụng các thông số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul et al (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 và Altschul et al (1997) *Axit nucleic Res.* 25: 3389-402, mỗi tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo.

Đặc tính sinh học của kháng thể

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB liên kết với TrkB người với K_D nhỏ hơn khoảng 200 nM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C hoặc ở 37°C. Theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB liên kết TrkB người với giá trị K_D nhỏ hơn khoảng 600 pM, ít hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM, nhỏ hơn khoảng 150 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 80 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, nhỏ hơn khoảng 40 pM, nhỏ hơn khoảng 30 pM, nhỏ hơn khoảng 20 pM, nhỏ hơn khoảng 10 pM, nhỏ hơn khoảng 5 pM, nhỏ hơn khoảng 3 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 1 pM.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB liên kết với TrkB người với thời gian bán thải phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 10 phút khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C, hoặc 37°C. Theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB liên kết TrkB người với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn khoảng 120 phút, lớn hơn khoảng 150 phút, lớn hơn khoảng 300 phút,

lớn hơn khoảng 350 phút, lớn hơn khoảng 400 phút, lớn hơn khoảng 450 phút, lớn hơn khoảng 500 phút, lớn hơn khoảng 550 phút, lớn hơn khoảng 600 phút, lớn hơn khoảng 700 phút, lớn hơn khoảng 800 phút, lớn hơn khoảng 900 phút, lớn hơn khoảng 1000 phút, lớn hơn khoảng 1100 phút hoặc lớn hơn khoảng 1200 phút.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB có thể hoặc không thể liên kết với TrkB khi, hoặc TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống. Như được sử dụng ở đây, một kháng thể "không liên kết" một kháng nguyên cụ thể (ví dụ: TrkB khi, chuột nhắt hoặc chuột cống nếu kháng thể này khi được thử nghiệm trong xét nghiệm liên kết kháng nguyên, như cộng hưởng plasmon bề mặt, cho thấy giá trị K_D lớn hơn khoảng 1000 nM, hoặc không cho thấy liên kết kháng nguyên bất kỳ trong xét nghiệm đó. Kiểu xét nghiệm khác có thể được sử dụng để xác định xem liệu kháng thể có hoặc không liên kết với kháng nguyên cụ thể, theo khía cạnh đó của sáng chế là ELISA.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện thụ thể TrkB với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 100 pM. Sử dụng kiểu xét nghiệm được mô tả trong Ví dụ 5 hoặc kiểu xét nghiệm về cơ bản tương tự, giá trị EC_{50} có thể được tính bằng nồng độ của kháng thể cần để hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu qua trung gian TrkB thành một phần hai tín hiệu tối đa quan sát được. Do đó, theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB làm trung gian dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện thụ thể TrkB trong trường hợp có hoặc không có BDNF với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, nhỏ hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 90 pM, nhỏ hơn khoảng 80 pM, nhỏ hơn khoảng 70 pM, nhỏ hơn khoảng 60 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, nhỏ hơn khoảng 40 pM, nhỏ hơn khoảng 30 pM, nhỏ hơn khoảng 20 pM, nhỏ hơn khoảng 10 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 5 pM, như được xác định bằng cách sử dụng kiểu xét nghiệm được mô tả trong Ví dụ 5 trong tài liệu này hoặc một xét nghiệm về cơ bản tương tự.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB hoạt hoá thụ thể TrkB như được thể hiện bởi sự phosphoryl hóa TrkB sau khi tiêm trực tiếp vào vùng đồi thị ở chuột nhắt được làm cho giống người để biểu hiện thụ thể TrkB người, như thể hiện trong Ví dụ 6.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB thúc đẩy sự giảm khối lượng ở chuột nhắt được làm cho giống người để biểu hiện thụ thể TrkB người. Các kháng thể của sáng chế cũng có tác dụng thúc đẩy sự giảm khối lượng chất béo và làm tăng hoạt động vận động ở những con chuột nhắt này, đồng thời làm giảm lượng thức ăn và nước uống (xem Ví dụ 7).

Các kháng thể của sáng chế thúc đẩy khả năng sống sót của các tế bào hạch võng mạc (các RGC) ở chuột cống được làm cho giống người để biểu hiện thụ thể TrkB người, khi được thử nghiệm trong mô hình chuyển đổi thần kinh thị giác (xem Ví dụ 8).

Các kháng thể của sáng chế hoạt hoá các con đường xuôi chiều MAPK/ERK và PI3K/Akt, như được thể hiện khi cho các tế bào thần kinh vỏ não nguyên phát chuột nhắt, thu lấy được từ TrkB chuột nhắt được làm cho giống người tiếp xúc với các kháng thể của sáng chế (xem Ví dụ 9).

Các kháng thể chủ vận kháng TrkB của sáng chế cũng thúc đẩy khả năng sống sót của các tế bào SH-SY5Y theo kiểu phụ thuộc vào liều dùng, như được thể hiện trong Ví dụ 10.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB ngăn chặn TrkB liên kết với BDNF với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 5 nM. Ví dụ, như được thể hiện trong Ví dụ 12, cả ba kháng thể được kiểm tra đã ngăn chặn trên 50% TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống liên kết với BDNF. Sử dụng kiểu xét nghiệm được mô tả trong Ví dụ 12 hoặc kiểu xét nghiệm về cơ bản tương tự, giá trị IC_{50} có thể được tính bằng nồng độ kháng thể cần để ngăn chặn TrkB liên kết với BDNF khi so sánh với tín hiệu tối đa quan sát được trong trường hợp không có kháng thể. Do đó, theo một số phương án nhất định, sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB ngăn chặn TrkB liên kết với BDNF với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 5 nM, nhỏ hơn khoảng 4 nM, nhỏ hơn khoảng 3 nM, nhỏ hơn khoảng 2 nM, nhỏ hơn khoảng 1 nM, nhỏ hơn

khoảng 900 pM, nhỏ hơn khoảng 800 pM, nhỏ hơn khoảng 700 pM, nhỏ hơn khoảng 600 pM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, nhỏ hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, nhỏ hơn khoảng 90 pM, nhỏ hơn khoảng 80 pM, nhỏ hơn khoảng 70 pM, nhỏ hơn khoảng 60 pM, nhỏ hơn khoảng 50 pM, nhỏ hơn khoảng 40 pM, nhỏ hơn khoảng 30 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 20 pM, như được xác định bằng cách sử dụng kiểu xét nghiệm được mô tả trong Ví dụ 12 ở đây hoặc một xét nghiệm cơ bản tương tự. Theo một phương án, các kháng thể TrkB của sáng chế ngăn chặn TrkB liên kết với BDNF với IC_{50} dao động trong khoảng từ 180 pM đến khoảng 4 nM.

Một đặc điểm liên kết của kháng thể của sáng chế (ví dụ, đặc điểm liên kết bất kỳ trong số các đặc điểm liên kết được đề cập ở trên), khi được bộc lộ dưới dạng "được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt" có nghĩa là đặc điểm liên kết đó có liên quan đến tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên được xác định bằng thiết bị đo cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ: thiết bị Biacore®, GE Healthcare) sử dụng các điều kiện xét nghiệm Biacore tiêu chuẩn như được minh họa trong các Ví dụ 3 và 4 ở đây, hoặc kiểu xét nghiệm về cơ bản tương tự. Theo một số phương án nhất định, các thông số liên kết được xác định ở nhiệt độ 25°C, trong khi theo các phương án khác, các thông số liên kết được đo ở nhiệt độ 37°C.

Sáng chế bao gồm các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với TrkB, có chứa HCVR và/hoặc LCVR có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR được liệt kê trong bảng 1.

Các kháng thể của sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc điểm sinh học đã nêu trên, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng. Danh sách các đặc điểm sinh học nêu trên của các kháng thể của sáng chế không nhằm mục đích nêu toàn diện. Các đặc điểm sinh học khác của các kháng thể của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này từ việc xem xét sáng chế bao gồm các ví dụ thực hiện trong tài liệu này.

Lập bản đồ epitope và các kỹ thuật liên quan

Epitope mà các kháng thể của sáng chế liên kết vào có thể bao gồm một trình tự liên kế của 3 hoặc nhiều hơn các axit amin của protein TrkB (ví dụ: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn). Ngoài ra, epitope có thể bao gồm một số lượng lớn các axit amin không liên kế (hoặc các trình tự axit amin) của TrkB. Theo một số phương án, epitope nằm trên hoặc gần bề mặt của TrkB, ví dụ trong miền tương tác với phối tử của nó, BDNF. Theo các phương án khác, epitope nằm trên hoặc gần bề mặt của TrkB mà không tương tác với phối tử TrkB, ví dụ ở vị trí trên bề mặt của TrkB mà tại đó một kháng thể khi gắn vào epitope đó nhưng không can thiệp vào tương tác giữa TrkB với phối tử của nó.

Các kỹ thuật khác nhau được biết đến với những người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để xác định xem liệu một kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" là nằm trong một polypeptit hoặc protein. Các kỹ thuật điển hình bao gồm, ví dụ xét nghiệm ngăn chặn chéo thông thường như được mô tả trong Antibodies, Harlow and Lane (Nhà xuất bản Cold Spring Harbor, Cold Spring Harb., NY), phân tích đột biến quét alanin, phân tích blot peptit (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463), và phân tích phân cắt peptit. Thêm vào đó, các phương pháp như cắt bỏ epitope, chiết xuất epitope và cải biến hóa học đối với các kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000, *Protein Science* 9: 487-496). Phương pháp khác nữa có thể được sử dụng để nhận diện các axit amin trong một polypeptit mà một kháng thể tương tác là trao đổi hydro/đơteri được phát hiện bằng phép đo phổ khối. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/đơteri bao gồm dán nhãn đơteri cho protein được quan tâm, tiếp theo là liên kết kháng thể với protein được dán nhãn đơteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước để cho phép trao đổi hydro-đơteri xảy ra ở tất cả các gốc, ngoại trừ các gốc được bảo vệ bởi kháng thể (vẫn còn được dán nhãn đơteri). Sau khi phân tách kháng thể, protein mục tiêu chịu sự phân tách proteaza và phân tích phổ khối, từ đó tiết lộ các gốc được dán nhãn đơteri tương ứng với các axit amin đặc hiệu mà kháng thể tương tác. Xem, ví như Ehring (1999) *Hóa sinh phân tích* 267 (2): 252-259; En gen và Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:

256A-265A.

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng TrkB liên kết với cùng một epitope như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu điển hình nào được mô tả trong tài liệu này (ví dụ: các kháng thể có chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được nêu trong bảng 1 ở đây). Tương tự, sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng TrkB cạnh tranh để liên kết TrkB với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu điển hình được mô tả trong tài liệu này (ví dụ: các kháng thể có chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được nêu trong bảng 1 ở đây).

Người ta có thể dễ dàng xác định liệu một kháng thể liên kết với cùng một epitope như, hoặc cạnh tranh để liên kết với một kháng thể kháng TrkB tham chiếu bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này và được minh họa ở đây. Ví dụ, để xác định xem liệu một kháng thể thử nghiệm có liên kết với cùng một epitope như một kháng thể kháng TrkB tham chiếu của sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu được cho phép liên kết với một protein TrkB. Tiếp theo, khả năng của một kháng thể thử nghiệm liên kết với phân tử TrkB được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với TrkB sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng TrkB tham chiếu, điều đó có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với một epitope khác với kháng thể kháng TrkB tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết với phân tử TrkB sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng TrkB tham chiếu, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng epitope với epitope được liên kết bởi kháng thể kháng TrkB tham chiếu của sáng chế. Thử nghiệm bổ sung thông thường (ví dụ đột biến peptit và phân tích liên kết) sau đó có thể được thực hiện để xác nhận xem sự thiếu hụt liên kết quan sát được của kháng thể thử nghiệm có thực sự là do liên kết với cùng một epitope với kháng thể tham chiếu hay không hoặc do sự phong tỏa không gian (hoặc hiện tượng khác) là nguyên nhân gây ra sự thiếu hụt liên kết quan sát được. Các thí nghiệm thuộc loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA, RIA, Biacore, phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy hoặc xét nghiệm gắn kháng thể một cách định lượng hoặc định tính bất

kỳ khác hiện có trong lĩnh vực này. Theo các phương án nhất định của sáng chế, hai kháng thể liên kết với cùng (hoặc chồng lấp) epitope nếu, ví dụ lượng vượt quá 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể này sẽ ức chế liên kết của kháng thể kia ít nhất là 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% như được xác định trong xét nghiệm liên kết cạnh tranh (xem, ví dụ, Junghans et al, Cancer Res. 1990: 50: 1495-1502). Ngoài ra, hai kháng thể được coi là liên kết với cùng một epitope nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể này làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể kia. Hai kháng thể được coi là có "epitope chồng lấp" nếu chỉ là một tập hợp con của các đột biến axit amin làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể này, làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể kia.

Để xác định xem một kháng thể có cạnh tranh để liên kết (hoặc cạnh tranh chéo để liên kết) với kháng thể kháng TrkB tham chiếu hay không, phương pháp liên kết được mô tả ở trên được thực hiện theo hai hướng: hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho phép liên kết với một protein TrkB trong các điều kiện bão hòa, sau đó là đánh giá sự gắn kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử TrkB. Hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho phép liên kết với phân tử TrkB trong các điều kiện bão hòa, sau đó là đánh giá sự gắn kết của kháng thể tham chiếu với phân tử TrkB. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ kháng thể đầu tiên (bão hòa) có khả năng liên kết với phân tử TrkB, thì được kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh để liên kết với TrkB (xem, ví dụ trong dạng xét nghiệm được mô tả trong Ví dụ 4 trong tài liệu này, trong đó protein TrkB được thu giữ trên các đầu cảm biến và các đầu cảm biến được phủ TrkB được xử lý bằng kháng thể tham chiếu [mAb-1] và kháng thể kháng TrkB thử nghiệm [mAb-2] theo cả hai thứ tự liên kết). Như sẽ được đánh giá cao bởi một người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này, một kháng thể mà cạnh tranh để gắn kết với kháng thể tham chiếu có thể không nhất thiết phải liên kết với cùng một epitope như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể ngăn chặn không gian liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết epitope chồng lấp hoặc liên kề.

Điều chế kháng thể người

Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể là các kháng thể hoàn toàn người nhưng không có trong tự nhiên. Phương pháp để tạo ra các kháng thể đơn dòng, bao gồm các kháng thể đơn dòng hoàn toàn người được biết đến trong lĩnh vực này. Phương pháp bất kỳ đã được biết đến như vậy đều có thể sử dụng trong khuôn khổ của sáng chế để tạo ra các kháng thể người liên kết đặc hiệu với TrkB người.

Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE® (xem, ví dụ US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc phương pháp bất kỳ đã biết khác để tạo ra kháng thể đơn dòng, kháng thể thể khảm có ái lực cao với chất gây dị ứng được phân lập đầu tiên có một vùng biến đổi người và một vùng hằng định chuột. Công nghệ VELOCIMMUNE® liên quan đến việc tạo ra chuột biến đổi gen có bộ gen có chứa các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ người có thể được liên kết với vùng hằng định chuột nhất nội sinh, tại vị trí gen trên nhiễm sắc thể, để chuột tạo ra một kháng thể có chứa một vùng biến đổi người và một vùng hằng định chuột, đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên. ADN mã hóa cho các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể được phân lập và có thể được liên kết với ADN mã hóa cho vùng hằng định của chuỗi nặng và nhẹ người. Sau đó, ADN này được biểu hiện trong một tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể hoàn toàn người.

Nói chung, chuột nhất VELOCIMMUNE® là được thử thách với kháng nguyên được quan tâm và các tế bào bạch huyết (như tế bào B) được thu hồi từ những con chuột nhất biểu hiện kháng thể. Các tế bào bạch huyết có thể được hợp nhất với một dòng tế bào u nguyên bào để điều chế các dòng tế bào lai bất tử, và các dòng tế bào lai đó được sàng lọc và lựa chọn để nhận diện các dòng tế bào lai tạo ra kháng thể đặc hiệu cho kháng nguyên được quan tâm. ADN mã hóa cho các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể đã được phân lập và liên kết với các vùng hằng định isotype mong muốn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Một protein kháng thể như vậy có thể được sản xuất trong một tế bào, chẳng hạn như tế bào CHO. Ngoài ra, ADN mã hóa cho các kháng thể thể khảm đặc hiệu kháng nguyên

hoặc các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể đã được phân lập trực tiếp từ các tế bào bạch cầu đặc hiệu kháng nguyên.

Như được mô tả trong phần thí nghiệm dưới đây, các kháng thể thể khảm có ái lực cao, đã được phân lập có một vùng biến đổi người và một vùng hằng định chuột, được đặc trưng và lựa chọn cho các đặc điểm mong muốn, bao gồm ái lực, độ chọn lọc, epitope v.v. Sau đó các vùng hằng định chuột được thay thế bằng một vùng hằng định mong muốn người để tạo ra kháng thể hoàn toàn người của sáng chế, ví dụ như IgG1 hoặc IgG4 dạng tự nhiên hoặc được cải biến. Mặc dù vùng hằng định được chọn có thể thay đổi tùy theo mục đích sử dụng cụ thể, các đặc tính liên kết kháng nguyên có ái lực cao và đặc hiệu mục tiêu còn tồn tại trên vùng biến đổi.

Theo một số phương án nhất định, có thể mong muốn thử nghiệm các kháng thể kháng TrkB người ở chuột nhắt hoặc chuột cống mà đã được thiết kế để biểu hiện thụ thể TrkB người. Những con chuột nhắt hoặc chuột cống này có thể có lợi trong trường hợp trong đó các kháng thể kháng TrkB chỉ có thể liên kết với TrkB người, nhưng sẽ không phản ứng chéo với TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống. Các ví dụ nhất định trong sáng chế được thực hiện bằng cách sử dụng chuột nhắt và chuột cống đã được cải biến gen để biểu hiện TrkB người. Phương pháp bất kỳ được biết đến bởi các chuyên gia trong lĩnh vực này đều có thể được sử dụng để tạo ra TrkB chuột nhắt và chuột cống được làm cho giống người như vậy.

Nhìn chung, các kháng thể của sáng chế có ái lực rất cao, thường có K_D từ khoảng 10^{-12} đến khoảng 10^{-9} M, khi được xác định bằng cách liên kết với kháng nguyên cố định trên pha rắn hoặc trong pha dung dịch.

Tương đương sinh học

Các kháng thể kháng TrkB và các đoạn kháng thể của sáng chế có chứa các protein có các trình tự axit amin khác với các trình tự của các kháng thể đã được mô tả nhưng vẫn giữ được khả năng liên kết với TrkB người. Các kháng thể và các mảnh kháng thể khác nhau này có chứa một hoặc nhiều sự bổ sung, xóa bỏ hoặc thay thế các axit amin khi so sánh với trình tự gốc, nhưng thể hiện hoạt tính sinh

học về cơ bản tương đương với hoạt tính sinh học của các kháng thể được mô tả. Tương tự, các trình tự ADN mã hóa cho kháng thể kháng TrkB của sáng chế bao gồm các trình tự có chứa một hoặc nhiều sự bổ sung, xóa bỏ hoặc thế các nucleotit khi so sánh với trình tự đã được bộc lộ, nhưng mã hóa cho một kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn kháng thể về cơ bản tương đương sinh học với một kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn kháng thể của sáng chế. Ví dụ về các trình tự axit amin và ADN biến thể như vậy đã được thảo luận ở trên.

Hai protein liên kết kháng nguyên, hoặc các kháng thể, được coi là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là được phẩm tương đương hoặc được phẩm thay thế mà tốc độ và mức độ hấp thu không cho thấy sự khác biệt đáng kể khi được sử dụng cùng liều mol trong các điều kiện thí nghiệm tương tự nhau, hoặc dùng một liều hoặc nhiều liều. Một số kháng thể sẽ được coi là tương đương hoặc được phẩm thay thế nếu chúng tương đương về mức độ hấp thu nhưng không phải ở tốc độ hấp thu và có thể được coi là tương đương sinh học vì sự khác biệt về tốc độ hấp thu là có chủ ý và được phản ánh trong dán nhãn, không cần thiết cho việc đạt được nồng độ thuốc hiệu quả trên cơ thể, ví dụ sử dụng thường xuyên và được coi là không đáng kể về mặt y tế đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu không có sự khác biệt có ý nghĩa lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu một người bệnh có thể được chuyển đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ tác dụng phụ như dự kiến, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt miễn dịch trong lâm sàng, hoặc hiệu quả giảm sút so với việc tiếp tục điều trị mà không chuyển đổi như vậy.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu cả hai đều hoạt động theo một cơ chế hoặc các cơ chế hoạt động chung đối với tình trạng hoặc các điều kiện sử dụng, trong phạm vi mà các cơ chế đó được biết đến.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp in

vivo và *in vitro*. Các biện pháp tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) xét nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc các chất chuyển hóa của nó được xác định trong máu, huyết tương, huyết thanh hoặc chất lỏng sinh học khác theo thời gian; (b) một thử nghiệm *in vitro* có mối tương quan và có khả năng dự đoán hợp lý về dữ liệu sinh khả dụng *in vivo* người; (c) một thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác trong đó tác dụng dược lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc mục tiêu của nó) được xác định là một hàm số của thời gian; và (d) trong một thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát chặt chẽ nhằm xác lập tính an toàn, hiệu quả, sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của một kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể được cấu trúc bằng cách, ví dụ thực hiện các sự thể khác nhau của các gốc hoặc các trình tự hoặc xóa bỏ các gốc ở đầu hoặc giữa, hoặc các trình tự không cần thiết cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc cysteine không cần thiết cho hoạt tính sinh học có thể bị xóa bỏ hoặc thay thế bằng các axit amin khác để ngăn chặn sự hình thành các cầu nối disulfua nội phân tử không cần thiết hoặc không chính xác khi tái tạo. Trong các trường hợp khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể kháng thể kháng TrkB bao gồm các thay đổi axit amin mà cải biến các đặc tính glycosyl hóa của các kháng thể, ví dụ, các đột biến loại trừ hoặc loại bỏ sự glycosyl hóa.

Độ chọn lọc loài và độ phản ứng chéo loài

Theo các phương án nhất định, sáng chế cung cấp các kháng thể kháng TrkB liên kết với TrkB người nhưng không gắn với TrkB các loài khác. Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng TrkB liên kết với TrkB người và TrkB một hoặc nhiều loài không phải con người. Ví dụ, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể liên kết với TrkB người và có thể liên kết hoặc không liên kết, như trường hợp có thể, với TrkB của một hoặc nhiều loài chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ cynomologous, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu Ấn Độ hoặc tinh tinh. Theo các phương án

điển hình nhất định của sáng chế, các kháng thể kháng TrkB được cung cấp mà liên kết đặc hiệu với TrkB người nhưng không liên kết hoặc chỉ liên kết yếu với TrkB chuột nhất hoặc chuột cống.

Kháng thể đa đặc hiệu

Các kháng thể của sáng chế có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Các kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu cho các epitope khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu cho nhiều hơn một polypeptit đích. Xem ví dụ như Tutt et al, 1991, J. Immunol. 147: 60-69; Kufer et al, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể được liên kết với hoặc đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ với peptit hoặc protein khác. Ví dụ, một kháng thể hoặc một đoạn của nó có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ: bằng cách ghép hóa học, hợp nhất gen, liên kết không cộng hoá trị hoặc cách khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử khác, như kháng thể hoặc đoạn kháng thể khác, để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu với tính đặc hiệu liên kết thứ hai.

Sáng chế bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép trong đó một nhánh của globulin miễn dịch liên kết với TrkB người, và nhánh còn lại của globulin miễn dịch là đặc hiệu cho kháng nguyên thứ hai. Nhánh gắn với TrkB có thể chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR/LCVR hoặc CDR như được nêu trong bảng 1 ở đây.

Một định dạng kháng thể đặc hiệu kép điển hình có thể được sử dụng trong khuôn khổ của sáng chế liên quan đến việc sử dụng miền globulin miễn dịch (Ig) C_H3 thứ nhất và miền Ig C_H3 thứ hai, trong đó miền Ig C_H3 thứ nhất và thứ hai khác nhau bởi ít nhất một axit amin, và trong đó ít nhất một sự khác biệt về axit amin làm giảm sự gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với protein A khi so với kháng thể đặc hiệu kép bị thiếu sự khác biệt về axit amin. Theo một phương án, miền Ig C_H3 thứ nhất liên kết với protein A và miền Ig C_H3 thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc xóa bỏ liên kết protein A, chẳng hạn như sự cải biến H95R (bằng cách đánh số exon của IMGT; H435R bằng cách đánh số EU). C_H3 thứ hai

còn có thể chứa một cải biến Y96F (bằng IMGT; Y436F của EU). Các cải biến khác có thể được thấy trong C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M và V82I (bằng IMGT; D356E, L58M, N384S, K392N, V394M và V422I của EU) trong trường hợp của các kháng thể IgG1; N44S, K52N và V82I (IMGT; N384S, K392N và V422I của EU) trong trường hợp của các kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q và V82I (bằng IMGT; Q355R, N384S, K392N, V394M, R409K, E419Q và V422I của EU) trong trường hợp của các kháng thể IgG4. Các biến thể về dạng kháng thể đặc hiệu kép được mô tả ở trên đã được dự tính trong phạm vi của sáng chế.

Các dạng đặc hiệu kép điển hình khác có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ví dụ các dạng đặc hiệu kép trên cơ sở scFv hoặc diabody, hợp nhất IgG-scFv, miền biến đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, knobs-into-holes, chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ: chuỗi nhẹ thông thường với knobs-into-holes v.v.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác động kép, và các định dạng đặc hiệu kép Mab² (xem, ví dụ Klein et al 2012, mAbs 4: 6, 1-11 và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó để đánh giá các định dạng đã nói ở trên). Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được cấu trúc bằng cách sử dụng sự liên hợp peptit/axit nucleic, ví dụ trong đó các axit amin không tự nhiên có khả năng phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra các thể liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu tại chỗ mà sau đó tự kết hợp thành các phức hợp đa phân tử có thành phần, hóa trị, hình học xác định. (Xem, ví dụ Kazane et al, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: ngày 4 tháng 12 năm 2012]).

Dạng tạo chế phẩm trị liệu và cách sử dụng

Sáng chế cung cấp các dược phẩm có chứa các kháng thể kháng TrkB hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của nó của sáng chế. Các dược phẩm của sáng chế được tạo chế phẩm với các chất mang, tá dược và các chất phù hợp khác mà đem lại sự chuyển vận, phân phối, dung nạp được cải thiện và tương tự. Rất nhiều dạng tạo chế phẩm thích hợp có thể được tìm thấy trong các công thức pha chế đã

được biết đến bởi tất cả các nhà hóa học dược phẩm: khoa học dược phẩm của Remington, Công ty xuất bản Mack, Easton, PA. Các dạng tạo chế phẩm này bao gồm, ví dụ bột, bột nhão, thuốc mỡ, thạch, sáp, dầu, mỡ, mỡ (dạng cation hoặc anion) có chứa các túi (chẳng hạn như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), các thể liên hợp AND, bột nhão hấp thụ khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương cacbowax (polyetylen glycol có khối lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn và hỗn hợp bán rắn có chứa cacbowax. Xem thêm Powell et al "Trích lục tá dược cho các công thức không phải đường tiêu hóa" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

Liều kháng thể dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi tùy thuộc vào tuổi và khối lượng kích cỡ của bệnh nhân, bệnh mục tiêu, tình trạng bệnh, đường dùng và tương tự. Liều ưu tiên thường được tính theo khối lượng cơ thể hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Đối với bệnh nhân trưởng thành, có thể là thuận lợi khi tiêm tĩnh mạch kháng thể của sáng chế một cách bình thường với liều duy nhất từ khoảng 0,01 đến khoảng 20 mg/kg khối lượng cơ thể, tốt hơn là từ khoảng 0,02 đến khoảng 7, từ khoảng 0,03 đến khoảng 5, hoặc từ khoảng 0,05 đến khoảng 3 mg/kg khối lượng cơ thể. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh mà tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Liều hiệu quả và lịch trình sử dụng các kháng thể kháng TrkB có thể được xác định theo kinh nghiệm; ví dụ, tiến triển của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng cách đánh giá định kỳ và điều chỉnh liều dùng cho phù hợp. Hơn nữa, việc chia tỷ lệ giữa liều giữa các loài có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực này (ví dụ: Mordenti et al, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8: 1351).

Các hệ thống phân phối khác nhau đã được biết đến và có thể sử dụng để dùng dược phẩm của sáng chế, ví dụ, đóng gói trong túi mỡ, vi hạt, vi nang, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện các virus đột biến, nội nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ, Wu et al, 1987, J. Biol. Hóa học 262: 4429-4432). Các phương pháp đưa vào bao gồm nhưng không giới hạn ở: tiêm vào dịch kính, tiêm trong mắt, tiêm nội bì, tiêm bắp, tiêm màng bụng, tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, trong mũi, ngoài màng cứng và đường uống. Chế phẩm có thể được sử dụng bằng

đường dùng thuận tiện bất kỳ, ví dụ như truyền hoặc tiêm nhanh, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu mô hoặc niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được dùng cùng với các hoạt chất sinh học khác. Việc dùng có thể là toàn thân hoặc cục bộ.

được phẩm của sáng chế có thể được tiêm dưới da hoặc tiêm tĩnh mạch với kim và ống tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, liên quan đến tiêm dưới da, thiết bị tiêm bút dễ dàng để sử dụng cho tiêm được phẩm của sáng chế. Thiết bị tiêm bút như vậy có thể được tái sử dụng hoặc dùng một lần. Thiết bị tiêm bút có thể tái sử dụng thường dùng hộp chứa có thể thay thế mà có chứa được phẩm. Khi toàn bộ được phẩm trong hộp chứa đã được sử dụng hết thì hộp chứa đã hết này có thể dễ dàng được loại bỏ và thay thế bằng một hộp chứa mới có chứa được phẩm. Thiết bị tiêm bút sau đó có thể được tái sử dụng. Thiết bị tiêm bút dùng một lần, không có hộp chứa thay thế. Thay vào đó, thiết bị tiêm bút dùng một lần được nạp sẵn được phẩm được giữ trong ngăn chứa bên trong thiết bị. Khi phần chứa đã hết được phẩm, toàn bộ thiết bị sẽ bị loại bỏ.

Nhiều thiết bị tiêm tự động và bút có thể tái sử dụng dùng để tiêm được phẩm của sáng chế dưới da. Các ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút tiêm DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Thụy Sĩ), bút tiêm HUMALOG MIX 75/25™, bút tiêm HUMALOG™, bút tiêm HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly và Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), bút tiêm BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Đức), chỉ kể tên một số. Ví dụ về các thiết bị tiêm bút dùng một lần dùng để tiêm được phẩm của sáng chế dưới da bao gồm nhưng không giới hạn ở bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) và KWIKPEN™ (Eli Lilly), tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Đức), EPIPEN (Dey, LP) và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), chỉ kể tên một số.

Theo các trường hợp nhất định, dược phẩm có thể được phân phối trong một hệ thống giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bom có thể được sử dụng (xem Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201). Theo một phương án khác, nguyên liệu polyme có thể được sử dụng; xem, Các biện pháp y tế để kiểm soát phân phối thuốc, Langer và Wise (chủ biên), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Theo một phương án khác nữa, hệ thống giải phóng có kiểm soát có thể được đặt gần với mục tiêu của chế phẩm, do đó chỉ cần một phần của liều toàn thân (xem, ví dụ: Goodson, 1984, trong Các biện pháp y tế để kiểm soát phân phối thuốc, *supra*, tập 2, trang 115-138). Các hệ thống giải phóng thuốc có kiểm soát khác được thảo luận trong phần đánh giá của Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Các dạng tạo chế phẩm tiêm được có thể bao gồm các dạng liều để tiêm tĩnh mạch, tiêm dịch kính, tiêm trong mắt, tiêm dưới da, trong da và tiêm bắp, truyền nhỏ giọt v.v... Các dạng tạo chế phẩm tiêm được có thể được tạo chế phẩm bằng các phương pháp phổ biến. Ví dụ: các dạng tạo chế phẩm tiêm được có thể được tạo chế phẩm, ví như bằng cách hòa tan, làm lơ lửng hoặc nhũ hóa kháng thể hoặc muối của nó được mô tả ở trên trong môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu thường được sử dụng để tiêm. Nếu là môi trường nước để tiêm, ví dụ, đó là nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất phụ trợ khác, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với một chất hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không chứa ion [ví dụ: polysorbat 80, HCO-50 (polyoxyetylen (50 mol) sản phẩm cộng của dầu thầu dầu được hydro hóa)], v.v. Nếu là môi trường dầu, có thể dùng ví như dầu mè, dầu đậu nành v.v... mà có thể được sử dụng kết hợp với chất hòa tan như benzoat benzyl, rượu benzyl, v.v ... Vì thế, chế phẩm tiêm được được tạo chế phẩm tốt hơn là được đổ vào một ống thích hợp.

Một cách thuận lợi, các dược phẩm dùng cho đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả ở trên được tạo chế phẩm thành các dạng liều theo đơn vị liều thích hợp để phù hợp với liều của các thành phần hoạt chất. Các dạng liều theo đơn vị liều như vậy bao gồm, ví dụ, viên nén, thuốc viên, viên nang, thuốc

tiêm (ống tiêm), thuốc đạn v.v... Lượng kháng thể nêu trên thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500 mg cho mỗi dạng liều theo đơn vị liều; đặc biệt ở dạng tiêm, được ưu tiên là kháng thể nêu trên được chứa lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100 mg và trong khoảng từ 10 đến 250 mg cho các dạng liều khác.

Sử dụng kháng thể để trị liệu

Sáng chế bao gồm các phương pháp bao gồm việc sử dụng cho đối tượng cần điều trị chế phẩm trị liệu có chứa kháng thể kháng TrkB (ví dụ, một kháng thể kháng TrkB có chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR được nêu trong bảng 1 ở đây). Chế phẩm trị liệu có thể chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bất kỳ trong số các kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ ở đây, và một chất mang hoặc chất pha loãng được dùng.

Các kháng thể của sáng chế là hữu ích, không kể những cái khác, trong việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện bệnh hoặc rối loạn bất kỳ có liên quan đến hoặc qua trung gian bởi sự biểu hiện hoặc hoạt tính của TrkB. Các kháng thể chủ vận TrkB của sáng chế có thể được sử dụng để cải thiện chức năng thần kinh và có thể được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ mà được đặc trưng một phần bởi sự thoái hóa tế bào, nhất là tổn thương tế bào thần kinh hoặc thoái hóa tế bào thần kinh, ví dụ chấn thương hệ thần kinh cấp tính hoặc bệnh thoái hóa thần kinh mạn tính.

Sáng chế bao gồm các phương pháp để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn của mắt bằng cách sử dụng cho bệnh nhân cần sự điều trị này một kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở chỗ khác trong tài liệu này.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp để ngăn ngừa tổn thương hoặc sự chết của các tế bào thần kinh võng mạc. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp để điều trị các bệnh lý mà trong đó có xảy ra sự thoái hóa võng mạc. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp để điều trị mắt trước hoặc sau phẫu thuật mắt, tiếp xúc với

ánh sáng hoặc thương tích môi trường khác, nhờ đó ngăn ngừa sự thoái hóa tế bào võng mạc. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp để ngăn ngừa tổn thương và thoái hóa tế bào cảm quang trong mắt. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp để bảo vệ tế bào thần kinh võng mạc mà không gây ra tác dụng phụ. Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể cung cấp phương pháp cho phép các tế bào cảm quang bị thương tổn được phục hồi hoặc tái tạo.

Theo một số phương án nhất định, các bệnh về mắt có thể điều trị bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể được chọn từ nhóm các bệnh bao gồm bệnh tăng nhãn áp, bệnh võng mạc tiểu đường, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác hoặc bệnh đa hồng cầu, bệnh thần kinh thị giác, thiếu máu cục bộ võng mạc, thoái hóa tế bào cảm quang, viêm võng mạc sắc tố, bệnh thanh manh mù bẩm sinh, bệnh lý thần kinh thị giác mù di truyền, hội chứng rối loạn thị giác, bệnh rối loạn di truyền võng mạc, và tắc động mạch hoặc tĩnh mạch võng mạc.

Các tình trạng bệnh lý về mắt khác có thể điều trị bằng một hoặc nhiều kháng thể kháng TrkB của sáng chế bao gồm bong võng mạc, bệnh võng mạc do bệnh lý, bệnh võng mạc do phẫu thuật (hoặc do cơ học hoặc do ánh sáng gây ra), bệnh võng mạc do nhiễm độc, bệnh võng mạc do sinh non, bệnh võng mạc do nhiễm độc liên quan đến AIDS; viêm màng bồ đào; bệnh võng mạc do thiếu máu cục bộ bởi tắc tĩnh mạch hoặc động mạch hoặc rối loạn mạch máu khác, bệnh võng mạc do chấn thương hoặc tổn thương thâm nhập vào mắt, bệnh lý màng cứng ngoại biên hoặc thoái hóa võng mạc di truyền.

Theo một phương án, các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể được tạo chế phẩm để phân phối trong dịch kính nhãn hoặc nội nhãn.

Sáng chế cũng cung cấp các phương pháp để điều trị các bệnh hoặc rối loạn hệ thần kinh trung ương hoặc ngoại biên khác, chẳng hạn như đột quỵ hoặc chấn thương sọ não. Hơn nữa, vì các kháng thể của sáng chế có tác dụng thúc đẩy khả năng sống của nơ-ron thần kinh và đóng vai trò như các chất bảo vệ thần kinh,

một hoặc nhiều kháng thể chủ vận bất kỳ có thể chứng minh là có lợi ích trong việc điều trị bệnh nhân mắc bệnh hoặc rối loạn về hệ thần kinh mà khả năng sống sót của tế bào thần kinh đóng vai trò chính trong việc phục hồi hoặc sửa chữa hư tổn tế bào do chấn thương hệ thần kinh, hoặc gây bởi một bệnh mà có ảnh hưởng lớn đến hệ thần kinh, bao gồm các bệnh thoái hóa thần kinh.

Trong phạm vi các phương pháp điều trị được mô tả trong tài liệu này, kháng thể kháng TrkB có thể được sử dụng dưới dạng đơn trị liệu (như là tác nhân trị liệu duy nhất) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung.

Trị liệu kết hợp và các dạng tạo chế phẩm

Sáng chế bao gồm các chế phẩm và các dạng tạo chế phẩm trị liệu có chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TrkB được mô tả trong tài liệu này kết hợp với một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung, và các phương pháp điều trị bao gồm việc sử dụng kết hợp các phương pháp điều trị đó cho các đối tượng cần điều trị.

Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế có thể được tạo chế phẩm cùng với và/hoặc được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm: một loại thuốc giúp giảm áp lực nội nhãn (thuốc hạ IOP), một chất kích thích thần kinh và chất đối kháng của yếu tố sinh trưởng nội mô mạch máu (VEGF), chẳng hạn như bẫy VEGF, ví dụ aflibercept (EYLEA®). Các loại thuốc khác có thể được kết hợp với các kháng thể TrkB của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở chất tương tự prostaglandin (ví dụ ZIOPTAN™, XALATAN®), thuốc chặn beta, (ví dụ TIMOPTIC XE®, ISTALOL®, BETOPTIC®S); một chất chủ vận alpha-2 adrenergic (ví dụ apraclonidin), chất ức chế anhydrasa cacbonic (ví dụ TRUSOPT®, AZOPT®), tác nhân cholinergic (ví dụ như ISOPTO®CNAMEINE, gel PILOPINE HS®), hoặc một loại thuốc điều trị kết hợp (một chất chặn beta cộng với chất ức chế anhydrasa cacbonic, ví dụ COMBIGAN™, COSOPT®).

Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế cũng có thể được sử dụng và/hoặc tạo chế phẩm cùng kết hợp với thuốc kháng vi-rút, kháng sinh, thuốc giảm đau, chất chống oxy hóa, chất ức chế COX và/hoặc NSAID. Các kháng thể kháng TrkB

cũng có thể được sử dụng cùng với các loại liệu pháp khác bao gồm liệu pháp tế bào gốc, phẫu thuật lọc tăng nhãn áp, phẫu thuật lazer, hoặc liệu pháp gen.

Các thành phần có hoạt tính trị liệu được bổ sung, ví dụ, chất bất kỳ được liệt kê ở trên hoặc các dẫn xuất của nó, có thể được sử dụng ngay trước, đồng thời với hoặc ngay sau khi sử dụng kháng thể kháng TrkB của sáng chế; (với các mục đích của sáng chế, các phác đồ sử dụng như vậy được coi là sử dụng kháng thể kháng TrkB "kết hợp với" một thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung). Sáng chế bao gồm các dược phẩm, trong đó một kháng thể kháng TrkB của sáng chế được tạo chế phẩm cùng với một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính trị liệu bổ sung như được mô tả ở những chỗ khác trong tài liệu này.

Phác đồ sử dụng

Theo các phương án nhất định của sáng chế, nhiều liều kháng thể kháng TrkB (hoặc một dược phẩm có chứa sự kết hợp của kháng thể kháng TrkB với tác nhân có hoạt tính trị liệu bổ sung bất kỳ trong số các tác nhân có hoạt tính trị liệu bổ sung được đề cập ở đây) có thể được sử dụng cho một đối tượng trong khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc sử dụng tuần tự cho một đối tượng nhiều liều kháng thể kháng TrkB của sáng chế. Như được sử dụng ở đây, "sử dụng tuần tự" có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng TrkB được sử dụng cho đối tượng điều trị tại mỗi thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau cách nhau với một khoảng thời gian định trước (ví dụ: giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế bao gồm các phương pháp bao gồm việc sử dụng tuần tự cho bệnh nhân liều duy nhất ban đầu của kháng thể kháng TrkB, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng TrkB, và sau đó tùy ý là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng TrkB.

Các thuật ngữ "liều ban đầu", "liều thứ hai" và "liều thứ ba" đề cập đến trình tự thời gian sử dụng kháng thể kháng TrkB của sáng chế. Do đó, "liều ban đầu" là liều được dùng khi bắt đầu phác đồ điều trị (còn được gọi là "liều cơ bản"); "liều thứ hai" là liều được dùng sau liều ban đầu; và "liều thứ ba" là liều được dùng sau liều thứ hai. Các liều ban đầu, thứ hai và thứ ba đều có thể chứa cùng lượng kháng thể kháng TrkB, nhưng nhìn chung có thể khác nhau về tần suất sử

dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, lượng kháng thể kháng TrkB được chứa trong liều ban đầu, thứ hai và/hoặc thứ ba là khác nhau (ví dụ, điều chỉnh tăng lên hoặc giảm xuống cho phù hợp) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án nhất định, hai hoặc nhiều liều (ví dụ: 2, 3, 4 hoặc 5) được sử dụng khi bắt đầu phác đồ điều trị là "liều tấn công", sau đó là các liều tiếp theo được sử dụng trên cơ sở là ít thường xuyên hơn (ví dụ: "các liều duy trì").

Theo các phương án điển hình nhất định của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc thứ ba được dùng từ 1 đến 26 (ví dụ: 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc nhiều tuần hơn) tuần sau liều dùng ngay trước đó. Cụm từ "liều ngay trước đó", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là, trong một chuỗi nhiều lần sử dụng, liều kháng thể kháng TrkB mà được sử dụng ngay trước cho bệnh nhân so với liều gần nhất của nó và trong khoảng thời gian đó không có sự can thiệp sử dụng liều nào.

Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân số các liều thứ 2 và/hoặc thứ ba bất kỳ của kháng thể kháng TrkB. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chỉ một liều thứ hai duy nhất được dùng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ hai (ví dụ: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc nhiều hơn) được dùng cho bệnh nhân. Tương tự như vậy, theo các phương án nhất định, chỉ một liều thứ ba duy nhất được dùng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ 3 (ví dụ: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc nhiều hơn) được dùng cho bệnh nhân. Phác đồ sử dụng có thể được thực hiện vô thời hạn trong suốt cuộc đời của một đối tượng cụ thể, hoặc cho đến khi việc điều trị như vậy là không còn cần thiết hoặc có lợi về mặt trị liệu.

Theo các phương án liên quan đến nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được dùng với cùng tần suất như các liều thứ hai khác. Ví dụ, mỗi liều thứ hai có thể được dùng cho bệnh nhân từ 1 đến 2 tuần hoặc từ 1 đến 2 tháng sau liều dùng ngay trước đó. Tương tự, theo các phương án liên quan đến nhiều liều dùng thứ ba, mỗi liều dùng thứ ba có thể được dùng với cùng tần số như các liều dùng

thứ ba khác. Ví dụ, mỗi liều dùng thứ ba có thể được dùng cho bệnh nhân từ 2 đến 12 tuần sau liều dùng ngay trước đó. Theo một số phương án nhất định của sáng chế, tần suất sử dụng liều dùng thứ hai và/hoặc liều dùng thứ ba cho bệnh nhân có thể thay đổi trong suốt phác đồ điều trị. Tần suất sử dụng cũng có thể được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sĩ, tùy theo nhu cầu của từng bệnh nhân sau khi khám lâm sàng.

Sáng chế bao gồm các phác đồ sử dụng trong đó từ 2 đến 6 liều tấn công được dùng cho bệnh nhân ở tần suất thứ nhất (ví dụ: một lần một tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, mỗi tháng một lần, hai tháng một lần, v.v.), tiếp theo là dùng hai hoặc nhiều hơn các liều duy trì cho bệnh nhân với tần suất cơ bản ít hơn. Ví dụ, theo khía cạnh này của sáng chế, nếu liều tấn công được sử dụng ở tần suất mỗi tháng một lần, thì liều duy trì có thể được dùng cho bệnh nhân sáu tuần một lần, hai tháng một lần, ba tháng một lần, v.v...

Sử dụng kháng thể chẩn đoán

Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc xác định TrkB hoặc các tế bào biểu hiện TrkB trong mẫu, ví dụ, cho mục đích chẩn đoán. Ví dụ: một kháng thể kháng TrkB hoặc đoạn của nó có thể được sử dụng để chẩn đoán tình trạng hoặc bệnh được đặc trưng bởi sự biểu hiện bất thường (ví dụ: biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện v.v.) của TrkB. Các xét nghiệm chẩn đoán điển hình cho TrkB có thể bao gồm, ví dụ, cho một mẫu được thu lấy từ bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể kháng TrkB của sáng chế, trong đó kháng thể kháng TrkB được dán nhãn với phân tử dán nhãn hoặc báo cáo có thể phát hiện được. Ngoài ra, một kháng thể kháng TrkB không dán nhãn có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai được gắn nhãn có khả năng phát hiện được. Phân tử dán nhãn hoặc báo cáo có thể phát hiện được có thể là đồng vị phóng xạ, như H^3 , C^{14} , P^{32} , S^{35} hoặc I^{125} ; gốc huỳnh quang hoặc quang hóa như florescein isothiocyanat hoặc rhodamin; hoặc enzym như phosphatase kiềm, beta-galactosidaza, horseradish peroxidaza hoặc luciferaza. Các xét nghiệm điển hình cụ thể có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định TrkB trong mẫu gồm có xét nghiệm hấp thụ miễn dịch

liên kết enzym (ELISA), xét nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) và phân loại tế bào được hoạt hoá bằng huỳnh quang (FACS).

Các mẫu có thể được sử dụng trong các xét nghiệm chẩn đoán TrkB theo sáng chế gồm có mẫu mô hoặc chất lỏng bất kỳ có thể được thu lấy từ bệnh nhân, mà có chứa lượng protein TrkB có thể phát hiện được, hoặc các mảnh của nó, trong điều kiện bình thường hoặc bệnh lý. Nói chung, mức độ TrkB trong một mẫu cụ thể được thu lấy từ bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ: bệnh nhân không mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến các mức hoặc hoạt tính bất thường của TrkB) sẽ được xác định để thiết lập mức TrkB cơ bản, hoặc tiêu chuẩn ban đầu. Mức TrkB cơ bản này sau đó có thể được so sánh với các mức TrkB xác định được trong các mẫu được thu lấy từ các cá nhân nghi ngờ mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh liên quan đến TrkB.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra để cung cấp cho những người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này với sự bộc lộ và mô tả đầy đủ về cách tạo ra và sử dụng các phương pháp và các chế phẩm của sáng chế, và nó không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của những gì các tác giả sáng chế coi như phát minh của họ. Các nỗ lực đã được thực hiện để đảm bảo độ chính xác liên quan đến các con số được sử dụng (ví dụ: lượng, nhiệt độ, v.v.) nhưng một số sai số và sai lệch thử nghiệm cần được tính đến. Trừ khi có chỉ định khác, phần là phần theo khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ tính bằng độ C, nhiệt độ phòng là khoảng 25°C, và áp suất là bằng hoặc gần bằng bằng áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Điều chế kháng thể người chống lại TrkB

Các kháng thể người chống lại TrkB đã được tạo ra ở chuột nhắt có chứa ADN mã hóa cho các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ kappa của globulin miễn dịch người. Theo một phương án, các kháng thể người được tạo ra ở chuột nhắt VELOCIMMUNE®. Theo một phương án, chuột nhắt VelocImmune® (VI) đã được chủng ngừa bằng TrkB (ecto)mFc người (ID SEQ NO: 77). Theo một

phương án, những con chuột nhắt VelocImmune® (VI) đã được chủng ngừa bằng TrkB(ecto)mFc chuột nhắt (ID SEQ NO: 80). Đáp ứng miễn dịch kháng thể được theo dõi bằng xét nghiệm miễn dịch đặc hiệu TrkB. Ví dụ, huyết thanh đã được thử nghiệm để xác định hiệu giá kháng thể cụ thể đối với TrkB có chiều dài đầy đủ đã được tinh chế. Các dòng vô tính tạo kháng thể đã được phân lập bằng cách sử dụng cả công nghệ phân loại tế bào B (BST) và phương pháp lai. Ví dụ, khi đáp ứng miễn dịch mong muốn đạt được, các tế bào lách được thu hoạch và hợp nhất với các tế bào u nguyên bào chuột nhắt để bảo tồn khả năng sống sót của chúng và tạo thành các dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai này được sàng lọc và chọn lọc để nhận diện các dòng tế bào tạo ra kháng thể đặc hiệu TrkB. Các kháng thể kháng TrkB chuột nhắt định được tạo ra theo cách này và được chỉ định là M2aM14173N, M2aM14178N và M2aM14179N.

Các kháng thể kháng TrkB cũng đã được phân lập trực tiếp từ các tế bào B chuột nhắt dương tính kháng nguyên mà không hợp nhất với các tế bào u nguyên bào, như được mô tả trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ 7582298, được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó. Bằng cách sử dụng phương pháp này, người ta đã thu lấy được một số kháng thể kháng TrkB hoàn toàn người (tức là, các kháng thể có các miền biến đổi người và các miền hằng định người); các kháng thể điển hình được tạo ra theo cách này được chỉ định là H4H9780P, H4H9814P và H4H9816P2.

Các đặc tính sinh học của các kháng thể điển hình được tạo ra theo các phương pháp của ví dụ này được mô tả chi tiết trong các ví dụ được nêu dưới đây.

Ví dụ 2: Các trình tự axit amin và nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ

Bảng 1a đưa ra các nhận dạng trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và các CDR của các kháng thể kháng TrkB được lựa chọn của sáng chế. Bảng 1b đưa ra các nhận dạng trình tự axit amin cho các chuỗi nặng và nhẹ có chiều dài đầy đủ của các kháng thể kháng TrkB đã được chọn của sáng chế. Các nhận dạng trình tự axit nucleic tương ứng cho các kháng thể kháng TrkB đã được chọn của sáng chế được nêu trong Bảng 2.

Bảng 1a: Nhận dạng trình tự axit amin

Tên Ab	HC VR	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LC VR	LCD R1	LCD R2	LCD R3	mIg G2a	LC hằng định
H4H978 0P	2	4	6	8	10	12	14	16		
H4H981 4P	18	20	22	24	26	28	30	32		
H4H981 6P2	34	36	38	40	42	44	46	48		
M2aM14 173N	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
M2aM14 178N	59	60	61	62	63	64	65	66	57	67
M2aM14 179N	68	69	70	71	72	73	74	75	57	58

Bảng 1b:

Tên Ab	Chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ	Chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ
H4H9780P	99	100
H4H9814P	101	102
H4H9816P2	103	104

Bảng 2: Nhận dạng trình tự axit nucleic

Tên Ab	VH	HCD R1	HCD R2	HCD R3	VK	LCDR 1	LCD R2	LCD R3
H4H9780P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H9814P	17	19	21	23	25	27	29	31

H4H9816P2	33	35	37	39	41	43	45	47

Các kháng thể thường được đề cập ở đây theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ: "H4H," "H2M," v.v.), theo sau là nhận dạng bằng số (ví dụ: "9780," "9816," v.v..., như được thể hiện trong bảng 1 hoặc bảng 2), theo sau là hậu tố "P," "P2," hoặc "N". Tiền tố H4H trên ký hiệu kháng thể chỉ ra isotype vùng Fc cụ thể của kháng thể. Do đó, theo danh pháp này, một kháng thể có thể được đề cập ở đây như, ví dụ, "H4H9780P", mà chỉ ra vùng IgG4 Fc người và M2aM14179N, ví dụ, chỉ ra vùng IgG2a Fc chuột nhất. Các vùng biến đổi là hoàn toàn người nếu được biểu thị bằng chữ 'H' ở đầu tiên trong ký hiệu kháng thể. Tiền tố 'M' ký hiệu vùng biến đổi chuột nhất. Như sẽ được đánh giá cao bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này, một kháng thể có isotype Fc cụ thể có thể được chuyển hoá thành một kháng thể có isotype Fc khác (ví dụ, một kháng thể với IgG1 Fc chuột nhất có thể được chuyển đổi thành kháng thể có IgG4 người v.v...), nhưng trong bất kỳ trường hợp nào, các miền biến đổi (bao gồm các CDR) - được biểu thị bằng các nhận dạng bằng số được trình bày trong bảng 1 hoặc bảng 2 - sẽ vẫn giữ nguyên và các đặc tính liên kết với kháng nguyên được dự kiến sẽ giống hệt nhau hoặc về cơ bản giống nhau bất kể bản chất của miền Fc.

Ví dụ 3. Động học liên kết biacore của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB liên kết với các thuốc thử TrkB khác nhau, được xác định ở nhiệt độ 25 °C và 37 °C

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị K_D) đối với TrkB liên kết với các kháng thể đơn dòng kháng TrkB đã được tinh chế, được xác định bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực, bằng cách sử dụng dụng cụ Biacore 4000. Tất cả các nghiên cứu liên kết đã được thực hiện trong 10mM Hepes có độ pH 7,4, 150mM NaCl, 3mM EDTA và 0,05% theo thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20 (dung dịch đệm chạy HBS-ET) ở nhiệt độ 25°C và 37°C. Bề mặt cảm biến Biacore đầu tiên được tạo dẫn xuất bằng cách ghép

amin với đoạn F(ab')₂ của kháng thể đa dòng đặc hiệu kháng Fcγ người của dê (Phòng thí nghiệm Jackson ImmunoResearch, # 109-006-098) hoặc kháng thể đa dòng kháng Fc chuột của thỏ (GE Healthcare # BR-1008-38) để bắt các kháng thể đơn dòng kháng TrkB. Các nghiên cứu liên kết được thực hiện trên các thuốc thử TrkB sau đây; miền ngoại bào TrkB người được biểu hiện bằng thể myc-myc-hexahistidin đầu C (hTRKB.mmH; SEQ ID NO: 76; Số truy cập NP_001018074.1), miền ngoại bào TrkB chuột nhắt được biểu hiện bằng thể myc-myc-myc đầu C (mTRKB.mmH; SEQ ID NO: 79; số truy cập NP_001020245), miền ngoại bào TrkB chuột cống được biểu hiện bằng thể myc-myc-hexahistidin đầu C (rTRKB.mmH; SEQ ID NO: 84; Số truy cập NP_036863.1), và miền ngoại bào TrkB người được biểu hiện bằng thể IgG2a Fc đầu C chuột nhắt (hTrkB-mFc; SEQ ID NO: 77; số truy cập NP_001018074.1). Các nồng độ thuốc thử TrkB khác nhau lần đầu tiên được điều chế trong dung dịch đệm chạy HBS-ET (100nM - 1,23nM; pha loãng liên tiếp 3 lần) và được tiêm lên bề mặt kháng thể đơn dòng kháng TrkB đã bắt kháng Fc người trong 4 phút với tốc độ dòng chảy 30 µL/phút, trong khi sự phân ly của kháng thể đơn dòng gắn với thuốc thử TrkB được theo dõi trong 10 phút trong dung dịch đệm chạy HBS-ET. Các hằng số tốc độ động học liên kết (k_a) và phân ly (k_d) được xác định bằng cách khớp các biểu đồ cảm biến liên kết thời gian thực với mô hình liên kết 1:1 với giới hạn vận chuyển khối lượng bằng cách sử dụng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Các hằng số phân ly cân bằng (K_D) và thời gian bán thải phân ly ($t_{1/2}$) được tính từ các hằng số tốc độ động học là:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a} \text{ và } t_{1/2} (\text{phút}) = \frac{\ln(2)}{60 \times k_d}$$

Các thông số động học liên kết đối với hTrkB.mmH, mTrkB.mmH, rTrkB.mmH hoặc hTrkB-mFc khi liên kết với các kháng thể đơn dòng kháng TrkB khác nhau của sáng chế ở nhiệt độ 25°C và 37°C được thể hiện trong các Bảng 3 đến Bảng 10.

Tóm tắt các kết quả

Ở nhiệt độ 25°C, các kháng thể đơn dòng kháng TrkB liên kết với hTrkB.mmH với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 545pM đến 41,3nM, như thể hiện trong Bảng 3. Ở nhiệt độ 37°C, các kháng thể đơn dòng liên kết với hTrkB.mmH với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 2,28nM đến 135nM, như thể hiện trong Bảng 4.

Ở nhiệt độ 25°C, các kháng thể đơn dòng kháng TrkB liên kết với hTrkB-mFc với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 31,1pM đến 4,48nM, như thể hiện trong Bảng 5. Ở nhiệt độ 37°C, các kháng thể đơn dòng kháng TrkB liên kết với hTrkB-mFc với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 73,3pM đến 3,46nM, như thể hiện trong Bảng 6.

Ở nhiệt độ 25°C, kháng thể đơn dòng kháng TrkB so sánh, được chỉ ra ở đây là H1M8037C, (xem US2010/0196390, kháng thể được ký hiệu là C2; xem thêm SEQ ID NO: 97 và 98 cho chuỗi nặng và nhẹ so sánh, tương ứng là các trình tự axit amin) liên kết với mTrkB.mmH với giá trị K_D là 40,8nM, như thể hiện trong Bảng 7. Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế không liên kết với mTrkB.mmH ở nhiệt độ 25°C, như thể hiện trong Bảng 7. Ở nhiệt độ 37°C, kháng thể đơn dòng kháng TrkB so sánh liên kết với mTrkB.mmH có giá trị K_D là 94,1nM, như thể hiện trong Bảng 8. Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế không liên kết với mTrkB.mmH ở nhiệt độ 37°C, như thể hiện trong Bảng 8.

Ở nhiệt độ 25 °C, kháng thể đơn dòng kháng TrkB so sánh liên kết với rTrkB.mmH có giá trị K_D là 31,8nM, như thể hiện trong Bảng 9. Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế không liên kết với rTrkB.mmH ở nhiệt độ 25°C, như thể hiện trong Bảng 9. Ở nhiệt độ 37°C, kháng thể đơn dòng kháng TrkB liên kết với rTrkB.mmH có giá trị K_D là 87,5nM, như thể hiện trong Bảng 10. Các kháng thể kháng TrkB của sáng chế không liên kết với rTrkB.mmH ở nhiệt độ 37°C, như thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 3: Các tham số động học liên kết của hTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 25°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất	100nM hTrkB.m	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
-----------------------	------------	---------------	-----------------	----------------	--------------	---------------------

	phân tích bắt được (RU)	mH đã liên kết (RU)				
H4H9780P	116 ± 2,8	20	4,00E+0 4	8,67E- 04	2,17E- 08	13
H4H9814P	93 ± 2,1	63	1,26E+0 6	6,86E- 04	5,45E- 10	17
H4H9816P2	138 ± 1,5	30	6,14E+0 4	8,45E- 04	1,38E- 08	14
Bộ so sánh H1M8037C *	757	23	4,65E+0 4	1,92E- 03	4,13E- 08	6

* chỉ ra rằng mAb đã bị bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc

Bảng 4: Các thông số động học liên kết của hTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 37°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	100nM hTrkB.m mH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H9780P	64 ± 1,9	14	5,71E+0 4	3,64E- 03	6,38E- 08	3,2
H4H9814P	52 ± 1,2	32	2,05E+0 6	4,68E- 03	2,28E- 09	2,5
H4H9816P2	80 ± 2,3	12	5,28E+0 4	3,74E- 03	7,08E- 08	3,1
Bộ so sánh H1M8037C*	815,11	28	6,13E+0 4	8,31E- 03	1,35E- 07	1,4

* chỉ ra rằng mAb đã bị bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc

Bảng 5: Các thông số động học liên kết của hTrkB-mFc liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 25°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	100nM hTrkB-mFc đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H9780P	105 ± 1,6	14	3,74E+0 4	1,68E-04	4,48E-09	69
H4H9814P	83 ± 1,3	69	1,91E+0 6	5,95E-05	3,11E-11	194
H4H9816P2	131 ± 1	25	6,52E+0 4	7,98E-05	1,22E-09	145
Bộ so sánh H1M8037C *	753	41	8,80E+0 4	9,55E-05	1,09E-09	121

* chỉ ra rằng mAb đã bị bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc

Bảng 6: Các thông số động học liên kết của hTrkB.mFc liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 37°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	100nM hTrkB-mFc đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H9780P	56 ± 1	14	6,65E+0 4	2,22E-04	3,33E-09	52
H4H9814P	46 ± 1	42	2,83E+0 6	2,08E-04	7,33E-11	56

H4H9816P2	$71 \pm 1,4$	14	$6,95E+0$ 4	$2,40E-$ 04	$3,46E-$ 09	48
Bộ so sánh H1M8037C *	814,46	58	$2,35E+0$ 5	$2,92E-$ 04	$1,24E-$ 09	40

* chỉ ra rằng mAb được bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc.

Bảng 7: Các thông số động học liên kết của mTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 25°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	100nM mTrkB.mH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H9780P	$111 \pm 0,7$	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	$88 \pm 0,7$	-2	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	$135 \pm 0,6$	0	NB	NB	NB	NB
Bộ so sánh H1M8037C *	755	26	$4,12E+0$ 4	$1,68E-$ 03	$4,08E-$ 08	7

* chỉ ra rằng mAb được bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc.

Bảng 8: Các thông số động học liên kết của mTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 37°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích	100nM mTrkBmH đã	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
-----------------------	----------------------	------------------	-----------------	----------------	--------------	---------------------

	bắt được (RU)	liên kết (RU)				
H4H9780P	$60 \pm 0,7$	1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	$49 \pm 0,6$	0	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	$75 \pm 0,9$	0	NB	NB	NB	NB
Bộ so sánh H1M8037C *	815,95	31	7,40E+0 4	6,96E- 03	9,41E- 08	1,7

* chỉ ra rằng mAb được bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc.

Bảng 9: Các thông số động học liên kết của rTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 25°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	100nM rTrkB.mm H đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H9780P	$108 \pm 0,7$	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	$86 \pm 0,4$	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	$134 \pm 0,3$	0	NB	NB	NB	NB
Bộ so sánh H1M8037C *	756	26	5,16E+ 04	1,60E-03	3,10E- 08	7

* chỉ ra rằng mAb được bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc.

Bảng 10: Các thông số động học liên kết của rTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 37°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	100nM rTrkB.mmH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H9780P	59 ± 0,2	0	NB	NB	NB	NB
H4H9814P	48 ± 0,5	-1	NB	NB	NB	NB
H4H9816P2	74 ± 0,6	0	NB	NB	NB	NB
Bộ so sánh H1M8037C *	815,45	32	7,93E+04	6,94E-03	8,75E-08	1,7

* chỉ ra rằng mAb được bắt bằng cách sử dụng bề mặt cố định kháng mFc.

Ví dụ 4. Động học liên kết biacore của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB thay thế liên kết với các thuốc thử TrkB khác nhau được đo ở nhiệt độ 25°C

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị K_D) đối với TrkB liên kết với các kháng thể đơn dòng kháng TrkB đã tinh chế, được xác định bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực, bằng cách sử dụng dụng cụ Biacore T200. Tất cả các nghiên cứu liên kết đã được thực hiện trong 10mM HEPES có độ pH 7,4, 150mM NaCl, 3mM EDTA và 0,05% theo thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20 (dung dịch đệm chạy HBS-ET) ở nhiệt độ 25°C. Bề mặt cảm biến Biacore được tạo dẫn xuất đầu tiên bằng cách ghép amin với kháng thể đa dòng kháng Fc chuột của thỏ (GE Healthcare #BR-1008-38) để bắt các kháng thể đơn dòng kháng TrkB. Các nghiên cứu liên kết được thực hiện trên các thuốc thử TrkB sau đây; miền ngoại bào TrkB người được biểu hiện bằng thể myc-myc-hexahistidin đầu C (hTRKB.mmH; SEQ ID NO: 76; NP_001018074.1), miền ngoại bào TrkB chuột nhất được biểu hiện bằng thể myc-myc-hexahistidin đầu C (mTRKB.mmH; SEQ ID NO: 79; NP_001020245), và miền ngoại bào TrkB chuột cống được biểu hiện bằng thể myc-myc-hexahistidin đầu C (rTRKB.mmH; SEQ ID NO: 84; XP_002721319.1). Các nồng độ khác nhau của thuốc thử TrkB được

điều chế đầu tiên trong dung dịch đệm chạy HBS-ET (90nM - 3,33nM; pha loãng liên tiếp 3 lần) và được tiêm trên bề mặt kháng thể đơn dòng kháng TrkB bắt kháng Fc chuột nhất trong 4 phút với tốc độ dòng chảy 50 μ L/phút, trong khi sự phân ly của kháng thể đơn dòng gắn với thuốc thử TrkB được theo dõi trong 10 phút trong dung dịch đệm chạy HBS-ET. Các hằng số tốc độ động học liên kết (k_a) và phân ly (k_d) được xác định bằng cách khớp các biểu đồ cảm biến liên kết thời gian thực với mô hình liên kết 1:1 với giới hạn vận chuyển khối lượng bằng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Các hằng số phân ly cân bằng (K_D) và thời gian bán thải phân ly ($t_{1/2}$) được tính từ các hằng số tốc độ động học là:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{và} \quad t_{1/2} (\text{phút}) = \frac{\ln(2)}{60 \times k_d}$$

Các thông số động học liên kết đối với hTrkB.mmH, mTrkB.mmH hoặc rTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng kháng TrkB khác nhau của sáng chế ở nhiệt độ 25° C được thể hiện trong các Bảng 11 đến Bảng 13.

Kết quả

Ở nhiệt độ 25°C, các kháng thể đơn dòng kháng TrkB thay thế của sáng chế cho thấy không có sự liên kết với hTrkB.mmH, như thể hiện trong Bảng 11.

Ở nhiệt độ 25°C, các kháng thể đơn dòng kháng TrkB thay thế của sáng chế liên kết với mTrkB.mmH với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 2,39 nM đến 32,4 nM như thể hiện trong Bảng 12.

Ở nhiệt độ 25°C, các kháng thể đơn dòng kháng TrkB thay thế của sáng chế liên kết với rTrkB.mmH với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 2,56nM đến 26,9nM, như thể hiện trong Bảng 13.

Bảng 11: Các thông số động học liên kết của hTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 25°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân	90nM hTrkB.mmH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
--------------------------	--------------------	-------------------	-----------------	----------------	--------------	---------------------

	tích bắt được (RU)	đã liên kết (RU)				
M2aM14173N	$230 \pm 0,8$	0	NB	NB	NB	NB
M2aM14178N	$125 \pm 0,1$	-1	NB	NB	NB	NB
M2aM14179N	$396 \pm 2,1$	-2	NB	NB	NB	NB

Bảng 12: Các thông số động học liên kết của mTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 25°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	90nM mTrkB. mmH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
M2aM14173N	$236 \pm 1,1$	33	$7,41E+04$	$6,30E-04$	$8,49E-09$	18
M2aM14178N	$126 \pm 0,3$	12	$1,03E+05$	$2,47E-04$	$2,39E-09$	47
M2aM14179N	$416 \pm 4,3$	32	$1,15E+05$	$3,72E-03$	$3,24E-08$	3,1

Bảng 13: Các thông số động học liên kết của rTrkB.mmH liên kết với các kháng thể đơn dòng TrkB ở nhiệt độ 25°C.

Chất phân tích bị bắt	Lượng chất phân tích bắt được (RU)	90nM rTrkB.mm H đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
M2aM14173 N	$233 \pm 0,7$	33	$7,90E+04$	$6,32E-04$	$8,00E-09$	18

M2aM14178 N	125 ± 0,3	11	9,00E+0 4	2,30E -04	2,56E -09	50
M2aM14179 N	404 ± 2,5	33	1,48E+0 5	3,98E -03	2,69E -08	2,9

Ví dụ 5. Xét nghiệm sinh học với các tế bào HEK293/SRE-luc/hTrkB và HEK293/SRE-luc/mTrkB (Ecto)-hTrkB (TM-Cyto).

Xét nghiệm sinh học đã được phát triển để phát hiện sự hoạt hoá của TrkB bằng cách sử dụng gen báo cáo luciferaza dưới sự kiểm soát của yếu tố phản ứng huyết thanh (SRE) và yếu tố thần kinh có nguồn gốc phối tử, não (BDNF, Các hệ thống nghiên cứu và phát triển). Các dòng tế bào HEK293 được tạo ra mà biểu hiện ổn định một gen báo cáo luciferaza (yếu tố phản ứng SRE-luciferaza, SRE-luc, SA Bioscience, # CLS-010L) với miền ngoại bào TrkB người (hTrkB, các axit amin 32-429 của NP_001018074.1-1 hoặc Uniprot số Q16620-1) hoặc TrkB chuột nhất được hợp nhất với các miền xuyên màng và miền tế bào chất của TrkB người (mTrkB, các axit amin 32-429 của NP_001020245.1 hoặc Uniprot số P15209-1 hợp nhất với hTrkB, các axit amin 430-822). Các dòng tế bào ổn định HEK293/SRE-Luc/hTrkB và HEK293/SRE-Luc/mTrkB, được duy trì trong DMEM, bổ sung FBS 10%, các axit amin không thiết yếu, penicillin/streptomycin/glutamin, puromycin nồng độ 1µg/mL và G418 nồng độ 500µg/mL.

Đối với xét nghiệm sinh học, các tế bào được gieo vào các đĩa xét nghiệm 96 giếng ở mật độ 20.000 tế bào/giếng trong Opti-MEM™, bổ sung FBS 0,1%, penicillin/streptomycin và L-glutamin, và sau đó được ủ qua đêm ở 37°C trong CO₂ 5%. Sáng hôm sau, BDNF hoặc các kháng thể người được pha loãng liên tiếp từ 100nM đến 0,002nM (thêm một mẫu chỉ chứa dung dịch đệm mà không có phối tử) và được thêm vào các tế bào này để xác định sự hoạt hoá của sự dẫn truyền tín hiệu TrkB. Các kháng thể được pha loãng liên tiếp cũng được thử nghiệm với BDNF nồng độ 100pM (Hệ thống nghiên cứu và phát triển, 248-BD/CF). Sau đó, các tế bào được ủ trong 5,5 giờ ở nhiệt độ 37°C với sự có mặt

của CO₂ 5%. Hoạt tính luciferaza được xác định sau khi thêm thuốc thử OneGlo (Promega) bằng cách sử dụng dụng cụ Victor X (Perkin Elmer). Kết quả được phân tích bằng cách sử dụng hồi quy phi tuyến tính (4 tham số) bằng phần mềm Prism 5 (GraphPad) để thu được các giá trị EC₅₀ và IC₅₀. Sự hoạt hoá tối đa của các kháng thể được tính toán như sau:

$$\text{Sự hoạt hoá tối đa (\%)} = \frac{(\text{RLU tối đa đạt được bằng kháng thể}) - (\text{RLU đạt được khi không có BDNF})}{(\text{RLU tối đa đạt được bằng BDNF}) - (\text{RLU đạt được khi không có BDNF})} \times 100$$

Tóm tắt kết quả và kết luận:

Như được thể hiện trong Bảng 14, ba kháng thể kháng TrkB của sáng chế H4H9816P2, H4H9814P, H4H9780P thể hiện sự hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong các tế bào HEK293/SRE-luc/hTrkB khi không có mặt của BDNF với EC₅₀s nằm trong khoảng 35-82pM sự hoạt hoá tối đa nằm trong khoảng 88-92%. Ba kháng thể của sáng chế cũng được thử nghiệm với sự có mặt của BDNF nồng độ 100pM. Trong khi BDNF nồng độ 100pM thể hiện sự hoạt hoá ở mức 56% với sự có mặt của mAb đối chứng không liên quan, mAb2 đối chứng, thì các kháng thể của sáng chế thể hiện sự hoạt hoá thêm với EC₅₀s nằm trong khoảng 45-76pM với sự hoạt hoá tối đa nằm trong khoảng 77-80%. Ba kháng thể kháng TrkB của sáng chế không thể hiện sự hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB chuột nhắt trong các tế bào HEK293/SRE-luc/mTrkB khi không có mặt BDNF hoặc có mặt BDNF có nồng độ 100pM. mAb1 đối chứng, một kháng thể so sánh kháng TrkB H1M8037C, thể hiện sự hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người với EC₅₀ là 76pM với sự hoạt hoá tối đa 78% và TrkB chuột nhắt với EC₅₀ là 43pM với sự hoạt hoá tối đa 85% mà không có mặt BDNF. Với sự có mặt của BDNF nồng độ 100pM, mAb1 đối chứng đã hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người với EC₅₀ là 110pM với sự hoạt hoá tối đa 79% và TrkB chuột nhắt với EC₅₀ là 42pM, với sự hoạt hoá tối đa 69%, lớn hơn sự hoạt hoá bởi mAb2 đối chứng với sự có mặt của BDNF nồng độ 100pM. mAb 2 đối chứng, kháng thể IgG4

người không liên quan, không thể hiện sự kích hoạt bất kỳ khi có mặt hoặc không có mặt của BDNF nồng độ 100pM.

Như được thể hiện trong Bảng 15, ba kháng thể kháng TrkB của sáng chế M2aM14173N, M2aM14178N, M2aM14179N thể hiện sự hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB chuột nhất trong các tế bào HEK293/SRE-Luc/mTrkB trong trường hợp không có BDNF với giá trị EC_{50} s nằm trong khoảng 34 – 190pM với sự hoạt hoá tối đa nằm trong khoảng 76-94%. Ba kháng thể của sáng chế cũng được thử nghiệm với sự có mặt của BDNF nồng độ 100pM. Trong khi BDNF có nồng độ 100pM, thể hiện sự hoạt hoá ở mức 60% với sự có mặt của mAb đối chứng isotype không liên quan, mAb4 đối chứng, các kháng thể của sáng chế thể hiện sự hoạt hoá thêm với EC_{50} s nằm trong khoảng 17 - 100pM với sự hoạt hoá tối đa nằm trong khoảng 67 - 75%. Ba kháng thể kháng TrkB của sáng chế không thể hiện sự hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người trong các tế bào HEK293/SRE-Luc/hTrkB khi có mặt hoặc không có mặt của BDNF nồng độ 100pM. mAb1 đối chứng thể hiện sự hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người với EC_{50} là 57pM với sự hoạt hoá tối đa 80% và TrkB chuột nhất với EC_{50} là 43pM với sự hoạt hoá tối đa 85% khi không có BDNF. Với sự có mặt của BDNF nồng độ 100pM, mAb1 đối chứng đã hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người với EC_{50} là 110pM với sự hoạt hoá tối đa 79% và TrkB chuột nhất với EC_{50} là 42pM với sự hoạt hoá tối đa 69%, lớn hơn sự hoạt bởi mAb4 đối chứng với BDNF nồng độ 100pM. mAb3 đối chứng và mAb4 đối chứng, các kháng thể đối chứng isotype IgG2a chuột nhất không liên quan, không thể hiện sự hoạt hoá bất kỳ khi không có mặt hoặc có mặt của BDNF nồng độ 100pM.

Lập bảng tóm tắt dữ liệu:

Bảng 14: Sự hoạt hoá của các tế bào HEK293/SRE-Luc/hTrkB và HEK293/SRE-Luc/mTrkB bởi các kháng thể kháng TrkB

Tế bào	HEK293/SRE-luc/hTrkB	HEK293/SRE-luc/mTrkB
BDNF	1,0E-10	7,4E-11

Phối tử	Không có BDNF		BDNF 100pM		Không có BDNF		BDNF 100pM	
Kháng thể	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)
H4H9780 P	8,2E-11	88	7,6E-11	77	Không hoạt hoá	0	Không hoạt hoá	55
H4H9814 P	3,5E-11	92	4,9E-11	80	Không hoạt hoá	0	Không hoạt hoá	54
H4H9816 P2	6,3E-11	90	4,5E-11	78	Không hoạt hoá	0	Không hoạt hoá	58
mAb1 đối chứng (Bộ so sánh H1M803 7C)	7,6E-11	78	1,1E-10	79	4,3E-11	85	4,2E-11	69
mAb2 đối chứng isotype âm	Không hoạt hoá	3	Không hoạt hoá	56	Không hoạt hoá	0	Không hoạt hoá	54

Bảng 15: Sự hoạt hoá của các tế bào HEK293/SRE-Luc/hTrkB và HEK293/SRE-Luc/mTrkB bởi các kháng thể kháng TrkB (thay thế)

Tế bào	HEK293/SRE-luc/hTrkB				HEK293/SRE-luc/mTrkB			
BDNF	1,3E-10		1,0E-10		7,4E-11		1,1E-10	
Phối tử	Không có BDNF		BDNF 100pM		Không có BDNF		BDNF 100pM	
Kháng thể	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)	EC50 (M)	Sự hoạt hoá (%)
M2aM141 73N	Không hoạt hoá	2	Không hoạt hoá	59	3,6E-11	94	1,7E-11	74
M2aM141 78N	Không hoạt hoá	0	Không hoạt hoá	52	1,9E-10	76	1,0E-10	67
M2aM141 79N	Không hoạt hoá	4	Không hoạt hoá	52	3,4E-11	87	2,1E-11	75
mAb1 đối chứng (Bộ so sánh H1M8037 C)	5,7E-11	80	1,1E-10	79	4,3E-11	85	4,2E-11	69
mAb3 đối chứng isotype âm	Không hoạt hoá	0	Không thử nghiệm	Không thử nghiệm	Không thử nghiệm	Không thử nghiệm	Không thử nghiệm	Không thử nghiệm

mAb4 đối chứng isotype âm	Không thử nghiệm	Không thử nghi ệm	Không hoạt hoá	61	Không hoạt hoá	0	Không hoạt hoá	60
------------------------------------	------------------------	----------------------------	----------------------	----	----------------------	---	----------------------	----

Ví dụ 6. So sánh in vivo về tác dụng của kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2 và đối chứng isotype IgG4 REGN1945 đối với sự phosphoryl hóa TrkB trong não sau khi tiêm stereotaxic ở TrkB^{hu/hu} chuột nhắt

Để xác định tác dụng kháng thể chủ vận TrkB của sáng chế, H4H9816P2, đối với động học sự hoạt hoá TrkB, một nghiên cứu theo tiến trình thời gian về sự phosphoryl hóa TrkB sau khi tiêm trực tiếp vùng đồi thị được thực hiện ở đồng hợp tử chuột nhắt với thụ thể TrkB người thay cho thụ thể TrkB chuột nhắt (gọi tắt là chuột nhắt TrkB^{hu/hu}). Chuột nhắt TrkB^{hu/hu} (N = 48) được tiêm lập thể hai bên với hoặc là 2 µL chất mang (PBS), REGN1945 dưới đây được ghi nhận là kháng thể đối chứng isotype IgG4 (nồng độ cuối cùng 27,5 mg/mL), hoặc là kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2 (nồng độ cuối cùng 27,5 mg/ml) vào vùng hải mã, tại vị trí -2mm phía sau và + 1,5mm cạnh bên so với thóp đầu. Để giảm thiểu tổn thương mô, việc tiêm và loại bỏ kim tiêm đều được thực hiện từ từ trong khoảng thời gian 5 phút. Chuột nhắt TrkB^{hu/hu} sau đó đã bị chết bằng trợ tử CO₂ trong khoảng 30 phút, 1 giờ, 4 giờ hoặc 18 giờ sau khi tiêm. Một thiết bị lấy máu được thực hiện thông qua việc chọc thủng tim để lấy máu, và sau đó chuột được tưới máu qua tim bằng nước muối lạnh có heparin. Não được lấy ra khỏi hộp sọ một cách cẩn thận, và một phần mô 2 mm³ xung quanh vị trí tiêm được cắt ra, gom lại trong ống Eppendorf và được lưu giữ trên băng. Phần não sau đó được phân giải trong 300µL dung dịch đệm phân giải RIPA (ThermoFisher Scientific, Cat# 89901) có chứa 2x các chất ức chế proteaza và phosphatasa (ThermoFisher Scientific, Cat#78444) và được lưu trữ trên băng. Các mô đã được phân giải sau đó được đồng nhất hóa để xử lý tiếp, được phân nhỏ và lưu trữ ở -80°C.

Để đánh giá sự phosphoryl hóa TrkB trong mô não, kết tủa miễn dịch và

phương pháp western blot đã được thực hiện. Kháng thể kháng TrkB người H4H10108N không cạnh tranh liên kết với H4H9816P2 đã được ghép với các hạt Sepharose được hoạt hoá NHS (được điều chế bằng cách sử dụng giao thức nhà sản xuất; GE HealthCare, Cat#17-0906) và được rửa bằng DPBS ba lần để loại bỏ dung dịch bảo quản bất kỳ còn lại. Phân giãn não đồng nhất được làm tan bằng và pha loãng đến nồng độ 1 mg/mL (tỉ lệ khối lượng não trên thể tích dung dịch đệm) trong dung dịch đệm bao gồm NP-40 1%, Tween-20 0,1%, chất ức chế proteaza và phosphatasa trong TBST. Nồng độ protein của phân giãn não đồng nhất được định lượng bằng cách thực hiện xét nghiệm BCA tiêu chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Science Pierce, Cat#23225). Với mỗi 100 ug protein, 15 uL kháng thể kháng TrkB người (H4H10108N) hạt Sepharose được hoạt hóa NHS được thêm vào dung dịch phân giãn não và hỗn hợp này được ủ qua đêm ở 4°C và rung nhẹ ở tốc độ 20 vòng/phút (Máy quay nhiệt). Ngày hôm sau, các mẫu được ly tâm ở 1000 x g trong một phút và phần nổi sau đó được loại bỏ một cách cẩn thận. Các hạt sau đó được rửa hai lần với 400 uL dung dịch muối đệm Tris (Bio-Rad, Cat #1706435) với Tween-20 1% (Sigma Aldrich, Cat#P9416) (TBST). Sau khi hút một cách cẩn thận dung dịch đệm rửa, 60 uL axit trifloroaxetic 0,1% (TFA; Sigma-Aldrich, T62200) trong nước ở độ pH 3,0 được thêm vào từng mẫu. Dung dịch được trộn và để yên trong hai phút trước khi được thu nhận và chuyển vào ống phân tách. Quá trình này được lặp lại với 60 uL TFA 0,1% nữa ở độ pH 3,0. Hai dung dịch TFA 0,1% cho mỗi mẫu sau đó đã được kết hợp và được thêm vào 2 uL Tris-HCl (ThermoFisher Scientific, Cat#15567-027), ở độ pH 8,5.

Dung dịch được làm khô bằng cách sử dụng máy hút chân không tốc độ cao và sau đó được tái phân tán và được khử với hỗn hợp của 20 uL 1x đệm Laemmli (Bio-Rad, Cat # 1610737) cộng với 355nM 2-mercaptoethanol (BME; Gibco, Cat#21985-023). Các mẫu được đun sôi ở 95°C trong 10 phút và được nạp vào 10 giếng, gel Mini-Protean 4-15% Tris-Glyxin (Bio-Rad, Cat#4561086). Sau khi điện di, các mẫu protein được chuyển từ gel Tris-Glyxin lên màng PVDF (Bio-Rad, Cat#170-4156) thông qua Hệ thống chuyển đổi Turbo Trans-Blot (Bio-Rad,

Cat#1704156) trong suốt 30 phút ở tốc độ không đổi là 1,3A và 25V. Sau khi chuyển, màng được chặn với sữa 2,5% (Bio-Rad, Cat#170-6406) trong TBST trong một giờ ở nhiệt độ phòng, và sau đó được thăm dò qua đêm với hoặc là kháng thể kháng phospho-TrkB (Novus, Cat#NB100-92656) pha loãng đến 1:1000 trong dung dịch BSA 2,5%, hoặc là kháng thể thứ nhất kháng TrkB (Tín hiệu tế bào, Cat#4603) pha loãng đến 1:1000 trong sữa 2,5% trong TBST ở 4°C trên máy lắc ở tốc độ 30 vòng/phút. Ngày hôm sau, các blot được rửa bằng TBST và ủ bằng kháng thể kháng IgG thứ hai được liên hợp với horseradish peroxidaza (Jackson, Cat#111-035-144) ở tỷ lệ 1:1000 trong sữa 1% trong TBST trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các blot sau đó được rửa lại, được phát triển bằng dung dịch ECL (PerkinElmer, Inc. Cat#RPN2106), và các lần phơi sáng hình ảnh tiếp theo được thực hiện sau mỗi 30 giây.

Tóm tắt kết quả và kết luận:

Kết quả miễn dịch và sau đó western blot đối với protein có nguồn gốc từ phân giải não chuột TrkB^{hu/hu} đã chứng minh rằng sự phosphoryl hóa TrkB vùng đầu thị có thể phát hiện được ở chuột nhất được tiêm kháng thể chủ vận TrkB, H4H9816P2, nhưng không phải ở chuột nhất được điều trị với chất mang hoặc kháng thể đối chứng isotype như thể hiện trong Hình 1. Trong số các thời điểm được đánh giá, sự phosphoryl hóa TrkB đạt cực đại tại 4 giờ sau khi tiêm lập thể ở chuột được tiêm H4H9816P2. Sự phosphoryl hóa TrkB cũng được phát hiện bởi western blot sau khi tiêm 18 giờ trên một số nhưng không phải tất cả các con chuột nhất. Ngược lại, tiêm chất mang và kháng thể đối chứng isotype IgG4 không gây ra sự phosphoryl hóa TrkB ở bất kỳ mốc thời gian nào. Western blot cũng chỉ ra rằng tổng mức thụ thể TrkB đã được điều chỉnh giảm xuống ở một số, nhưng không phải tất cả các con chuột nhất TrkB^{hu/hu} được tiêm H4H9816P2 so với những con chuột nhất được tiêm chất mang và đối chứng isotype. Tổng mức TrkB dường như được điều chỉnh giảm nhẹ ở các đối tượng được điều trị bằng H4H9816P2 ở thời điểm 18 giờ sau khi dùng liều. Do đó, những kết quả này chỉ ra rằng tiêm trực tiếp kháng thể chủ vận TrkB, H4H9816P2, gây ra sự phosphoryl hóa các thụ thể TrkB vùng đầu hải mã ở chuột nhất TrkB^{hu/hu}.

Ví dụ 7. So sánh in vivo về tác dụng của H4H9816 và kháng thể đối chứng isotype REGN1945 đối với khối lượng cơ thể và sự trao đổi chất ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu}.

Để xác định tác dụng của kháng thể chủ vận TrkB của sáng chế, H4H9816P2, đối với khối lượng và thành phần cơ thể, một nghiên cứu trao đổi chất của đồng hợp tử chuột về sự biểu hiện của thụ thể TrkB người thay cho thụ thể TrkB chuột nhắt (chuột nhắt TrkB^{hu/hu}) đã được thực hiện sau khi tiêm kháng thể dưới da một lần duy nhất. Chuột nhắt TrkB^{hu/hu} (chuột đực, 20 tuần tuổi) đầu tiên được chuyển từ chuồng nhóm sang chuồng đơn trong hai tuần để thích nghi. Sau giai đoạn này, chuột được chuyển đến các lồng trao đổi chất (CLAM, Dụng cụ Columbus) để đánh giá sự thay đổi trong tiêu thụ thực phẩm và nước uống, vận động, tiêu thụ năng lượng và hô hấp sau khi sử dụng kháng thể. Bột chow thông thường được bảo quản trong buồng sàn trên cân có lò xo (Mettler Toledo, PL602E) để đo mức tiêu thụ thực ăn thông qua sự thay đổi tổng khối lượng của thức ăn. Nước có thể tiếp cận được thông qua vòi trên đỉnh lồng và lượng nước sử dụng được đo bằng cách theo dõi những thay đổi về thể tích đường bơm (Đơn vị chất lỏng Oxymax[®]/CLAM). Lồng trao đổi chất CLAM đo từng thông số này một cách liên tục, trong các khoảng thời gian 16-18 phút trong suốt thời gian nghiên cứu. Dữ liệu trao đổi chất được phân tích theo các phép đo đơn lẻ và được tóm tắt trong các khoảng thời gian 24 giờ có một chu kỳ tối và sáng hoàn chỉnh bằng cách sử dụng phần mềm OXYMAX[®]/CLAM (dụng cụ Columbus, v5.35). Sau khi thích nghi với chuồng trong hai tuần, chuột nhắt TrkB^{hu/hu} đã nhận được một liều dưới da 50mg/kg của hoặc là kháng thể chủ vận TrkB, H4H9816P2, hoặc là kháng thể đối chứng isotype IgG4 trong PBS ở độ pH 7,2. Một nhóm chuột nhắt TrkB^{hu/hu} đối chứng không được tiêm. Chuột được cân ngay trước khi dùng thuốc, và sau 24, 48, 72, 96 và 120 giờ sau khi dùng thuốc. Để xác định từng thành phần cơ thể của chuột nhắt, phép đo cộng hưởng từ hạt nhân, còn được gọi là cộng hưởng từ định lượng, được thực hiện bằng Máy phân tích EchoMRITM-500 (EchoMRI LLC). Trước khi dùng thuốc, chuột nhắt được đặt trong một hộp nhựa trong và đưa vào thiết bị NMR-MRI để xác định khối lượng nạc, chất béo và trạng

thái hydrat hóa cho từng con chuột nhất. Các phép đo được thực hiện trong quá trình 0,5-3,2 phút cho mỗi con chuột nhất và được thực hiện lại khoảng 120 giờ sau khi dùng thuốc.

Tóm tắt kết quả và kết luận:

Giám sát hàng ngày khối lượng cơ thể đã được thực hiện để xác định xem liệu tiêm liều đơn H4H9816P2 dưới da có gây giảm khối lượng ở chuột nhất TrkB^{hu/hu} hay không. Trước khi dùng thuốc, không có sự khác biệt đáng kể về khối lượng cơ thể trung bình của cả ba nhóm điều trị, vì mỗi nhóm có khối lượng cơ thể trước khi tiêm trung bình là 28,39 - 29,85g (Bảng 16). Tuy nhiên, 48 giờ sau khi dùng thuốc, chuột nhất TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 đã mất trung bình 1,70g, tương đương 5,96% khối lượng cơ thể của chúng trước khi dùng thuốc. Đồng thời, chuột nhất không trị liệu và chuột nhất TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotype đã tăng khoảng 1,79-2,37% khối lượng cơ thể của chúng trước khi dùng thuốc. Chuột nhất TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 tiếp tục giảm cân trong suốt quá trình nghiên cứu, và 72 và 96 giờ sau khi dùng thuốc, những con chuột nhất này đã giảm tương ứng trung bình 8,42% và 11,80% khối lượng cơ thể của chúng trước khi dùng thuốc. Thời điểm 120 giờ sau khi dùng thuốc, chuột nhất TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 đã giảm trung bình 12,67% khối lượng cơ thể so với trước khi dùng thuốc. Ngược lại, chuột nhất không dùng thuốc và chuột nhất TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng đối chứng isotype không biểu hiện sự giảm khối lượng cơ thể bất kỳ trong suốt quá trình nghiên cứu so với trước khi thực hiện dùng thuốc. Vì khối lượng cơ thể của chuột nhất TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 đã giảm đáng kể so với cả hai nhóm đối chứng gây thờ và isotype tại thời điểm 48, 72, 96 và 120 giờ sau khi dùng thuốc, người ta đã xác định rằng kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2 làm giảm đáng kể khối lượng cơ thể ở chuột nhất TrkB^{hu/hu}.

Bảng 16: Khối lượng cơ thể của chuột nhất TrkB^{hu/hu} sau khi sử dụng liều kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2

Nhóm thử nghiệm	Khối lượng cơ thể trung bình trước khi tiêm (g) ($\pm$ SD)	Khối lượng cơ thể trung bình (g) sau khi tiêm 24 giờ ($\pm$ SD)	Khối lượng cơ thể trung bình (g) sau khi tiêm 48 giờ ($\pm$ SD)	Khối lượng cơ thể trung bình (g) sau khi tiêm 72 giờ ($\pm$ SD)	Khối lượng cơ thể trung bình (g) sau khi tiêm 96 giờ ($\pm$ SD)	Khối lượng cơ thể trung bình (g) sau khi tiêm 120 giờ ($\pm$ SD)
	Tỉ lệ % thay đổi khối lượng so với trước khi tiêm (+/- SD)	Tỉ lệ % thay đổi khối lượng so với trước khi tiêm (+/- SD)	Tỉ lệ % thay đổi khối lượng so với trước khi tiêm (+/- SD)	Tỉ lệ % thay đổi khối lượng so với trước khi tiêm (+/- SD)	Tỉ lệ % thay đổi khối lượng so với trước khi tiêm (+/- SD)	Tỉ lệ % thay đổi khối lượng so với trước khi tiêm (+/- SD)
Nhóm đê nguyên (n=3)	28,85 (+/- 0,81)	29,69 (+/- 0,97)	29,36 (+/- 1,10)	29,32 (+/- 1,29)	29,29 (+/- 1,10)	28,88 (+/- 1,04)
	N/A	+2,91% (+/- 0,62)	+1,79% (+/- 1,62)	+1,65% (+/- 2,24)	+1,54% (+/- 1,22)	+0,10% (+/- 1,05)
Nhóm đối chứng isotype (n=4)	29,21 (+/- 2,68)	30,27 (+/- 2,51)	29,90 (+/- 2,63)	30,08 (+/- 2,69)	29,87 (+/- 2,52)	29,69 (+/- 2,68)

	N/A	+3,61% (+/- 1,68)	+2,37% (+/- 1,50)	+2,98% (+/- 1,09)	+2,25% (+/- 1,56)	+1,65% (+/- 0,81)
Nhóm dùng H4H9816P2 (n=4)	28,39 (+/- 1,35)	27,87 (+/- 1,29)	26,69 (+/- 0,87)	26,00* (+/- 0,98)	25,04** (+/- 1,03)	24,79** (+/- 1,36)
	N/A	-1,83% (+/- 0,56)	-5,96% (+/- 1,88)	-8,42% (+/- 1,85)	- 11,80% (+/- 1,52)	-12,67% (+/- 1,66)

Ghi chú: đặc trưng thống kê được xác định bởi ANOVA hai chiều với thử nghiệm post-hoc so sánh đa yếu tố của Tukey, được chỉ định (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, so sánh với nhóm đối chứng isotype: chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được tiêm với liều 50 mg/kg kháng thể đối chứng isotype.

Tác dụng của việc tiêm kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2 lên các bộ phận cơ thể cũng được xác định bằng cách thực hiện NMR-MRI trên từng đối tượng trước và sau khi dùng thuốc. Trước khi dùng thuốc, ba nhóm chuột nhắt TrkB^{hu/hu} để điều trị không biểu hiện bất kỳ sự khác biệt đáng kể nào về khối lượng chất béo hoặc khối lượng nạc, vì mỗi nhóm có trung bình 4,19 - 4,75g là khối lượng chất béo và 21,32 - 21,70g là khối lượng nạc (Bảng 17). Tuy nhiên, sau khi sử dụng kháng thể, chuột nhắt TrkB^{hu/hu} sử dụng H4H9816P2 đã mất trung bình 48,90% tổng khối lượng chất béo trong cơ thể trong suốt quá trình nghiên cứu (Bảng 17). Chuột nhắt TrkB^{hu/hu} không điều trị và được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotype giảm tương ứng trung bình 8,49% và 9,48% khối lượng chất béo trước khi dùng thuốc, ít hơn đáng kể so với các đối tượng được điều trị bằng H4H9816P2 (Bảng 17). Hơn nữa, chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng

H4H9816P2 đã mất trung bình 7,84% khối lượng nạc trong suốt nghiên cứu, lớn hơn đáng kể so với 2,41% và 1,75% của khối lượng nạc trung bình trước khi dùng thuốc của nhóm đề tự nhiên và điều trị kháng thể đối chứng isotype tương ứng (Bảng 17). Như vậy, việc giảm cân đã mô tả có thể được giải thích bằng việc giảm đáng kể khối lượng chất béo và giảm tương đối khối lượng nạc sau khi tiêm kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2 ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu}.

Bảng 17: Bộ phận cơ thể của chuột nhắt TrkB^{hu/hu} sau khi dùng kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2

Nhóm thí nghiệm	Khối lượng chất béo trung bình trước khi dùng thuốc (%) ($\pm$ SD)	Khối lượng chất béo trung bình sau 120 giờ dùng thuốc ($\pm$ SD)	Thay đổi khối lượng chất béo trung bình sau 120 giờ dùng thuốc ($\pm$ SD)	Khối lượng nạc trung bình trước khi dùng thuốc (%) ($\pm$ SD)	Khối lượng nạc trung bình sau 120 giờ dùng thuốc ($\pm$ SD)	Thay đổi khối lượng nạc trung bình sau 120 giờ dùng thuốc ($\pm$ SD)
Nhóm đề nguyên (n=3)	4,65 (+/- 0,32)	4,27 (+/- 0,55)	-8,49 (+/- 7,18)	21,45 (+/- 0,79)	20,94 (+/- 0,98)	-2,41 (+/- 1,81)
Nhóm đối chứng isotype (n=4)	4,75 (+/- 2,98)	4,40 (+/- 2,98)	-9,48 (+/- 6,00)	21,70 (+/- 0,50)	21,32 (+/- 0,35)	-1,75 (+/- 0,98)

Nhóm dùng H4H9816P2 (n=4)	4,19 (+/- 1,15)	2,14 (+/- 0,64)	- 48,90** ** (+/- 5,06)	21,32 (+/- 1,87)	19,64 (+/- 1,69)	-7,84*** (+/- 0,94)

Ghi chú: đặc trưng thống kê được xác định bởi Kruskal-Wallis ANOVA một chiều với thử nghiệm post-hoc so sánh đa yếu tố của Tukey, được chỉ định (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, so sánh với nhóm đối chứng isotype: chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được tiêm với liều 50 mg/kg kháng thể đối chứng isotype.

Ngoài việc đánh giá tác dụng của việc tiêm kháng thể kháng chủ vận TrkB H4H9816P2 đối với khối lượng và bộ phận cơ thể ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu}, việc cho ăn, uống và hoạt động vận động được xác định liên tục bằng lồng trao đổi chất. Trước khi dùng thuốc, chuột nhắt TrkB^{hu/hu} tiêu thụ trung bình 3,49-3,73g thức ăn mỗi ngày. Tuy nhiên, trong vòng 24 giờ sau khi dùng thuốc, chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 đã giảm đáng kể lượng thức ăn, xuống còn 2,20g thức ăn mỗi ngày. Mức tiêu thụ thức ăn trung bình ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 không vượt quá 2,49g thức ăn mỗi ngày trong suốt phần còn lại của nghiên cứu, trong khi những con chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng kháng thể thường được tiêu thụ trung bình 3,62-4,07g thức ăn mỗi ngày (Bảng 18).

Tương tự, không có sự khác biệt đáng kể trong tiêu thụ nước hàng ngày giữa các nhóm trước khi dùng thuốc. Chuột nhắt TrkB^{hu/hu} tiêu thụ trung bình 4,67-5,55 mL nước mỗi ngày trong mỗi nhóm (Bảng 19). Sau khi dùng thuốc, chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 đã giảm lượng nước uống xuống còn 2,05-3,24 mL nước mỗi ngày. Con số này thấp hơn đáng kể so với chuột nhắt TrkB^{hu/hu} không dùng thuốc và được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotype mà chúng tiêu thụ ở mức ổn định 4,50-5,77 mL nước mỗi ngày trong suốt

quá trình nghiên cứu (Bảng 19). Do đó, việc tiêm kháng thể chủ vận TrkB, H4H9816P2, dẫn tới kết quả làm giảm đáng kể cả về lượng thức ăn và nước uống ở chuột nhất TrkB^{hu/hu} so với cả hai nhóm không điều trị và đối chứng isotype.

Bảng 18: Mức tiêu thụ thức ăn của chuột nhất TrkB^{hu/hu} sau khi dùng kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2

Nhóm thí nghiệm	Tổng lượng thức ăn tiêu thụ trung bình (g) 0-24 giờ trước khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng thức ăn tiêu thụ trung bình (g) 0-24 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng thức ăn tiêu thụ trung bình (g) 24-48 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng thức ăn tiêu thụ trung bình (g) 48-72 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng thức ăn tiêu thụ trung bình (g) 72-96 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)
Nhóm để nguyên (n=3)	3,51 (+/- 0,53)	3,98 (+/- 0,08)	3,76 (+/- 0,19)	3,62 (+/- 0,35)	3,91 (+/- 0,18)
Nhóm đối chứng isotype (n=4)	3,73 (+/- 0,48)	4,07 (+/- 0,23)	3,99 (+/- 0,17)	3,89 (+/- 0,22)	3,80 (+/- 0,22)

Nhóm dùng H4H9816P2 (n=4)	3,49 (+/- 1,07)	2,20**** (+/- 0,16)	2,08**** (+/- 0,36)	2,18**** (+/- 0,37)	2,49**** (+/- 0,47)
---------------------------------	--------------------	------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Ghi chú: đặc trưng thống kê được xác định bởi Kruskal-Wallis ANOVA một chiều với thử nghiệm post-hoc so sánh đa biến của Tukey's chỉ ra rằng (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$, được so sánh với nhóm đối chứng isotype: chuột TrkB^{hu/hu} sử dụng liều 50 mg/kg chất kháng thể đối chứng isotype.

Bảng 19: Mức tiêu thụ nước của chuột nhắt TrkB^{hu/hu} sau khi sử dụng kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2

Nhóm thí nghiệm	Tổng lượng nước tiêu thụ trung bình (ml) 0-24 giờ trước khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng nước tiêu thụ trung bình (ml) 0-24 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng nước tiêu thụ trung bình (ml) 24-48 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng nước tiêu thụ trung bình (ml) 48-72 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	Tổng lượng nước tiêu thụ trung bình (ml) 72-96 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)
Nhóm đề nguyên (n=3)	4,79 ($\pm$ 0,21)	5,42 ($\pm$ 0,94)	4,96 ($\pm$ 0,91)	4,57 ($\pm$ 0,56)	4,88 ($\pm$ 0,32)
Nhóm đối chứng isotype (n=4)	5,55 ($\pm$ 1,23)	4,50 ($\pm$ 1,08)	5,08 ($\pm$ 1,39)	5,09 ($\pm$ 1,10)	5,77 ($\pm$ 1,62)
Nhóm dùng H4H9816P2 (n=4)	4,67 ($\pm$ 1,13)	2,25** ($\pm$ 0,55)	3,24* ($\pm$ 1,10)	2,05*** ($\pm$ 0,29)	2,25***** ($\pm$ 0,24)

Ghi chú: đặc trưng thống kê được xác định bởi Kruskal-Wallis ANOVA một chiều với thử nghiệm post-hoc so sánh đa biến của Tukey's chỉ ra rằng (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, được so sánh với nhóm đối chứng isotype: chuột nhắt TrkB^{hu/hu} sử dụng liều 50 mg/kg chất kháng thể đối chứng isotype.

Để xác định ảnh hưởng của điều trị kháng thể đến hoạt động, sự vận động đã được phân tích bằng phần mềm OXYMAX®/CLAM (dụng cụ Columbus, v5.35), mà đã đo liên tục tổng số di chuyển qua mặt phẳng x của mỗi con chuột nhắt. Một con chuột nhắt biểu hiện sự hiếu động trước khi dùng thuốc và được loại bỏ khỏi phân tích thống kê sau khi sử dụng thuốc. Trong khi các đối tượng không sử dụng và được xử lý kháng thể isotype ghi nhận duy trì ổn định trung bình 11.000 -15.000 di chuyển mỗi ngày trong suốt quá trình nghiên cứu, chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 đã ghi nhận 28.260 di chuyển trong khoảng thời gian 24-48 giờ sau khi tiêm thuốc, và ghi nhận 21.193 và 27.028 di chuyển trong khoảng thời gian tương ứng là 48-72 giờ và 72-96 giờ sau khi dùng thuốc (Bảng 20). Chuột nhắt TrkB^{hu/hu} được điều trị bằng H4H9816P2 đã ghi nhận nhiều hơn tổng số lần di chuyển tại mỗi thời điểm sau khi sử dụng kháng thể, cho thấy sự hiếu động là một tác dụng bổ sung của việc tiêm H4H9816P2. Kết hợp lại, những tác dụng trên cho thấy rằng việc tiêm liều duy nhất dưới da của kháng thể chủ vận TrkB, H4H9816P2, gây ra những thay đổi đáng kể về khối lượng cơ thể, bộ phận cơ thể, sự trao đổi chất và sự vận động ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu}.

Bảng 20: Sự vận động của chuột nhắt TrkB^{hu/hu} sau khi sử dụng kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2

Nhóm thí nghiệm	Tổng số vận động trung bình	Tổng số vận động trung bình	Tổng số vận động trung bình	Tổng số vận động trung bình	Tổng số vận động trung bình (đếm
-----------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	----------------------------------

	(đếm lần) 0-24 giờ trước khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	(đếm lần) 0-24 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	(đếm lần) 24-48 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	(đếm lần) 48-72 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)	lần) 72-96 giờ sau khi dùng thuốc ($\pm$ SD)
Nhóm để nguyên (n=3)	16562 (+/- 3380)	14692 (+/- 2792)	14387 (+/- 6126)	13279 (+/- 3607)	12525 (+/- 4121)
Nhóm đối chứng isotype (REGN1945) (n=4)	18105 (+/- 4085)	13380 (+/- 2730)	13049 (+/- 3376)	11371 (+/- 2552)	11468 (+/- 2088)
Nhóm sử dụng H4H9816P2 (n=4)	13292 (+/- 5294)	16575 (+/- 6836)	28260 (+/- 19874)	21193 (+/- 6668)	27028* (+/- 10969)

Ghi chú: đặc trưng thống kê được xác định bởi Kruskal-Wallis ANOVA một chiều với thử nghiệm post-hoc so sánh đa biến của Tukey's chỉ ra rằng (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, được so sánh với nhóm đối chứng isotype: chuột nhắt TrkB^{hu/hu} sử dụng liều 50 mg/kg chất kháng thể đối chứng isotype.

Ví dụ 8. Mô hình chuyển tiếp thần kinh thị giác để xác định hiệu quả của kháng thể kháng TrkB đối với khả năng sống sót của tế bào hạch võng mạc (RGC)

Tất cả các thủ tục được thực hiện theo Tuyên bố ARVO về sử dụng động vật trong nghiên cứu nhãn khoa và thị lực và Regeneron Pharmaceutical Inc.

IACUC. Chuột cống cái trưởng thành TrkB được làm cho giống người (Velocigene, Regeneron Pharmaceutical Inc.), 8-10 tuần tuổi, mỗi con nặng 200-250 g, đã được sử dụng. Tất cả các thủ tục phẫu thuật trên chuột cống được thực hiện dưới gây mê toàn thân bằng cách tiêm ketamin trong phúc mạc (63 mg/kg) và xylazin (6,0 mg/kg). Thuốc mỡ mắt có chứa erythromycin (0,5%, Bausch &boo) đã được áp dụng để bảo vệ giác mạc.

Cắt dây thần kinh thị giác nội hấp và tiêm nội nhãn

Dây thần kinh thị giác bên trái (ON) bị lộ ra nội hấp, màng bao của nó được mở ra. ON được chuyển khoảng 1,5 mm phía sau cầu mắt. Tiến hành cẩn thận để tránh làm hỏng việc cung cấp máu đến võng mạc. Tiêm nội nhãn được thực hiện ngay sau màng bồ đào trung gian với một pipet thủy tinh kéo được nối với ống tiêm Hamilton 50 μ l. Tiến hành cẩn thận để không làm hỏng thủy tinh thể. Chuột cống với biến chứng đáng kể bất kỳ sau phẫu thuật (ví dụ, thiếu máu cục bộ võng mạc, đục thủy tinh thể) được đưa ra khỏi những phân tích tiếp theo. Chuột cống được chia thành các nhóm chuột cống thí nghiệm khác nhau. Một nhóm đối chứng đã được tiêm nội nhãn với 3 μ l đối chứng isotype REGN1945 (46,6 μ g/ μ l); nhóm còn lại được tiêm 3 μ l kháng thể kháng TrkB người H4H9816P2 (45,7 μ g/ μ l) vào thời điểm 3 ngày và 10 ngày sau khi phẫu thuật cắt ON.

Trong một thí nghiệm khác, phản ứng liều lượng đối với kháng thể kháng TrkB người H4H9816P2 đã được thử nghiệm. Những con chuột cống đồng hợp tử 1-9 tháng tuổi TrkB được làm cho giống người được tiêm nội hấp 3 μ l kháng thể kháng TrkB người H4H9816P2 (0,01, 0,1, 1 hoặc 10 μ g/ μ l) hoặc đối chứng isotype REGN1945 (10 μ g/ μ l) tại thời điểm 3 ngày, 10 ngày sau khi cắt ON.

Nhuộm màu hóa học miễn dịch và đếm các RGC có thể sống sót

Brn3a (miền homeobox/POU đặc hiệu não của protein 3A) được sử dụng làm chất đánh dấu cho các tế bào hạch võng mạc (RGCs) còn sống sót, bởi vì nó đã được chứng minh là một phương pháp hiệu quả và đáng tin cậy để dán nhãn chọn lọc các RGC sống sót trong toàn bộ võng mạc, sau khi ON bị thương tổn (Nadal - Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M., Invest

Ophthalmol Vis Sci. 2009 Tháng 8; 50 (8):3860-8). Để kích thích miễn dịch cho Brn3a, võng mạc đã bị chặn trong huyết thanh lừa bình thường 10% và Triton X-100 0,5% trong 1 giờ, sau đó được ủ trong cùng môi trường với kháng thể Brn3a (1:400; Cat #: sc-31984, Santa Cruz) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, võng mạc được ủ với kháng thể thứ hai kháng dê của lừa được liên hợp với Alexa594 (1:400; Cat#: A-11058, Invitro gen) qua đêm ở nhiệt độ 4°C.

Tóm tắt kết quả và kết luận

Để đánh giá hiệu quả của kháng thể chủ vận TrkB đối với khả năng sống sót của RGC in vivo, các tác giả sáng chế đã sử dụng mô hình chuyển đổi thần kinh thị giác hoàn chỉnh. Kháng thể chủ vận TrkB (H4H9816P2) hoặc kháng thể isotype (đối chứng âm) được sử dụng vào thời điểm 3 ngày và 10 ngày sau phẫu thuật. Những con chuột cống bị chết sau phẫu thuật 14 ngày. Mật độ RGC ở mắt đối diện không bị tổn thương là tương tự nhau đối với ba kiểu gen TrkB, giá trị trung bình khoảng 1.600 trên mỗi mm² như thể hiện trong Bảng 21. Mật độ của RGC còn sống được đánh giá trong toàn bộ võng mạc, sử dụng nhuộm màu Brn3a. Đã quan sát thấy rằng ở đồng hợp tử chuột cống TrkB được làm cho giống người, kháng thể chủ vận TrkB (H4H9816P2) làm tăng đáng kể khả năng sống sót của RGC ($p < 0,01$, xét nghiệm Mann-Whitney) so với nhóm đối chứng (685 ± 106 so với 255 ± 66 RGC trên mỗi mm²). Ở dị hợp tử chuột cống TrkB được làm cho giống người, cũng có tác dụng làm sống sót đáng kể ($p < 0,05$, Mann-Whitney) của kháng thể chủ vận TrkB (444 ± 90 so với 208 ± 50 RGC trên mỗi mm²). Ở chuột cống TrkB loại hoang dã, số lượng RGC trong kháng thể chủ vận TrkB tăng nhẹ nhưng không đáng kể so với nhóm đối chứng isotype (Bảng 22). Trong thí nghiệm phản ứng với liều lượng, mật độ RGC đã được định lượng trong toàn bộ võng mạc bằng cách sử dụng nhuộm màu Brn3a tại thời điểm 14 ngày sau phẫu thuật cắt. Ở đây có đáp ứng liều lượng rõ ràng của kháng thể chủ vận TrkB. Khi so sánh với nhóm đối chứng kháng thể (168 ± 43 RGC trên mỗi mm²), kháng thể chủ vận TrkB (H4H9816P2) tăng đáng kể ($p < 0,01$, xét nghiệm ANOVA một chiều với Tukey post) khả năng sống sót của RGC trong 3 μ g (564 ± 124 RGC trên mỗi mm²)

hoặc 30 ug (543 +/- 242 RGC trên mỗi mm²) cho mỗi nhóm được tiêm. Không có sự khác biệt giữa các nhóm 3ug và 30ug. Trong các nhóm nhận được 0,03 ug (202 +/- 96 RGCs trên mỗi mm²) hoặc 0,3 ug (337 +/- 210 RGCs trên mỗi mm²) cho mỗi nhóm được tiêm, chỉ có xu hướng nhưng không làm tăng đáng kể khả năng sống sót của RGC (Bảng 23). Kết luận lại, kháng thể chủ vận TrkB H4H9816P2 thể hiện khả năng sống sót của RGC tăng lên đáng kể ở chuột cống TrkB^{hu/hu} và TrkB^{hu/+}.

Kết luận:

Liều lượng kháng thể chủ vận TrkB (H4H9816P2) làm tăng đáng kể khả năng sống sót của RGC ở chuột cống TrkB được làm cho giống người.

Bảng 21. Định lượng RGC (RGC/mm²) ở mắt đối chứng không bị thương tổn

Kiểu gen TRKB

hu/hu	hu/+	+/+
1637,3	1720,4	1636,3
1551,5	2064,6	1670,2
1651,4	1738,8	1873,4
1628,2	2029,8	1725,4
1804,7	1929,6	1973,4
1741,3	1645,9	
1739,7	1761,5	
1698,8	1787,5	
1862,5	1914,0	
1779,4		

Bảng 22. Định lượng RGC (RGC/mm²) sau tổn thương thần kinh thị giác

	H4H9816P2					Kháng thể đối chứng isotype				
	A:Y1	A:Y2	A:Y3	A:Y4	A:Y5	B:Y1	B:Y2	B:Y3	B:Y4	B:Y5
Hu/Hu	790,1	737,1	756,3	587,8	555,7	322,8	295,0	286,9	171,3	197,9
Hu/+	530,4	457,5	522,9	390,6	319,2	231,0	184,6	265,1	151,3	
+/+	320,9	355,5	256,9	342,7		112,3				

Bảng 23. Định lượng RGC (RGC/mm²) trong nghiên cứu đáp ứng liều lượng

Kháng thể đối chứng	H4H9816P2
---------------------	-----------

30 ug/ ivt	0,03 ug/ ivt	0,3 ug/ ivt	3 ug/ ivt	30 ug/ ivt
222,3	162,7	341,7	637,9	493,0
205,9	190,2	269,1	686,4	613,5
131,7	127,7	292,2	533,2	557,6
136,3	1740	252,8	574,7	227,1
144,3	163,8	128,3	334,4	954,3
	392,6	740,9	620,6	411,3

Ví dụ 9. Tác dụng của kháng thể kháng TrkB đối với các con đường dẫn truyền tín hiệu Akt và Erk

Tất cả các thủ tục được thực hiện theo Tuyên bố ARVO về sử dụng động vật trong nghiên cứu nhân khoa và thị lực và Regeneron Pharmaceutical Inc. IACUC. Các tế bào thần kinh vỏ não nguyên phát đã được phân lập và nuôi cấy từ TrkB chuột nhắt được làm cho giống người (MAID 7139) (Nat Protoc. 2012 tháng 9; 7 (9): 1741-54. Doi: 10.1038/nprot.2012.099). Western blot (WB) đã được thực hiện để xác định ảnh hưởng của chất chủ vận TrkB Ab lên các con đường dẫn truyền tín hiệu xuôi chiều của Akt và Erk (p-Akt, p-Erk1/2). Tế bào thần kinh vỏ não nguyên phát từ TrkB chuột nhắt con sau khi sinh 1 ngày (P1) được làm cho giống người đã được nuôi cấy trong 4 ngày (DIV- 4) trong môi trường NeuralQ Basal (Global Stem, cat. # GSM-9420) được bổ sung bằng chất bổ sung thần kinh GS21 (Global Stem, cat. # GSM-3100), Glutamax (Invitro gen, cat. # 35050-061) và Penicilin/Streptomycin. Các tế bào đã được điều trị bằng các kháng thể chủ vận TrkB: H4H9816P-L1 (10ug/ml), H4H9780P-L1 (10ug/ml), H4H9814P-L1 (10ug/ml), đối chứng isotype IgG4 REGN1945 (10 ug/ml), kháng thể đối chứng H1M8037C-L1 (10 ug/ml), BDNF (1ug/ml) trong 15 phút hoặc 2 giờ. Western blot đã được thực hiện để xác định xem các chất chủ vận có sự khác biệt trong duy trì và cường độ dẫn truyền tín hiệu xuôi chiều hay không. Các tế bào đã xử lý được rửa sạch và cạo trong PBS lạnh chứa chất ức chế proteaza và phosphatase 1% (Sigma). Nồng độ protein được xác định bằng xét nghiệm protein Bradford (Pierce). Các mẫu (50 µg) được phân tách bằng SDS-PAGE trong gel

khử Tris-Acetate 3-8% (Novex) và được chuyển vào màng nitrocellulose (Bio-Rad).

Màng được ủ 1 giờ trong dung dịch chặn chứa sữa 5% và Tween-20 0,1% ở độ pH 7,6. Tiếp theo là ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trong dung dịch đệm chặn chứa BSA 5%, Tween-20 0,1% và kháng Trk phospho (Tín hiệu tế bào, cat. # 9141, 1:500), kháng Akt phospho (Tín hiệu tế bào, cat. # 9271, 1:1000) hoặc kháng thể ERK1/2 kháng phospho (Sigma, cat. # E7028, 1:5000). Sau đó, các protein đã dans nhận được hiển thị bằng cách ủ với horseradish peroxidase (HRP) kết hợp với IgG kháng dê, chuột nhắt hoặc thỏ, sau đó là phát triển với chất nền quang hóa cho HRP (Pierce). Để xác định tổng lượng TrkB, MAPK hoặc Akt có trong mỗi làn, màng nitrocellulose đã được tước bỏ các kháng thể trong bộ đệm tước (Pierce) trong 20 phút và ủ với kháng TrkB thỏ (Tín hiệu tế bào, cat. # 4603, 1:1000), kháng Erk1/2 thỏ (Tín hiệu tế bào, cat. # 06-182, 1:1000) hoặc kháng thể kháng Akt thỏ (Tín hiệu tế bào, cat. # 9272, 1:1000) và sau đó được hiển thị như mô tả ở trên. Beta-Actin (Sigma, cat. # A5316, 1:20000 và GAPDH (Sigma, cat. # G9295) đã được thăm dò dưới dạng đối chứng tải mẫu.

Tóm tắt kết quả và kết luận

Như được thể hiện trong Hình 2, tại thời điểm 15 phút sau khi ủ, trong khi tất cả các kháng thể chủ vận TrkB thể hiện sự hoạt hóa của con đường dẫn truyền tín hiệu MAPK/ERK và PI3K/Akt, thì chỉ BDNF và H4H9814P thể hiện sự phosphoryl hóa TrkB. Tại thời điểm 2 giờ sau khi ủ, tất cả các kháng thể chủ vận TrkB thể hiện sự hoạt hóa TrkB.

Ví dụ 10. Ảnh hưởng của các kháng thể chủ vận kháng TrkB đối với khả năng sống sót của tế bào SH-SY5Y

Dòng tế bào thần kinh SH-SY5Y người trong nuôi cấy in vivo:

Các tế bào dòng tế bào u nguyên bào thần kinh SH-SY5Y (Sigma ATCC # 94030304, cat. #11C016) 10082-147) được đặt trong môi trường sinh trưởng có chứa DMEM:F12 (Invitro gen cat#11330), Pen/Strep (Invitro gen cat.#15140), FBS 10% (Invitro gen cat# 10082-147) ở nhiệt độ 37°C trong CO₂ 5%. Ở giai đoạn 23-27 các tế bào được gieo vào 96 đĩa giếng trong môi trường biệt hóa có

chứa axit Retinoic đều ở dạng trans 10uM (Alfa Aesar cat. # 44540), DMEM:F12 (Invitro gen cat.# 11330), Pen/Strep (Invitro gen cat.# 15140), FBS 10% (Invitro gen cat.# 10082-147). Các tế bào (30K/giếng) được biệt hoá trong 4 ngày. Các kháng thể được sàng lọc trong xét nghiệm sinh học khả năng sống sót, trong đó môi trường nuôi cấy được đổi thành môi trường biệt hoá không có huyết thanh (100ul/giếng) có chứa các liều lượng kháng thể khác nhau (100-0,01ug/ml). Sau 2 ngày, thuốc thử CCK8 (Dojindo, cat. #CK04) đã được thêm vào (10ul/giếng), các đĩa được ủ trong 3-4 giờ, OD được đo ở 450nm (Victor hoặc FlexStation III) để xác định tỷ lệ phần trăm tế bào sống sót. Dữ liệu được chuẩn hóa thành môi trường không có huyết thanh mà không cần điều trị. Điều trị không dùng huyết thanh không có kháng thể = tỷ lệ sống sót 100%.

Tóm tắt kết quả và kết luận:

Như thể hiện trong Hình 3 và Bảng 23, tất cả các kháng thể chủ vận TrkB của sáng chế đều thể hiện sự gia tăng đáng kể phụ thuộc vào liều lượng đối với khả năng sống sót của các tế bào SH-SY5Y khi so sánh với kháng thể đối chứng isotype âm ($p < 0,0001$ bằng ANOVA hai chiều).

Bảng 24

Khả năng sống sót trung bình %				
Liều dùng (ug/ml)	H4H9816P-L1	H4H9780P- L1	H4H9814P- L1	REGN1945- L14 (Đối chứng isotype âm)
100	116,7	119,7	114,5	97,1
10	122,3	125,3	116,6	97,7
1	120,2	121,7	116,0	92,5
0,1	113,9	116,4	116,3	92,9
0,01	98,0	103,0	97,0	93,6

Ví dụ 11. Đánh giá dược động học của kháng thể kháng TrkB ở chuột nhắt TrkB và WT được làm cho giống người

Đánh giá dược động học của kháng thể kháng TrkB, H4H9816P2 được tiến hành trên chuột TrkB được làm cho giống người (chuột nhất đồng hợp tử cho biểu hiện TrkB người, TrkBhu/hu) và loại chuột nhất loại hoang dã (WT). Các đoàn hệ chứa 5 con chuột cho mỗi chủng chuột. Tất cả những con chuột nhất nhận được một liều đơn 10 mg/kg dưới da (SC). Các mẫu máu được thu thập tại thời điểm 6 giờ và 1, 2, 3, 6, 9, 16, 21 ngày và 30 ngày sau khi dùng thuốc. Máu được xử lý thành huyết thanh và làm đông lạnh ở nhiệt độ -80°C cho đến khi được phân tích.

Nồng độ kháng thể luân chuyển được xác định bằng phân tích tổng kháng thể IgG4/hIgG1 người bằng cách sử dụng GyroLab xPlore™ (Gyros, Uppsala, Thụy Điển). Một cách ngắn gọn, kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng IgG4/IgG1 người của chuột nhất được biotinyl hóa (REGN2567) được pha loãng đến 100 $\mu\text{g/mL}$ trong dung dịch đệm pha loãng kháng thể (0,05% Tween-20 + PBS) đã được bắt lại trên Gyrolab Bioaffy 200 CD có cột ái lực đã được tải sẵn với các hạt được phủ streptavidin (Dynospheres™). Tiêu chuẩn được sử dụng để hiệu chuẩn trong xét nghiệm này là H4H9816P ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,488 đến 2000 ng/mL trong dung dịch đệm pha loãng (BSA + PBS 0,5%) chứa huyết thanh chuột bình thường 0,1% (NMS). Mẫu huyết thanh được pha loãng 1:100 trong dung dịch đệm pha loãng kháng thể. IgG người được bắt lại trên các cột có ái lực phủ kháng REGN2567 trên CD, thực hiện ở nhiệt độ trong phòng, đã được phát hiện bằng cách thêm 0,5 $\mu\text{g/mL}$ kháng thể đơn dòng kappa kháng người của chuột (REGN654) được liên hợp với Alexa-647 được pha loãng trong dung dịch đệm phát hiện (đệm Rxxip F); và tín hiệu huỳnh quang thu được được ghi lại trong các đơn vị phản hồi (RU) bằng thiết bị GyroLab xPlore. Nồng độ mẫu được xác định bằng phép nội suy từ một đường cong chuẩn mà nó phù hợp bằng cách sử dụng đường cong logistic 5 tham số bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá Gyrolab Evaluator. Nồng độ trung bình từ 2 thí nghiệm sao chép đã được sử dụng để phân tích PK tiếp theo.

Các thông số PK được xác định bằng phân tích không ngăn (NCA), bằng cách sử dụng phần mềm Phoenix®WinNonlin® Phiên bản 6.3 (Certara, L.P., Princeton, NJ) và mô hình liều dùng ngoại mạch. Bằng cách sử dụng các giá trị

nồng độ trung bình tương ứng cho mỗi kháng thể, tất cả các thông số PK bao gồm nồng độ tối đa quan sát được trong huyết thanh (C_{max}), thời gian bán thải ước tính quan sát được ($t_{1/2}$) và diện tích dưới đường cong nồng độ so với nồng độ cuối cùng có thể đo được (AUC_{last}), được xác định bằng cách sử dụng quy tắc hình thang tuyến tính với phép nội suy tuyến tính và trọng số đồng nhất.

Tóm tắt kết quả và kết luận:

Sau sử dụng 10 mg/kg dưới da của kháng thể kháng TrkB H4H9816P2, nồng độ tối đa tương tự (C_{max}) của kháng thể được quan sát thấy vào ngày thứ 1 hoặc thứ 2 ở cả chuột nhắt TrkB^{hu/hu} và WT (lần lượt là 135 và 131 $\mu\text{g/ml}$, xem Bảng 26). Vào ngày thứ 9, H4H9816P2 cho thấy khả năng loại bỏ thuốc mạnh hơn ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu} so với chuột nhắt WT, cho thấy hiệu quả qua trung gian mục tiêu. Ngày thứ 30, nồng độ kháng thể ít hơn khoảng 35 lần ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu}. Mức phơi nhiễm kháng thể (AUC_{last}) đối với H4H9816P2 ở chuột nhắt WT cao hơn $\sim 1,7$ lần so với chuột nhắt TrkB^{hu/hu} (tương ứng là 1730 và 1020 $\text{d} \cdot \mu\text{g/ml}$). Chuột nhắt WT cũng cho thấy thời gian bán thải ($T_{1/2}$) tăng gấp 3 lần so với chuột nhắt TrkB^{hu/hu} (tương ứng là 8,4 ngày và 2,9 ngày).

Tóm tắt dữ liệu về tổng nồng độ kháng thể kháng TrkB được trình bày trong Bảng 25, các thông số PK trung bình được mô tả trong Bảng 26 và giá trị tổng nồng độ kháng thể trung bình theo thời gian được thể hiện trong Hình 4.

Bảng 25: Nồng độ trung bình ($\pm\text{SD}$) của tổng IgG trong huyết thanh sau khi tiêm liều đơn dưới da 10 mg/kg H4H9816P2 ở chuột nhắt TrkB^{hu/hu} và chuột nhắt loại hoang dã theo thời gian

Kháng thể	Thời gian (ngày)	Tổng nồng độ mAb trong huyết thanh chuột	
		10 mg/kg	
		Giá trị trung bình ($\mu\text{g/ml}$)	+/- SD

Chuột TrkB ^{hu/hu}	0,25	72,42	4,06
	1	132,0	18,0
	2	124,9	15,9
	3	113,4	11,8
	6	78,72	9,98
	9	37,74	14,0
	16	5,592	4,97
	21	2,060	2,11
	30	0,447	0,506
Chuột loại hoang dã	0,25	56,73	14,5
	1	120,8	6,26
	2	131,2	7,54
	3	125,7	7,46
	6	101,9	11,4
	9	75,94	7,06
	16	42,61	16,1
	21	27,75	16,9
	30	15,52	13,0

Chữ viết tắt: thời gian = thời gian tính theo ngày sau khi tiêm liều đơn; d = số thứ tự ngày trong nghiên cứu; SD = độ lệch chuẩn.

Bảng 26: Tóm tắt các thông số dược động học

Thông số	Đơn vị	H4H9816P2	
		Chuột nhắt TrkB ^{hu/hu}	Chuột nhắt loại hoang dã
C _{max}	µg/mL	135 ± 15	131 ± 7,5
T _{max}	d	1,4 ± 0,56	2,0 ± 0
T _{1/2}	d	2,94 ± 1,1	8,36 ± 3,9
AUC _{last}	d•µg/m L	1020 ± 150	1730 ± 310

Các thông số PK được dẫn xuất từ nồng độ trung bình so với biên dạng thời gian. $T_{1/2}$ và AUC_{last} dựa trên nồng độ cho đến ngày thứ 30.

Chữ viết tắt: C_{max} = Nồng độ cao nhất; AUC = Vùng dưới đường cong nồng độ - thời gian; AUC_{last} = AUC được tính từ thời điểm 0 đến thời điểm có nồng độ dương cuối cùng; $T_{1/2}$ = thời gian bán thải cuối cùng; T_{max} = thời gian sau khi dùng kháng thể mà đạt được nồng độ tối đa trong huyết thanh.

Ví dụ 12: Khả năng của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB chuột nhắt để chặn sự tương tác giữa TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống với phối tử BDNF của nó (yếu tố thần kinh có nguồn gốc từ não).

Các kháng thể đơn dòng kháng TrkB chuột nhắt (mAbs) được tạo ra bằng cách tiêm chủng cho chuột TrkB được làm cho giống người với protein TrkB chuột. Ba mAb hàng đầu được nhận diện từ sự tiêm chủng này là; M2aM14173N, M2aM14178N và M2aM14179N. Các mAb hàng đầu của sáng chế được đặc trưng cho khả năng của chúng để ngăn chặn sự tương tác của TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống với BDNF gắn kết đĩa trong ELISA chặn.

Các thí nghiệm được thực hiện bằng quy trình sau. BDNF người được phủ ở nồng độ 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (để chặn tương tác TrkB.hFc chuột nhắt) hoặc 0,3 $\mu\text{g/ml}$ (để chặn tương tác TrkB.mmh chuột cống) trong PBS trên đĩa microtiter 96 giếng và được ủ qua đêm ở 4°C. Các vị trí liên kết không đặc hiệu sau đó đã bị chặn bằng cách sử dụng dung dịch 5% (khối lượng/thể tích) của BSA trong PBS (dung dịch đệm thử nghiệm). Trong một đĩa pha loãng 96 giếng, 850 pM TrkB.hFc chuột nhắt hoặc TrkB.mmh chuột cống được trộn lẫn với các kháng thể kháng TrkB chuột nhắt đã được pha loãng ba lần liên tục và kháng thể đối chứng. Nồng độ kháng thể cuối cùng nằm trong khoảng từ 1,69 pM đến 100 nM. Hỗn hợp protein-kháng thể được ủ ở nhiệt độ phòng (RT) trong 1 giờ. Hỗn hợp trước liên kết sau đó được chuyển thành các bản sao vào các đĩa microtiter được phủ BDNF. Một đối chứng chỉ chứa dung dịch đệm xét nghiệm đã được đưa vào để tính đường cơ sở cho xét nghiệm. Các đĩa ELISA được ủ ở RT trong 1 giờ và sau đó được rửa bằng dung dịch rửa đĩa. TrkB.hFc chuột nhắt gắn kết đĩa đã được phát hiện với

đoạn kháng thể đặc hiệu kháng Fc γ người của dê được liên hợp với HPR (ngiên cứu miễn dịch Jackson) và TrkB.mmh chuột cống được phát hiện với kháng thể kháng histidin (Qiagen) được liên hợp với HPR. Các đĩa được ủ với kháng thể phát hiện trong 1 giờ ở RT và sau đó được rửa bằng dung dịch rửa đĩa. Các đĩa xét nghiệm được phát triển với chất nền so màu TMB theo quy trình khuyến nghị của nhà sản xuất.

Độ hấp thụ ở bước sóng 450nm cho mỗi giếng được ghi lại và dựng đồ thị như là một hàm số của nồng độ kháng thể. Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism bằng cách sử dụng phương trình logistic bốn tham số trên đường cong đáp ứng liều có 11 điểm và các giá trị IC₅₀ đã được tính toán. Giá trị IC₅₀ tính được, được định nghĩa là nồng độ cần thiết của kháng thể để làm giảm 50% liên kết của TrkB với BDNF, được dùng làm chỉ số về hiệu lực ngăn chặn. Tỷ lệ phần trăm sự phong tỏa ở nồng độ tối đa của kháng thể được thử nghiệm được tính toán như là một chỉ số về khả năng của các kháng thể để chặn sự gắn kết của TrkB với BDNF trên đĩa so với đường cơ sở của xét nghiệm. Tín hiệu liên kết của TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống có nồng độ 850 pM khi không có mặt kháng thể được định nghĩa là liên kết 100% hoặc ngăn chặn 0%. Tín hiệu đường cơ sở của riêng dung dịch đệm xét nghiệm được định nghĩa là liên kết 0% hoặc ngăn chặn 100%.

Tóm tắt kết quả và kết luận

Khả năng kháng thể kháng TrkB chuột nhắt để ngăn chặn TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống liên kết với BDNF đã được đánh giá bằng cách sử dụng ELISAs chặn.

Các kết quả chặn được tóm tắt trong Bảng 27 và hình 5A và 5B. Mức độ ngăn chặn % được báo cáo cho tất cả các kháng thể và được tính toán ở nồng độ kháng thể cao nhất (100 nM) đã được thử nghiệm. Giá trị IC₅₀ chỉ được thể hiện đối với các kháng thể ngăn chặn trên 50% TrkB chuột nhắt hoặc chuột cống liên kết với BDNF. Trong số ba kháng thể của sáng chế, mAb kháng TrkB chuột nhắt, M2aM14178N đã ngăn chặn > 50% cả protein TrkB chuột nhắt và chuột cống liên

kết với BDNF. M2aM14178N đã ngăn chặn sự liên kết của TrkB.hFc chuột nhất 850 pM với IC_{50} là 426 pM và tỉ lệ phần trăm ngăn chặn là 84,4%. M2aM14178N đã ngăn chặn TrkB.mmh chuột 850 pM liên kết với BDNF với giá trị IC_{50} là 184 pM và tỉ lệ phần trăm ngăn chặn là 89,5%. M2aM14173N thể hiện tỉ lệ ngăn chặn là 29,7% đối với liên kết giữa TrkB.hFc chuột nhất 850 pM với BDNF. M2aM14173N thể hiện tỉ lệ ngăn chặn là 80,7% đối với liên kết giữa TrkB.mmh chuột 850 pM với BDNF, với giá trị IC_{50} là 3,81 nM. M2aM14179N thể hiện tỉ lệ ngăn chặn là 11,6% đối với liên kết giữa TrkB.hFc chuột nhất với BDNF. M2aM14179N thể hiện sự có sự gia tăng trong liên kết giữa TrkB.mmh chuột công với BDNF ở nồng độ lớn hơn 1 nM.

Bộ so sánh kháng thể đơn dòng kháng TrkB chuột nhất, H1M8037C, đã ngăn chặn TrkB.hFc chuột nhất 850 pM liên kết với BDNF với giá trị IC_{50} là 180 pM và tỉ lệ phần trăm ngăn chặn là 91,5%. H1M8037C đã ngăn chặn liên kết TrkB.mmh chuột công 850 pM với giá trị IC_{50} là 1,42 nM và tỉ lệ phần trăm ngăn chặn là 83,3%. Kháng thể đơn dòng đối chứng isotype mIgG2a, REGN1097, không thể hiện sự ngăn chặn bất kỳ đối với TrkB chuột nhất hoặc chuột công, trong các điều kiện xét nghiệm giống hệt nhau. Ở nồng độ lớn hơn 10nM, REGN1027 thể hiện sự gia tăng liên kết TrkB chuột nhất.

Bảng 27: Tóm tắt giá trị IC_{50} (M) cho sự ngăn chặn kháng TrkB chuột nhất của TrkB chuột nhất hoặc chuột công liên kết với BDNF

	Kháng thể ngăn chặn liên kết giữa TrkB.hFc chuột nhất 780 pM với đĩa được phủ BDNF		Kháng thể ngăn chặn liên kết giữa TrkB.mmh chuột nhất 780 pM với đĩa được phủ BDNF	
PID kháng thể	IC ₅₀ [M]	Tỉ lệ phần trăm chặn với kháng thể 100nM	IC ₅₀ [M]	Tỉ lệ phần trăm chặn với kháng thể 100nM
M2aM14173N	Không tính toán	29,7	3,81E-09	80,7
M2aM14178N	4,26E-10	84,4	1,84E-10	89, 5
M2aM14179N	Không tính toán	11,6	Không tính toán	-38,1
H1M8037C (Bộ so sánh)	1,80E-10	91,5	1,42E-09	83,3
Đối chứng isotype âm (REGN1097)	Không tính toán	Không ngăn chặn	Không tính toán	-9,33

Ngăn chặn 100% = OD450nm giá trị của các giếng với kháng thể thứ hai được liên hợp với HRP chỉ trong dung dịch đệm xét nghiệm (không có protein TrkB chuột nhất hoạt chuột cống).

Ngăn chặn 0% = OD450nm giá trị của các giếng với kháng thể thứ hai được liên hợp với HRP trong dung dịch đệm xét nghiệm với sự có mặt của protein TrkB chuột nhất hoặc chuột cống (không có kháng thể TrkB).

Tỉ lệ phần trăm ngăn chặn tối đa âm chỉ ra sự gia tăng của liên kết TrkB được phát hiện với sự có mặt của kháng thể.

Không tính toán = giá trị IC₅₀ không định lượng đối với các kháng thể ngăn chặn <50% ở nồng độ thử nghiệm cao nhất.

Ví dụ 13. Khả năng của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB người để ngăn chặn sự tương tác giữa TrkB người và các phối tử tự nhiên BDNF và NT4 người của nó.

Khả năng của các kháng thể kháng TrkB người, được chỉ định là H4H9814P, H4H9816P2 và H4H9780P, để ngăn chặn protein TrkB liên kết với điax đã bắt BDNF hoặc NT-4 được đo bằng cách sử dụng hai ELISA bắt cặp cạnh tranh. Trong các xét nghiệm, các nồng độ khác nhau của kháng thể kháng TrkB được trộn trước với lượng nhất định protein TrkB đối xứng hai bên và sự giảm liên kết TrkB với BDNF được cố định trên điax hoặc NT-4, do sự có mặt của kháng thể là đã được tính toán.

Protein TrkB đối xứng hai bên tái tổ hợp được sử dụng trong các thí nghiệm bao gồm một phần của miền ngoại bào TrkB người (aa Cys32-His430) được biểu hiện với phần Fc của IgG1 người ở đầu C (hTrkB-hFc; Truy cập # NP_006171.2, khối lượng phân tử 69.700 dalton). Các protein BDNF và NT-4 có trong miền ngoại bào BDNF người (aa His129-Arg247, Truy cập # P23560, Hệ thống nghiên cứu và phát triển) hoặc NT-4 (aa Gly81-Ala210, Truy cập # P34130, Hệ thống nghiên cứu và phát triển). Hai đối chứng kháng thể isotype, một kháng thể IgG4 người kháng Feld1, và một kháng thể đặc hiệu với kháng thể a-Feld1 với IgG1 chuột, được đưa vào làm các đối chứng để phát hiện nền IgG.

Các thí nghiệm được thực hiện bằng quy trình sau. BDNF hoặc NT-4 người được phủ riêng ở nồng độ tương ứng là 0,5 $\mu\text{g/ml}$ hoặc 2 $\mu\text{g/ml}$, trong PBS trên đĩa microtiter 96 giếng qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, các vị trí liên kết không đặc hiệu được ngăn chặn bằng cách sử dụng dung dịch BSA trong PBS. Dung dịch chặn và dung dịch đệm pha loãng có chứa dung dịch 5% (khối lượng/thể tích) của BSA trong PBS để xét nghiệm với lớp phủ BDNF, hoặc dung dịch 0,5% (khối lượng/thể tích) của BSA trong PBS để xét nghiệm với lớp phủ NT-4. Trên các đĩa microtiter riêng biệt, lượng cố định 500pM protein hTrkB-hFc được thêm vào các sự pha loãng một cách liên tục các kháng thể để tới nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1,7pM đến 100nM, và các dung dịch không có mặt kháng thể. (Nồng độ cố định của hTrkB-hFc đối với các xét nghiệm ức chế kháng thể

được chọn từ khoảng điểm giữa nằm trong phần tuyến tính của các đường cong liên kết riêng biệt của hTrkB-hFc với đĩa được phủ hBDNF hoặc hNT-4). Sau một giờ ủ ở nhiệt độ phòng, các phức hợp protein kháng thể với nồng độ không đổi 500pM của protein hTrkB-hFc đã được chuyển sang các đĩa microtiter đã được phủ bằng hBDNF hoặc hNT-4. Sau một giờ ủ ở nhiệt độ phòng, các giếng được rửa sạch và hTrkB-hFc gắn kết đĩa được phát hiện với các kháng thể đa dòng dê đặc hiệu đoạn kháng Fcγ người được liên hợp với peroxidaza cải ngựa (JacksonImmunoResearch). Sau đó, đĩa được phát triển bằng cách sử dụng dung dịch chất nền TMB (BD Bioscience) theo khuyến nghị của nhà sản xuất và độ hấp thụ ở bước sóng 450nm được đo trên đầu đọc đĩa Victor (PerkinElmer™).

Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng mô hình đáp ứng liều sigma trong phần mềm Prism™ (GraphPad). Giá trị IC₅₀ đã tính toán, được định nghĩa là nồng độ cần thiết của kháng thể để làm giảm 50% liên kết của hTrkB-hFc với hBDNF hoặc hNT-4, được sử dụng làm chỉ số về hiệu lực ngăn chặn. Tỷ lệ phần trăm ngăn chặn ở nồng độ tối đa của kháng thể thử nghiệm đã được tính toán như một chỉ số về khả năng của các kháng thể để ngăn chặn sự gắn kết của hTrkB-hFc 500pM với hBDNF hoặc hNT-4 trên đĩa, so với đường cơ sở của xét nghiệm. Trong tính toán, tín hiệu liên kết của mẫu hTrkB-hFc 500pM mà không có mặt kháng thể được tham chiếu là liên kết 100% hoặc ngăn chặn 0%; và tín hiệu đường cơ sở của mẫu của dung dịch đệm không có hTrkB-hFc hoặc kháng thể được tham chiếu là liên kết 0% hoặc ngăn chặn 100%.

Tóm tắt kết quả và kết luận:

Khả năng của các kháng thể kháng TrkB để ngăn chặn TrkB liên kết với BDNF hoặc NT-4 được đánh giá bằng cách sử dụng hai ELISA bắt cặp cạnh tranh. TrkB-hFc người liên kết với hBDNF hoặc hNT-4 đã được phủ trên các đĩa microtiter 96 giếng, với sự có mặt của các kháng thể được pha loãng liên tục hoặc không có đối chứng kháng thể, được phát hiện với các kháng thể đa dòng dê đặc hiệu đoạn kháng Fcγ người được liên hợp với HRP. Các giá trị IC₅₀ được tính toán và sử dụng làm chỉ số về hiệu lực của kháng thể ngăn chặn hTrkB-hFc liên kết

với hBDNF hoặc hNT-4. Ngoài ra, tỷ lệ ngăn chặn tối đa của hTrkB-hFc 500pM với mỗi kháng thể ở nồng độ thử nghiệm cao nhất đã được tính toán và so sánh.

Các kết quả ngăn chặn được tóm tắt trong Bảng 28. Tỷ lệ phần trăm ngăn chặn được báo cáo cho tất cả các kháng thể và được tính toán ở nồng độ kháng thể được thử nghiệm cao nhất là 100nM. Tỷ lệ phần trăm ngăn chặn âm cho thấy có sự gia tăng liên kết TrkB đã được phát hiện với sự có mặt của kháng thể. Các giá trị IC_{50} được thể hiện đối với các kháng thể ngăn chặn trên 50% TrkB liên kết với BDNF hoặc NT-4. Giá trị IC_{50} không định lượng đối với các kháng thể ngăn chặn dưới 50% và được báo cáo là (-).

Ở nồng độ cao nhất của kháng thể được thử nghiệm, một (H4H9780P) trong số ba kháng thể kháng TrkB đã ngăn chặn > 50% hTrkB liên kết với BDNF hoặc các phối tử NT-4 với các giá trị IC_{50} tương ứng là 150pM và 180pM, với tỷ lệ phần trăm ngăn chặn của kháng thể ở 100nM là 93% cho BDNF và 80% cho NT-4. Ở mức 3,7nM, kháng thể này đã ngăn chặn hTrkB-hFc 500pM liên kết với NT-4 với tỷ lệ ngăn chặn 99%. Sự giảm tỷ lệ phần trăm ngăn chặn ở nồng độ thử nghiệm cao nhất có thể là do liên kết không đặc hiệu của H4H9780P với đĩa microtiter và việc phát hiện liên kết này với các kháng thể đa dòng đặc hiệu đoạn kháng Fcy người được liên hợp với HRP.

Hai trong số ba kháng thể kháng TrkB (H4H9814P và H4H9816P2) và các kháng thể đối chứng ngăn chặn không liên quan đã ngăn chặn dưới 50% hTrkB liên kết với BDNF hoặc NT-4. Bộ so sánh đã ngăn chặn trên 50% hTrkB-hFc 500pM liên kết với cả BDNF và NT-4.

Bảng 28

PID kháng thể	Kháng thể ngăn chặn hTrkB-hFc 500pM liên kết với đĩa được phủ hBDNF		Kháng thể ngăn chặn hTrkB-hFc 500pM liên kết với đĩa được phủ hNT-4	
	IC_{50} (M)	Tỷ lệ ngăn chặn % với kháng thể 100nM	IC_{50} (M)	Tỷ lệ ngăn chặn % với kháng thể 100nM

H4H9814P	-	6	-	38
H4H9816P2	-	-56	-	-123
H4H9780P	1,5E-10	93	1,8E-10	80*
ĐỐI CHỨNG				
a-TrkB- mIgG1 (H1M8037C so sánh)	1,7E-10	97	4,5E-11	95
Đối chứng isotype âm hIgG4	-	-31	-	-45
eĐối chứng isotype âm hIgG41	-	-19	-	-14

(*) đã ngăn chặn 99% ở mức nồng độ kháng thể H4H9780P 3,7nM

Ví dụ 14. Cạnh tranh chéo Octet giữa các kháng thể đơn dòng kháng hTrkB khác nhau

Để đánh giá xem hai kháng thể có cạnh tranh với nhau để liên kết với các epitope của chúng trên hTrkB-mmh hay không, sự cạnh tranh liên kết giữa các kháng thể đơn dòng kháng hTrkB đã được xác định bằng cách sử dụng xét nghiệm giao thoa lớp sinh học, không nhãn, thời gian thực trên máy cảm biến sinh học Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Các thí nghiệm cạnh tranh chéo đã được thực hiện ở nhiệt độ 25°C trong HEPES 0,01 M ở pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3,4mM, chất hoạt động bề mặt Tween-20 0,05% theo thể tích, BSA 0,1mg/ml (dung dịch đệm HBS-EP) với đĩa được lắc ở tốc độ 1000 vòng/phút. Tất cả các dung dịch thử nghiệm kháng thể kháng hTrkB và hTrkB-mmh đã được chuẩn bị trong dung dịch đệm Octet HBS-EP. Để đánh giá liệu 2 kháng thể có thể cạnh tranh với nhau để liên kết với các epitope tương ứng của chúng trên hTrkB-mmh hay không, khoảng ~ 0,14-0,24nm hTrkB-mmh đầu tiên được bắt giữ trên đầu

cảm biến sinh học Octet có phủ kháng His từ các giếng có chứa 5 μ g/ml hTrkB-mmh trong 5 phút. Các đầu cảm biến sinh học Octet đã bắt được hTrkB-mmh, được làm bão hòa bằng cách ngâm 5 phút trong các giếng có chứa 50 μ g/ml kháng thể đơn dòng kháng hTrkB thứ nhất (sau đây gọi là mAb-1), sau đó ngâm trong các giếng chứa kháng thể đơn dòng kháng hTrkB thứ hai (sau đây gọi là mAb-2) thêm 5 phút nữa. Giữa các bước, các đầu cảm biến sinh học Octet đã được rửa trong dung dịch đệm HBS-EP trong thời gian 30 giây.

Đáp ứng liên kết thời gian thực được giám sát trong suốt quá trình thử nghiệm và đáp ứng liên kết ở cuối mỗi bước đã được ghi lại. Đáp ứng của mAb-2 liên kết với hTrkB.mmh được tạo phức trước với mAb-1 đã được so sánh và hành vi cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng hTrkB khác nhau được xác định bằng cách sử dụng ngưỡng ức chế 60%.

Bảng 29 xác định rõ ràng mối quan hệ của các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, mà chúng không phụ thuộc vào thứ tự của liên kết.

Kết quả:

Bảng 29: Cạnh tranh chéo của các kháng thể kháng hTrkB để liên kết với hTrkB.mmh người.

mAb-1	mAb-2
H4H9814P	H4H9816P2
	H4H9814P
H4H9816P2	H4H9814P
	H4H9816P2
H4H9780P	H4H9780P
H1M8037C	H1M8037C
(bộ so sánh)	(bộ so sánh)

Ví dụ 15. Động học liên kết biacore của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB chuột nhất thay thế liên kết với các thuốc thử TrkB khác nhau được đo ở nhiệt độ 25°C

Để đánh giá xem hai kháng thể có cạnh tranh với nhau để liên kết với các epitope của chúng trên mTrkB-mmh hay không, sự cạnh tranh liên kết giữa các kháng thể đơn dòng kháng mTrkB đã được xác định bằng cách sử dụng xét nghiệm giao thoa lớp sinh học không nhãn trên thời gian thực trên máy đo sinh học HTX (ForteBio) Corp). Các thí nghiệm cạnh tranh chéo đã được thực hiện ở nhiệt độ 25°C trong HEPES 0,01 M ở pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3,4mM, chất hoạt động bề mặt Tween-20 0,05% theo thể tích, 0,1mg/mL BSA (dung dịch đệm HBS-EP) với đĩa lắc ở tốc độ 1000 vòng/phút. Tất cả các dung dịch kháng thể kháng mTrkB và mTrkB-mmh được thử nghiệm đã được chuẩn bị trong dung dịch đệm HBS-EP của Octet. Để đánh giá liệu 2 kháng thể có thể cạnh tranh với nhau để liên kết với các epitope tương ứng của chúng trên mTrkB-mmh hay không, khoảng ~ 0,20 - 0,27nm của mTrkB-mmh, đầu tiên được bắt giữ trên các đầu cảm biến sinh học Octet phủ kháng His từ các giếng có chứa 20µg/ml mTrkB-mmh trong 5 phút. Các đầu cảm biến sinh học Octet đã bắt mTrkB-mmh đã được làm bão hòa bằng cách ngâm 5 phút trong các giếng chứa 50 ug/ml kháng thể đơn dòng kháng mTrkB thứ nhất (sau đây gọi là mAb-1), sau đó ngâm trong các giếng có chứa kháng thể đơn dòng kháng mTrkB thứ hai (sau đây gọi là mAb-2) thêm 3 phút. Giữa các bước, các đầu cảm biến sinh học Octet được rửa trong dung dịch đệm HBS-EP trong thời gian 30 giây.

Đáp ứng liên kết thời gian thực được giám sát trong suốt quá trình thử nghiệm và đáp ứng liên kết ở cuối mỗi bước đã được ghi lại. Đáp ứng của mAb-2 liên kết với mTrkB.mmh được tạo phức trước với mAb-1 đã được so sánh và hành vi cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng mTrkB khác nhau đã được xác định bằng ngưỡng ức chế 50%.

Bảng 30 xác định rõ ràng mối quan hệ của các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, mà chúng không phụ thuộc vào thứ tự của liên kết.

Kết quả:

Bảng 30: Cạnh tranh chéo của kháng thể kháng mTrkB để liên kết với hTrkB.mmh chuột nhất.

mAb-1	mAb-2
M2aM14173N	M2aM14178N
	M2aM14173N
M2aM14178N	M2aM14173N
	M2aM14178N
M2aM14179N	M2aM14179N
H1M8037C (bộ so sánh)	H1M8037C (bộ so sánh)

Ví dụ 16: Ngăn chặn Octet: Ngăn chặn các kháng thể kháng TrkB người hoặc kháng TrkB chuột nhất liên kết với TrkB bằng BDNF hoặc NT-4

Thí nghiệm 1.

Việc ngăn chặn các kháng thể kháng TrkB người hoặc kháng TrkB chuột nhất liên kết với TrkB bằng BDNF hoặc NT-4 đã được đánh giá bằng cách sử dụng công cụ Octet HTX dựa trên giao thoa lớp sinh học (BLI) thời gian thực. Toàn bộ nghiên cứu này được thực hiện trong HEPES 10mM ở pH 7,4, NaCl 300mM, EDTA 3 mM, BSA 1mg/mL, NaN₃ 0,02% và chất hoạt động bề mặt Tween-20 0,05% theo thể tích (dung dịch đệm chạy HBS-EBT) ở nhiệt độ 25°C. Tất cả các mẫu được phân phối trong 384 đĩa giếng được đặt nghiêng và để trong máy lắc quỹ đạo với tốc độ lắc 1000 vòng/phút. hTrkB.mFc đã bị bắt trên các cảm biến Octet kháng mFc (AMC) trong khi hTrkB.hFc hoặc mTrkB.hFc đã bị bắt trên các cảm biến Octet kháng hFc (AHC) bằng cách nhúng vào giếng có chứa 10 µg/ml thuốc thử TrkB trong 2 phút. hTrkB.mFc hoặc hTrkB.hFc bắt được bằng các cảm biến sinh học Octet, được làm bão hòa bằng cách ngâm vào các giếng chứa 20nM BDNF, hNT-4 hoặc mNT-4 trong 2 phút, sau đó nhúng các cảm biến sinh học Octet vào các giếng chứa 300nM các kháng thể đơn dòng TrkB khác nhau trong 4 phút. Liên kết của các kháng thể đơn dòng TrkB với phức hợp TrkB

và BDNF, hNT-4 hoặc mNT-4 được xác định bằng cách sử dụng phần mềm phân tích Scrubber 2.0c.

Liên kết của các kháng thể kháng TrkB người hoặc kháng thể kháng TrkB chuột nhắt của sáng chế không bị ngăn chặn bởi cả BDNF và NT-4 như được báo cáo trong Bảng 31 và Bảng 32.

Bảng 31: Liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB người với phức hợp của hTrkB-mFc và BDNF hoặc NT-4 người.

			Liên kết của kháng thể kháng TrkB người (nm)		
Bề mặt bắt	Mức độ bắt (nm)	mAb	Không phối tử	BDNF bão hòa (0,05 ± 0,007) nm	hNT-4 bão hòa (0,05 ± 0,006) nm
hTrkB.mFc	0,29 ± 0,01	REGN1945 (đối chứng isotype âm)	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		H4H9780P	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,014	0,2 ± 0,007
		H4H9814P	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,006	0,23 ± 0,00
		H4H9816P2	0,19 ± 0,00	0,26 ± 0,007	0,24 ± 0,007
hTrkB.hFc	0,47 ± 0,01	H1M8037C (bộ so sánh)	0,38 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,006
Các giá trị của kháng thể kháng TrkB người liên kết với phức hợp của hTrkB.mFc hoặc hTrkB.hFc với BDNF hoặc hNT-4 đại diện cho mức giá trị trung bình của đáp ứng liên kết, được đo bằng cách					

sử dụng 3 cảm biến sinh học Octet độc lập cùng với độ lệch chuẩn. Liên kết của BDNF hoặc hNT-4 với hGFRa3.mFc không ức chế liên kết của các kháng thể kháng TrkB người bất kỳ.

Bảng 32: Liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng TrkB chuột nhất với phức hợp của mTrkB-hFc và BDNF hoặc NT-4 chuột nhất.

			Liên kết của kháng thể kháng TrkB chuột nhất (nm)		
Bề mặt bắt	Mức độ bắt (nm)	mAb	Không phối tử	BDNF bão hòa (0,07 ± 0,006) nm	mNT-4 bão hòa (0,07 ± 0,005) nm
mTrkB.hFc	0,47 ± 0,01	REGN1318 (đối chứng isotype âm)	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,006
		M2aM14173N	0,42 ± 0,006	0,38 ± 0,006	0,4 ± 0,00
		M2aM14178N	0,47 ± 0,00	0,35 ± 0,007	0,41 ± 0,006
		M2aM14179N	0,42 ± 0,006	0,44 ± 0,006	0,43 ± 0,006
		H1M8037C (Bộ so sánh)	0,42 ± 0,006	0,06 ± 0,006	0,11 ± 0,00

Các giá trị của các kháng thể kháng TrkB chuột nhất liên kết với phức hợp của mTrkB.mFc với BDNF hoặc mNT-4 đại diện cho giá trị trung bình của đáp ứng liên kết, được đo bằng 3 cảm biến sinh học Octet độc lập cùng với độ lệch chuẩn. Liên kết của BDNF hoặc mNT-4 với mGFRa3.hFc không ức chế sự liên kết của kháng thể kháng TrkB chuột nhất bất kỳ.

Thí nghiệm 2.

Việc ngăn chặn BDNF hoặc NT-4 liên kết với TrkB bằng kháng thể kháng TrkB người hoặc kháng thể kháng TrkB chuột nhắt được đánh giá bằng cách sử dụng công cụ Octet HTX dựa trên giao thoa lớp sinh học (BLI) thời gian thực. Toàn bộ nghiên cứu được thực hiện trong HEPES 10mM ở pH 7,4, NaCl 300mM, EDTA 3 mM, BSA 1mg/mL, NaN₃ 0,02% và chất hoạt động bề mặt Tween-20 0,05% theo thể tích (dung dịch đệm chạy HBS-EBT) ở nhiệt độ 25°C. Tất cả các mẫu được phân phối trong 384 đĩa giếng được đặt nghiêng và để vào máy lắc quỹ đạo với tốc độ lắc 1000 vòng/phút. hTrkB.mFc bị bắt trên các cảm biến Octet kháng mFc (AMC), trong khi hTrkB.hFc hoặc mTrkB.hFc bị bắt trên các cảm biến Octet kháng hFc (AHC), bằng cách ngâm vào giếng chứa 10µg/ml thuốc thử TrkB trong 2 phút. hTrkB.mFc hoặc hTrkB.hFc đã bắt bằng bộ cảm biến sinh học Octet, được làm bão hòa bằng cách ngâm vào các giếng chứa 300nM của các kháng thể đơn dòng TrkB khác nhau trong 4 phút, sau đó ngâm bộ cảm biến sinh học Octet trong các giếng chứa 20nM của BDNF, hNT-4 hoặc mNT-4 trong 2 phút. Liên kết của BDNF, hNT-4 hoặc mNT-4 với phức hợp TrkB và các kháng thể đơn dòng TrkB khác nhau được xác định bằng phần mềm phân tích Scrubber 2.0c.

Liên kết của 1 trong 3 kháng thể kháng TrkB người của sáng chế đã ngăn chặn liên kết của BDNF và hNT-4 như đã được báo cáo trong Bảng 33. Liên kết của 1 trong 3 kháng thể kháng TrkB chuột nhắt của sáng chế đã ngăn chặn một phần liên kết của BDNF và mNT-4 như đã được báo cáo trong Bảng 34.

Bảng 33: Liên kết của BDNF hoặc NT-4 người với phức hợp của hTrkB-mFc và các kháng thể đơn dòng kháng TrkB người.

Bề mặt bất		Mức độ bất (nm)	mAb	Liên kết BDNF		Liên kết hNT-4	
				Liên kết mAb (nm)	BDNF	Liên kết mAb (nm)	hNT-4
hTrkB.mFc		$0,28 \pm 0,01$	không có mAb	N/A	$0,05 \pm 0,007$	N/A	$0,04 \pm 0,005$
			REGN1945 (đối chứng isotype âm)	$0,01 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$	$0,033 \pm 0,006$
			H4H9780P	$0,18 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,01$	$0,007 \pm 0,006$
			H4H9814P	$0,18 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,00$
			H4H9816P2	$0,19 \pm 0,00$	$0,057 \pm 0,006$	$0,18 \pm 0,01$	$0,043 \pm 0,006$
hTrkB.hFc		$0,48 \pm 0,01$	H1M8037C (Bộ so sánh)	$0,38 \pm 0,01$	$-0,017 \pm 0,006$	$0,39 \pm 0,01$	$-0,013 \pm 0,006$
Các giá trị của BDNF hoặc hNT-4 liên kết với phức hợp của hTrkB.mFc hoặc hTrkB.hFc với các kháng thể kháng TrkB người thể hiện giá trị trung bình của đáp ứng liên kết được đo bằng cách sử dụng 3 cảm biến sinh học Octet độc lập cùng với độ lệch chuẩn. Liên kết của H4H9780P với hGFRa3.mFc đã ngăn chặn liên kết của BDNF và hNT-4.							

Bảng 34: Liên kết của BDNF hoặc NT-4 chuột nhất với phức hợp của mTrkB-hFc và các kháng thể đơn dòng kháng TrkB chuột nhất.

Bề mặt bắt		Mức độ bắt (nm)	mAb	Liên kết BDNF		Liên kết hNT-4	
				Liên kết mAb (nm)	BDNF	Liên kết mAb (nm)	hNT-4
mTrkB.hFc		0,48 ± 0,01	Không có mAb	N/A	0,07 ± 0,01	N/A	0,07 ± 0,005
			REGN1318 (đối chứng isotype âm)	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,00
			M2aM14173N	0,42 ± 0,006	0,07 ± 0,00	0,413 ± 0,006	0,06 ± 0,00
			M2aM14178N	0,47 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,033 ± 0,006
			M2aM14179N	0,42 ± 0,006	0,07 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,06 ± 0,00
			H1M8037C (so sánh)	0,42 ± 0,006	-0,017 ± 0,006	0,40 ± 0,00	-0,02 ± 0,00
Các giá trị của BDNF hoặc mNT-4 liên kết với phức hợp của mTrkB.hFc và các kháng thể kháng TrkB chuột nhất thể hiện giá trị trung bình của đáp ứng liên kết, được đo bằng cách sử dụng 3 cảm biến sinh học Octet độc lập cùng với độ lệch chuẩn. Liên kết của M2aM14178N với mTrkB.hFc đã ngăn chặn một phần liên kết của BDNF và mNT-4.							

Sáng chế không bị giới hạn trong phạm vi các phương án cụ thể đã được mô tả trong tài liệu này. Thật vậy, những cải biến khác nhau của sáng chế ngoài những cải biến được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng đối với các chuyên gia trong lĩnh vực này từ phần mô tả ở trên và các hình vẽ kèm theo. Những cải biến như vậy được dự tính là nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ được đính kèm.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với thụ thể tropomyosin kinaza B (TrkB), trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa một bộ sáu vùng xác định bổ sung (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) có chứa HCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6, HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, LCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12, LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14, và LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16.
2. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, có chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.
3. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người, với K_D nhỏ hơn 300nM khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C.
4. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với TrkB người với thời gian bán thải phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn 10 phút khi được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C.
5. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người khi không có mặt BDNF trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện TrkB, với giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 pM.

6. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đơn dòng hoàn toàn người.

7. Dược phẩm có chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

8. Dược phẩm, có chứa:

chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng; và

kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, có chứa HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10,

trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người khi không có mặt BDNF trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện TrkB với giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 pM,

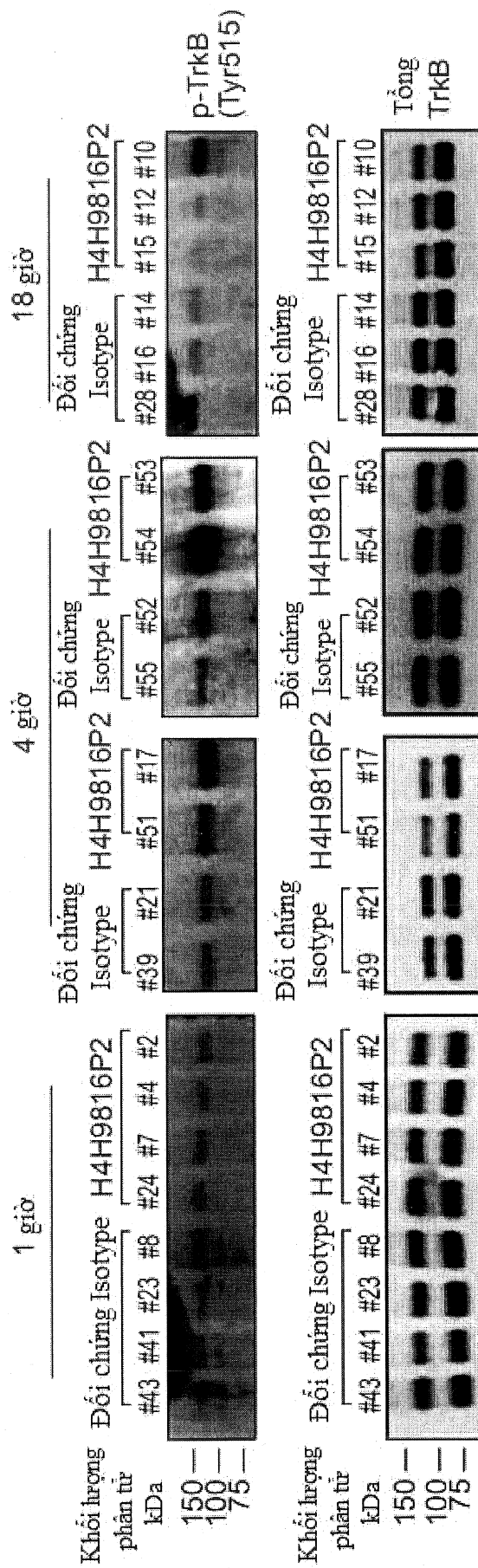
trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đơn dòng hoàn toàn người.

9. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với thụ thể tropomyosin kinaza B (TrkB), trong đó:

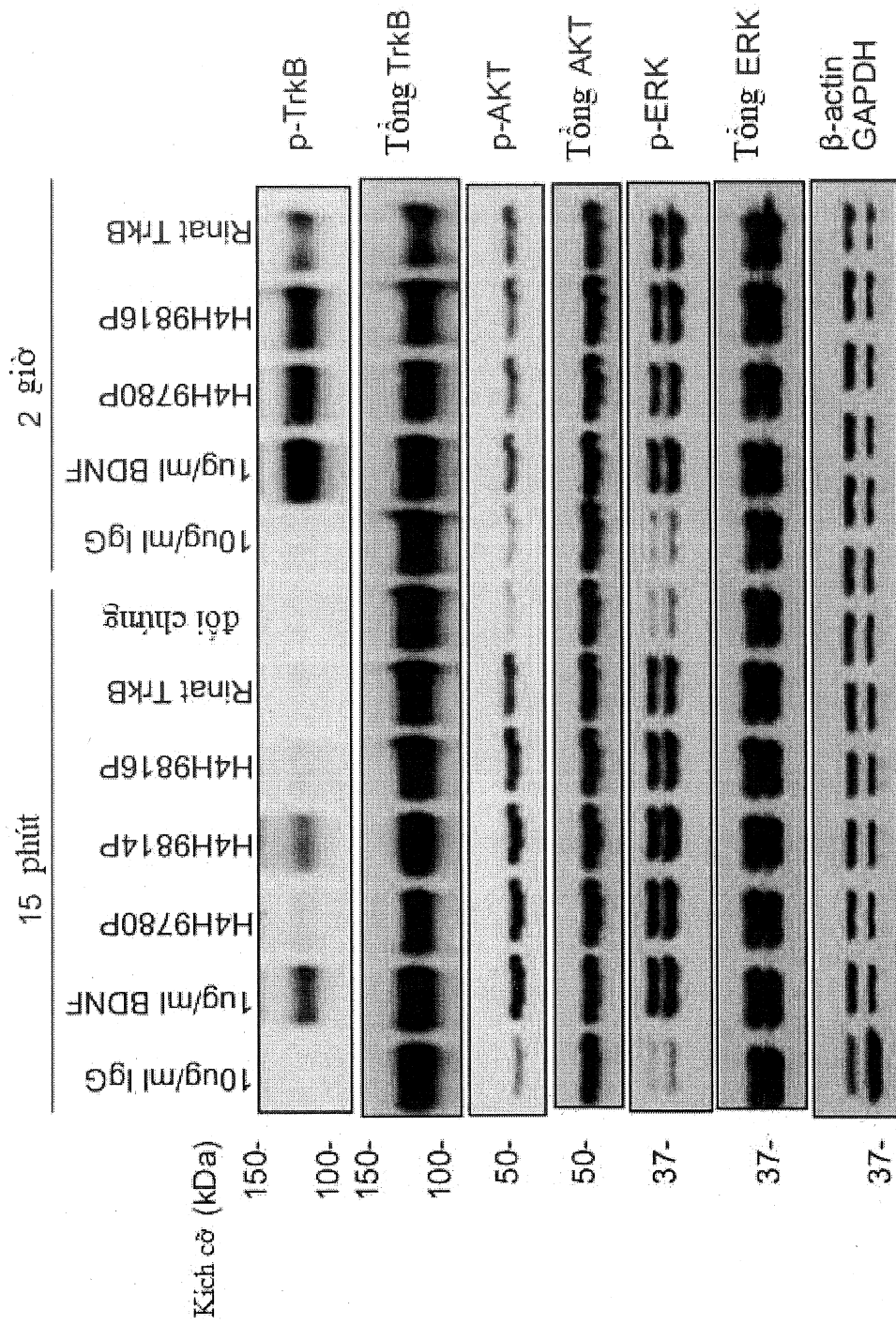
vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa HCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4, HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6, và HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8, và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó có chứa LCDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12, LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, và LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16,

trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoạt hoá sự dẫn truyền tín hiệu TrkB người khi không có mặt BDNF trong các tế bào được thiết kế để biểu hiện TrkB với giá trị EC_{50} nhỏ hơn 100 pM, và trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đơn dòng hoàn toàn người.

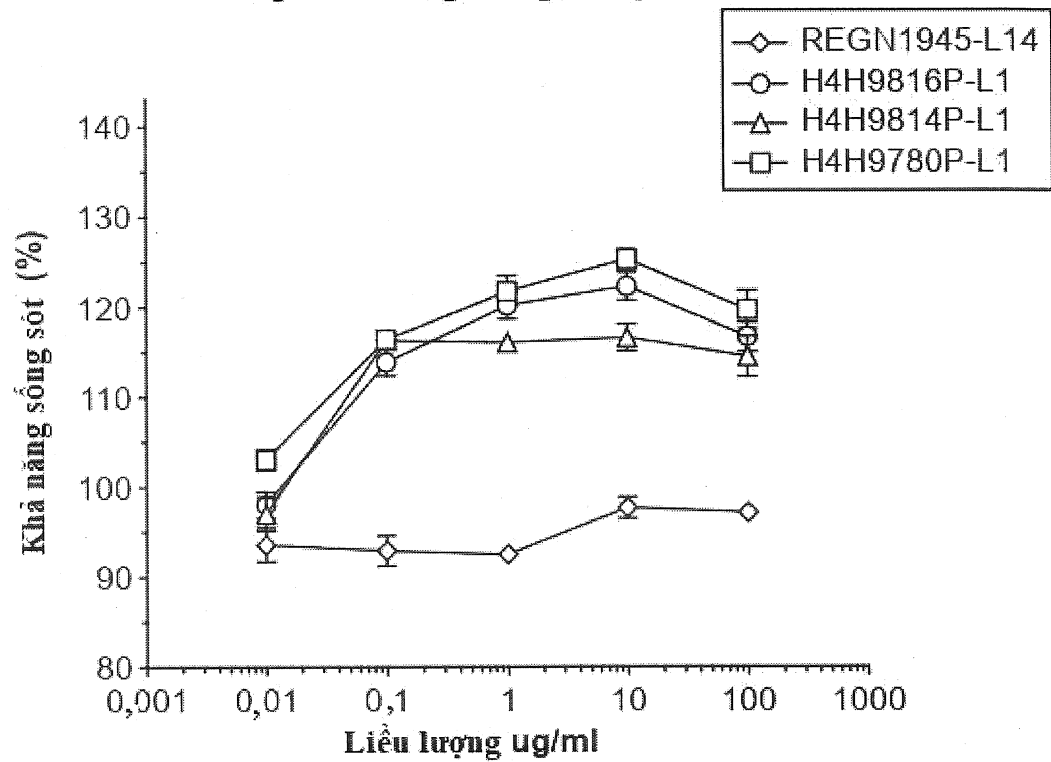


HÌNH. 1

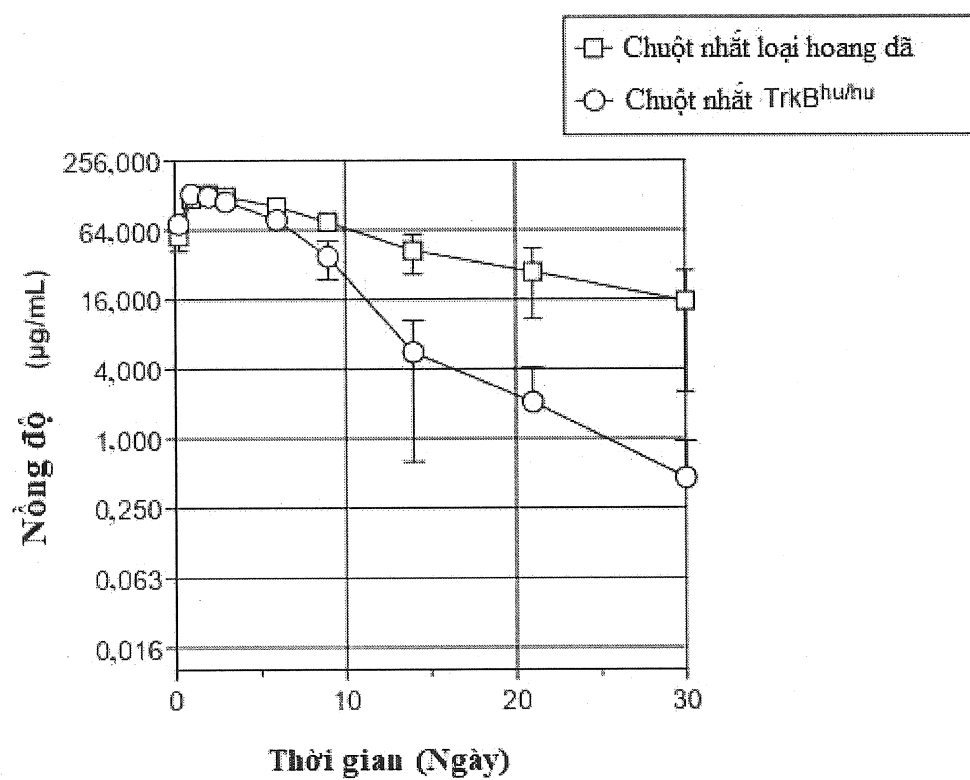


HÌNH. 2

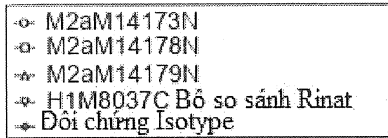
Khả năng sống sót của dòng tế bào SH-SY5Y người
trong môi trường không có huyết thanh



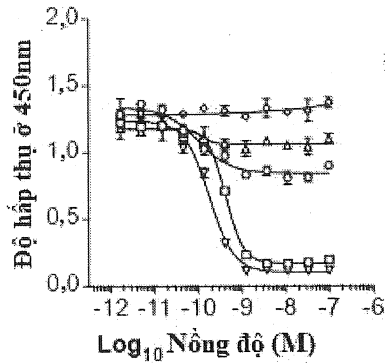
HÌNH. 3



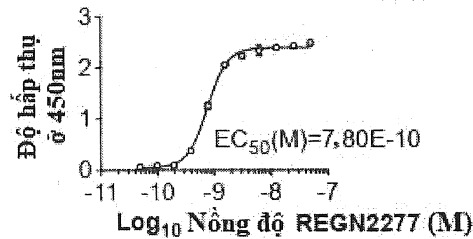
HÌNH. 4



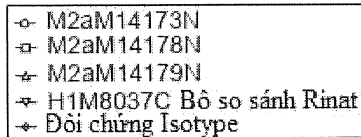
Sự ngăn chặn qua trung gian kháng TrkB chuột nhắt của TrkB.hFc chuột nhắt (REGN2277) liên kết với BDNF



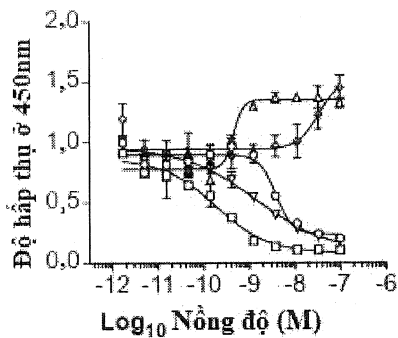
Đường cong liều lượng của REGN 2277 (TrkB.hFc chuột nhắt) liên kết với đĩa ELISA được phủ BDNF



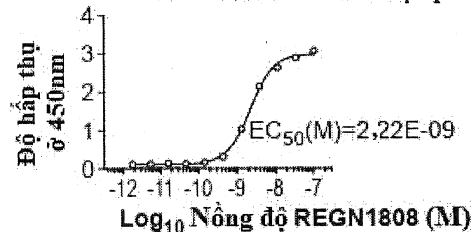
HÌNH. 5A



Sự ngăn chặn qua trung gian kháng TrkB chuột nhắt của TrkB.mmh chuột nhắt (REGN1808) liên kết với BDNF



Đường cong liều lượng của REGN 1808 (TrkB.mmh chuột cống) liên kết với đĩa ELISA được phủ BDNF



HÌNH. 5B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với thụ thể tropomyosin kinaza B và được phẩm chứa chúng

<130> 10395W001 (REGN-029W0)

<140> Được chuyển nhượng

<141> 2018-11-28

<150> 62/592,657

<151> 2017-11-30

<160> 104

<170> FastSEQ với Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cagcttcagt agctttggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg gactggagtg ggtgtcagtt atatcatatg atggaattaa tacatactat 180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acggcctgag agctgaggac acggctcttt attactgtgt gcaaggggtca 300
attggaaccg tttttgaata ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354
```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Gln Gly Ser Ile Gly Thr Val Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 3
 ggattcagct tcagtagctt tggc

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Phe Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 5
 atatcatatg atggaattaa taca

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 6

Ile Ser Tyr Asp Gly Ile Asn Thr
 1 5

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 7

gtgcaagggt caattggaac cgtttttgaa tac

33

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 8

Val Gln Gly Ser Ile Gly Thr Val Phe Glu Tyr
 1 5 10

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc gggcattagc aattatcttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagtgc cttaaactcct gatctatgct gcatccactt tacaatcagg ggtcccatct 180
 cggttcgggtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataccagtg cccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 10

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	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr
		20					25					30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35				40						45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Gly	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	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Lys	Tyr	Thr	Ser	Ala	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 11

cagggcatta gcaattat

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 12

Gln	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr
1				5	

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 13

gctgcatcc

9

<210> 14

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

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 14
 Ala Ala Ser
 1

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 15
 caaaagtata ccagtgcgcc attcact

27

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 16
 Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Phe Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 17
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctaaaactc 60
 tcctgtacag cctctgggtt caccttcagt ggctctgtta ttacttgggt ccgccaggct 120
 tccgggaaag ggctggagtg gattggccgt attagaaaca aggctaacag ttacgcgaca 180
 gcatatggtg cgtcggtgac aggcaggttc accatctcca gagatgattc aaagaacacg 240
 gcgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtttatta ctgtactttc 300
 ccgggtgtag tgggacgagg aggttttgac tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 18
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
 20 25 30
 Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Gly Ala
 50 55 60
 Ser Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Phe Pro Gly Val Val Gly Arg Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 19
 gggttcacct tcagtggtc tggt

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Val
 1 5

<210> 21
 <211> 30

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 21
 attagaaaca aggctaacag ttacgcgaca

30

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 22
 Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr
 1 5 10

<210> 23
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 23
 actttcccg gtgtagtggg acgaggaggt ttgactac

39

<210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 24
 Thr Phe Pro Gly Val Val Gly Arg Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 25
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 25

```

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gggggccacc 60
atcaactgca tgtccagcca gagtggtttta ttcagctcca acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccaac agaaaccagg acagcctcct aagttgctct tttactgggc atctaccg 180
gaatccgggg tccctgaccg attcgggtggc agcgggtctg ggacagattt ctctctcacc 240
atcaacagcc tgcagactga agatgtggca gtttattact gtctccaata ttatagtatt 300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaa 339

```

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 27

```

cagagtgttt tattcagctc caacaataag aactac

```

36

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 28

Gln Ser Val Leu Phe Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 29

tgggcatct

9

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 30

Trp Ala Ser

1

<210> 31

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 31

ctccaatatt atagtattcc gtggacg

27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 32

Leu Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr

1

5

<210> 33
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 33
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgacactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caatttccgt gattatgaaa tgatctgggt ccgccagact 120
 ccagggaagg ggctggagtg gatttcatac attagtaata gtggttatac catatactac 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaggaa ctcaatatat 240
 ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgttc gagacgtact 300
 actatgattc ggggcattag ggcgtactac tattacggtc tggacgtctg gggccaaggg 360
 accacgggtca ccgtctcctc a 381

<210> 34
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Arg Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met Ile Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Tyr Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Ile Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Arg Thr Thr Met Ile Arg Gly Ile Arg Ala Tyr Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 35
ggattcaatt tccgtgatta tgaa

24

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 36
Gly Phe Asn Phe Arg Asp Tyr Glu
1 5

<210> 37
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 37
attagtaata gtggttatac cata

24

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 38
Ile Ser Asn Ser Gly Tyr Thr Ile
1 5

<210> 39
<211> 60
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 39
tcgagacgta ctactatgat tcggggcatt agggcgctact actattacgg tctggacgtc 60

<210> 40
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 40
 Ser Arg Arg Thr Thr Met Ile Arg Gly Ile Arg Ala Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Leu Asp Val
 20

<210> 41
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 41
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 42
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> tổng hợp

<400> 42
 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 Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 43
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 43
cagagcatta gcagctat

18

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 44
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 45
gctgcatcc

9

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 46
Ala Ala Ser
1

<210> 47
<211> 30

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 47
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> tổng hợp

<400> 48
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 49
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> M2aM14173N HCVR

<400> 49
Asn Val Ser Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Gln Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Met Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Asp Arg Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser His Leu Met Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Lys Gly Glu Lys Ala Tyr Tyr Thr Ala Phe Phe Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14173N HCDR1

<400> 50

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala
1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14173N HCDR2

<400> 51

Ile Ser Asp Arg Gly Ser Tyr Thr
1 5

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14173N HCDR3

<400> 52

Ala Arg Gly Lys Gly Glu Lys Ala Tyr Tyr Thr Ala Phe Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14173N LCVR

<400> 53

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

15

65		70		75		80									
Gly	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Ser	Ser	Pro	Trp
			85					90						95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14173N LCDR1

<400> 54
 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 1 5

<210> 55
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14173N LCDR2

<400> 55
 Asn Ala Glu
 1

<210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14173N LCDR3

<400> 56
 Gln His His Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 57
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> IgG2a của chuột

<400> 57

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60
 Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 145 150 155 160
 Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 165 170 175
 Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 195 200 205
 Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 210 215 220
 Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 245 250 255
 Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285
 Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320
 Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LC không đổi

<400> 58

```

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

```

<210> 59

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14178N HCVR

<400> 59

```

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

```

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14178N HCDR1

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14178N HCDR2

<400> 61

Ile Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Thr
 1 5

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14178N HCDR3

<400> 62

Ile Arg Gly Asp Val Tyr Tyr Val Arg Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 63

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14178N LCVR

<400> 63

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

100

105

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> M2aM14178N LCDR1

<400> 64
Thr Gly Ala Val Thr Ser Ser Asn His
1 5

<210> 65
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> M2aM14178N LCDR2

<400> 65
Gly Thr Asn
1

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> M2aM14178N LCDR3

<400> 66
Ala Leu Trp His Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 67
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> M2aM14178N LC không đổi

<400> 67
Gly Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

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

<210> 68

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14179N HCVR

<400> 68

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

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> M2aM14179N HCDR1

<400> 69

Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14179N HCDR2

<400> 70
 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14179N HCDR3

<400> 71
 Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 72
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14179N LCVR

<400> 72
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Ile Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 73

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

<220>
 <223> M2aM14179N LCDR1

<400> 73
 Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 74
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14179N LCDR2

<400> 74
 Trp Ala Ser
 1

<210> 75
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> M2aM14179N LCDR3

<400> 75
 Lys Gln Ser Tyr Ile Leu Phe Thr
 1 5

<210> 76
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> TrkB(C32-H430).mmH
 aa 1-399: aa 32 qua 430 của NP_001018074.1; aa
 400-427 myc-myc-hexahistidine tag

<400> 76
 Cys Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp
 1 5 10 15
 Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val

24

<210> 77
 <211> 632
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của người (C32-H430).mFc
 aa 1-399: aa 32 qua 430 của NP_001018074.1; aa
 400-632 miền Fc của chuột

<400> 77

Cys	Pro	Thr	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser	Ala	Ser	Arg	Ile	Trp	Cys	Ser	Asp
1				5					10					15	
Pro	Ser	Pro	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu	Pro	Asn	Ser	Val
			20					25					30		
Asp	Pro	Glu	Asn	Ile	Thr	Glu	Ile	Phe	Ile	Ala	Asn	Gln	Lys	Arg	Leu
		35					40					45			
Glu	Ile	Ile	Asn	Glu	Asp	Asp	Val	Glu	Ala	Tyr	Val	Gly	Leu	Arg	Asn
	50					55					60				
Leu	Thr	Ile	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	Val	Ala	His	Lys	Ala	Phe
65					70				75						80
Leu	Lys	Asn	Ser	Asn	Leu	Gln	His	Ile	Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	Lys	Leu
				85					90					95	
Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Phe	Arg	His	Leu	Asp	Leu	Ser	Glu	Leu
			100					105					110		
Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Pro	Phe	Thr	Cys	Ser	Cys	Asp	Ile	Met	Trp	Ile
		115					120					125			
Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Asp	Thr	Gln	Asp	Leu	Tyr
		130				135					140				
Cys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ser	Lys	Asn	Ile	Pro	Leu	Ala	Asn	Leu	Gln	Ile
145					150					155					160
Pro	Asn	Cys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Pro	Asn	Leu	Thr
				165					170					175	
Val	Glu	Glu	Gly	Lys	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Asp
			180					185					190		
Pro	Val	Pro	Asn	Met	Tyr	Trp	Asp	Val	Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Lys	His
		195					200					205			
Met	Asn	Glu	Thr	Ser	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Arg	Ile	Thr	Asn	Ile
	210					215					220				
Ser	Ser	Asp	Asp	Ser	Gly	Lys	Gln	Ile	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Leu
225					230					235					240
Val	Gly	Glu	Asp	Gln	Asp	Ser	Val	Asn	Leu	Thr	Val	His	Phe	Ala	Pro
			245						250					255	
Thr	Ile	Thr	Phe	Leu	Glu	Ser	Pro	Thr	Ser	Asp	His	His	Trp	Cys	Ile
			260					265						270	
Pro	Phe	Thr	Val	Lys	Gly	Asn	Pro	Lys	Pro	Ala	Leu	Gln	Trp	Phe	Tyr
		275					280						285		
Asn	Gly	Ala	Ile	Leu	Asn	Glu	Ser	Lys	Tyr	Ile	Cys	Thr	Lys	Ile	His
	290					295					300				
Val	Thr	Asn	His	Thr	Glu	Tyr	His	Gly	Cys	Leu	Gln	Leu	Asp	Asn	Pro
305					310					315					320
Thr	His	Met	Asn	Asn	Gly	Asp	Tyr	Thr	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Glu	Tyr

```

          325          330          335
Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
          340          345          350
Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp
          355          360          365
Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn
          370          375          380
Glu Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Glu
385          390          395          400
Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
          405          410          415
Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
          420          425          430
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
          435          440          445
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
          450          455          460
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
465          470          475          480
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
          485          490          495
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
          500          505          510
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
          515          520          525
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
          530          535          540
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
545          550          555          560
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
          565          570          575
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
          580          585          590
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
          595          600          605
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
          610          615          620
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
625          630

```

<210> 78

<211> 626

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của người (C32-H430).hFc

aa 1-399: aa 32 qua 430 của NP_001018074.1; aa

400-626: miền Fc của người

<400> 78

Cys Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp
 1 5 10 15
 Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val
 20 25 30
 Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn
 50 55 60
 Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
 85 90 95
 Thr Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu
 100 105 110
 Ile Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile
 115 120 125
 Lys Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr
 130 135 140
 Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
 165 170 175
 Val Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp
 180 185 190
 Pro Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
 195 200 205
 Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile
 210 215 220
 Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile
 260 265 270
 Pro Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
 340 345 350
 Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn
 370 375 380
 Glu Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Asp
 385 390 395 400
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 405 410 415
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

```

          420                      425                      430
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
          435                      440                      445
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
          450                      455                      460
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
465                      470                      475                      480
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
          485                      490                      495
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
          500                      505                      510
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
          515                      520                      525
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
          530                      535                      540
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
545                      550                      555                      560
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
          565                      570                      575
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
          580                      585                      590
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
          595                      600                      605
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
          610                      615                      620
Gly Lys
625

```

<210> 79

<211> 426

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của chuột (C32-H429)mmH

aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_001020245; aa

399-426: myc-myc-hexahistidine tag

<400> 79

```

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

```

```
<210> 80
<211> 631
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_001020245; aa

399-631 miền Fc của chuột

<400> 80

Cys Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ser Ala Arg Ile Trp Cys Thr Glu
 1 5 10 15
 Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val
 20 25 30
 Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn
 50 55 60
 Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Asn Ser Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
 85 90 95
 Thr Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu
 100 105 110
 Ile Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu
 115 120 125
 Lys Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr
 130 135 140
 Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Met Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
 165 170 175
 Val Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Leu Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp
 180 185 190
 Pro Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
 195 200 205
 Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile
 210 215 220
 Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile
 260 265 270
 Pro Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly
 340 345 350
 Val Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Trp Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu
 370 375 380

```

Ile Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Ser Asn Arg Glu His Glu Pro
385          390          395          400
Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
          405          410          415
Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
          420          425          430
Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
          435          440          445
Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
          450          455          460
Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
465          470          475          480
Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
          485          490          495
Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
          500          505          510
Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
          515          520          525
Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
          530          535          540
Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
545          550          555          560
Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
          565          570          575
Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
          580          585          590
Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
          595          600          605
Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
          610          615          620
Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
625          630

```

<210> 81

<211> 625

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của chuột (C32-H429).hFc

aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_001020245; aa

399-625 miền Fc của người

<400> 81

```

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

```

32

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 485 490 495
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 500 505 510
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 515 520 525
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 530 535 540
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 545 550 555 560
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 565 570 575
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 580 585 590
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 595 600 605
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 610 615 620
 Lys
 625

<210> 82

<211> 427

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của thỏ (C32-H430)mmH

aa 1-399: aa32 qua 430 của XP_002721319.1; aa

400-427: myc-myc-hexahistidine tag

<400> 82

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

```

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

```

<210> 83

<211> 632

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của thỏ (C32-H430)mFc

aa 1-399: aa32 qua 430 của XP_002721319.1; aa

400-632 miền Fc của chuột

<400> 83

```

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

```

Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Lys Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Ile Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn
 50 55 60
 Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
 85 90 95
 Thr Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu
 100 105 110
 Ile Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile
 115 120 125
 Lys Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Glu Thr Gln Asp Leu Tyr
 130 135 140
 Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Ser Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
 165 170 175
 Val Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Asn Val Ala Gly Asp
 180 185 190
 Pro Val Pro Asn Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
 195 200 205
 Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Phe Leu Arg Ile Thr Asn Ile
 210 215 220
 Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile
 260 265 270
 Pro Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Thr Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
 340 345 350
 Ile Asp Asp Asp Pro Asn Leu Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn
 370 375 380
 Glu Ile Pro Pro Thr Gly Ala Ala Asp Asn Ala Gly Arg Glu His Glu
 385 390 395 400
 Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
 405 410 415
 Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
 420 425 430
 Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
 435 440 445
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val

```

      450                      455                      460
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
465                      470                      475                      480
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
      485                      490                      495
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
      500                      505                      510
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
      515                      520                      525
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
      530                      535                      540
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
545                      550                      555                      560
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
      565                      570                      575
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
      580                      585                      590
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
      595                      600                      605
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
      610                      615                      620
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
625                      630

```

<210> 84

<211> 426

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của chuột cống (C32-H429)mmH

aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_036863.1; aa

399-426 myc-myc-hexahistidine tag

<400> 84

```

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

```

```

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

```

<210> 85

<211> 631

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB của chuột cống (C32-H429)mFc

aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_036863.1; aa

399-631 miền Fc của chuột

<400> 85

Cys Pro Met Ser Cys Lys Cys Ser Thr Thr Arg Ile Trp Cys Thr Glu
 1 5 10 15
 Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Ile
 20 25 30
 Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Lys Asn
 50 55 60
 Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Asn Gly Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
 85 90 95
 Thr Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu
 100 105 110
 Ile Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu
 115 120 125
 Lys Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr
 130 135 140
 Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Thr Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
 165 170 175
 Val Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Ile Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp
 180 185 190
 Pro Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
 195 200 205
 Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile
 210 215 220
 Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile
 260 265 270
 Pro Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly
 340 345 350
 Val Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Trp Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu
 370 375 380
 Ile Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Thr Asn Arg Glu His Glu Pro
 385 390 395 400
 Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
 405 410 415

```

Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
      420                      425                      430
Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
      435                      440                      445
Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
      450                      455                      460
Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
      465                      470                      475                      480
Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
      485                      490                      495
Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
      500                      505                      510
Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
      515                      520                      525
Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
      530                      535                      540
Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
      545                      550                      555                      560
Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
      565                      570                      575
Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
      580                      585                      590
Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
      595                      600                      605
Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
      610                      615                      620
Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
      625                      630

```

<210> 86

<211> 605

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkA của người (A34-T414).hFc

aa 1-375: aa 34 qua 414 của NP_001012331.1 with
V263L, C300S; aa 376-378 GPG Linker; aa 379-605
miền Fc của người

<400> 86

```

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

```

Ile	Val	Lys	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe	Val	Ala	Pro	Asp	Ala	Phe	His	Phe
65					70				75						80
Thr	Pro	Arg	Leu	Ser	Arg	Leu	Asn	Leu	Ser	Phe	Asn	Ala	Leu	Glu	Ser
			85						90					95	
Leu	Ser	Trp	Lys	Thr	Val	Gln	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Val	Leu
			100					105					110		
Ser	Gly	Asn	Pro	Leu	His	Cys	Ser	Cys	Ala	Leu	Arg	Trp	Leu	Gln	Arg
		115					120					125			
Trp	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Gly	Gly	Val	Pro	Glu	Gln	Lys	Leu	Gln	Cys
	130					135					140				
His	Gly	Gln	Gly	Pro	Leu	Ala	His	Met	Pro	Asn	Ala	Ser	Cys	Gly	Val
145					150					155					160
Pro	Thr	Leu	Lys	Val	Gln	Val	Pro	Asn	Ala	Ser	Val	Asp	Val	Gly	Asp
				165					170					175	
Asp	Val	Leu	Leu	Arg	Cys	Gln	Val	Glu	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Gln	Ala
			180					185					190		
Gly	Trp	Ile	Leu	Thr	Glu	Leu	Glu	Gln	Ser	Ala	Thr	Val	Met	Lys	Ser
	195						200					205			
Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Asn	Val	Thr	Ser	Asp
	210					215					220				
Leu	Asn	Arg	Lys	Asn	Leu	Thr	Cys	Trp	Ala	Glu	Asn	Asp	Val	Gly	Arg
225					230					235					240
Ala	Glu	Val	Ser	Val	Gln	Val	Asn	Val	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Val	Gln
				245					250					255	
Leu	His	Thr	Ala	Val	Glu	Met	His	His	Trp	Ser	Ile	Pro	Phe	Ser	Val
			260					265					270		
Asp	Gly	Gln	Pro	Ala	Pro	Ser	Leu	Arg	Trp	Leu	Phe	Asn	Gly	Ser	Val
	275						280					285			
Leu	Asn	Glu	Thr	Ser	Phe	Ile	Phe	Thr	Glu	Phe	Leu	Glu	Pro	Ala	Ala
	290					295					300				
Asn	Glu	Thr	Val	Arg	His	Gly	Cys	Leu	Arg	Leu	Asn	Gln	Pro	Thr	His
305					310					315					320
Val	Asn	Asn	Gly	Asn	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Asn	Pro	Phe	Gly	Gln
				325					330					335	
Ala	Ser	Ala	Ser	Ile	Met	Ala	Ala	Phe	Met	Asp	Asn	Pro	Phe	Glu	Phe
			340					345					350		
Asn	Pro	Glu	Asp	Pro	Ile	Pro	Asp	Thr	Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Asp	Pro
		355					360					365			
Val	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Thr	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
	370					375					380				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
385					390				395						400
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				405					410					415	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
			420				425						430		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
	435					440						445			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
	450					455					460				
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
465					470					475					480
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys

```
<210> 87
<211> 426
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> TrkC của người(C32-T429).mmH
aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_001012338.1; aa
399-426 myc-myc-hexahistidine tag

41

```
<210> 88
<211> 426
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> TrkC của chuột(C32-T429).mmH
aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_032772.3; aa
399-426 myc-myc-hexahistidine tag

<400> 88
Cys Pro Ala Asn Cys Val Cys Ser Lys Thr Glu Ile Asn Cys Arg Arg
1 5 10 15

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

<210> 89
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MF TrkC(C32-T429).mmH
 aa 1-398: aa 32 qua 429 của XP_015308837.1; aa
 399-426 myc-myc-hexahistidine tag

<400> 89

Cys	Pro	Ala	Asn	Cys	Val	Cys	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Asn	Cys	Arg	Arg	1	5	10	15
Pro	Asp	Asp	Gly	Asn	Leu	Phe	Pro	Leu	Leu	Glu	Gly	Gln	Asp	Ser	Gly	20	25	30	
Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Ala	Ser	Ile	Asn	Ile	Thr	Asp	Ile	Ser	Arg	Asn	35	40	45	
Ile	Thr	Ser	Ile	His	Ile	Glu	Asn	Trp	Arg	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Asn	50	55	60	
Ala	Val	Asp	Met	Glu	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Gln	Asn	Leu	Thr	Ile	Arg	65	70	75	80
Asn	Ser	Gly	Leu	Arg	Ser	Ile	Gln	Pro	Arg	Ala	Phe	Ala	Lys	Asn	Pro	85	90	95	
His	Leu	Arg	Tyr	Ile	Asn	Leu	Ser	Ser	Asn	Arg	Leu	Thr	Thr	Leu	Ser	100	105	110	
Trp	Gln	Leu	Phe	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Arg	Leu	Glu	Gln	115	120	125	
Asn	Phe	Phe	Asn	Cys	Ser	Cys	Asp	Ile	Arg	Trp	Met	Gln	Leu	Trp	Gln	130	135	140	
Glu	Gln	Gly	Glu	Ala	Lys	Leu	Asn	Asn	Gln	Asn	Leu	Tyr	Cys	Ile	Asn	145	150	155	160
Ala	Asp	Gly	Ser	Gln	Leu	Pro	Leu	Phe	Arg	Met	Asn	Ile	Ser	Gln	Cys	165	170	175	
Asp	Leu	Pro	Glu	Ile	Ser	Val	Ser	His	Val	Asn	Leu	Thr	Val	Arg	Glu	180	185	190	
Gly	Asp	Asn	Ala	Val	Ile	Thr	Cys	Asn	Gly	Ser	Gly	Ser	Pro	Leu	Pro	195	200	205	
Asp	Val	Asp	Trp	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Gln	Ser	Ile	Asn	Thr	His	Gln	210	215	220	
Thr	Asn	Leu	Asn	Trp	Thr	Asn	Val	His	Ala	Ile	Asn	Leu	Thr	Leu	Val	225	230	235	240
Asn	Val	Thr	Ser	Glu	Asp	Asn	Gly	Phe	Thr	Leu	Thr	Cys	Ile	Ala	Glu	245	250	255	
Asn	Val	Val	Gly	Met	Ser	Asn	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Thr	Val	Tyr	Tyr	260	265	270	
Pro	Pro	Arg	Val	Val	Ser	Leu	Glu	Glu	Pro	Glu	Leu	Arg	Leu	Glu	His	275	280	285	

```

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

```

<210> 90

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> BDNF_đồng dạng A

aa 1-120: aa 129 qua 247 của NP_733928.1 với một Met được thêm vào thuật ngữ N

<400> 90

```

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

```

<210> 91
 <211> 791
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB (pRG984.hTrkB ecto-hTrkB TM/Cyto)
 aa 1-792: aa 32 qua 822 của NP_001018074.1 hoặc
 số Uniprot Q16620-1 TM/Cyto 399-790

<400> 91

Cys	Pro	Thr	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser	Ala	Ser	Arg	Ile	Trp	Cys	Ser	Asp	1	5	10	15
Pro	Ser	Pro	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu	Pro	Asn	Ser	Val	20	25	30	
Asp	Pro	Glu	Asn	Ile	Thr	Glu	Ile	Phe	Ile	Ala	Asn	Gln	Lys	Arg	Leu	35	40	45	
Glu	Ile	Ile	Asn	Glu	Asp	Asp	Val	Glu	Ala	Tyr	Val	Gly	Leu	Arg	Asn	50	55	60	
Leu	Thr	Ile	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	Val	Ala	His	Lys	Ala	Phe	65	70	75	80
Leu	Lys	Asn	Ser	Asn	Leu	Gln	His	Ile	Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	Lys	Leu	85	90	95	
Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Phe	Arg	His	Leu	Asp	Leu	Ser	Glu	Leu	100	105	110	
Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Pro	Phe	Thr	Cys	Ser	Cys	Asp	Ile	Met	Trp	Ile	115	120	125	
Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Asp	Thr	Gln	Asp	Leu	Tyr	130	135	140	
Cys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ser	Lys	Asn	Ile	Pro	Leu	Ala	Asn	Leu	Gln	Ile	145	150	155	160
Pro	Asn	Cys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Pro	Asn	Leu	Thr	165	170	175	
Val	Glu	Glu	Gly	Lys	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Asp	180	185	190	
Pro	Val	Pro	Asn	Met	Tyr	Trp	Asp	Val	Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Lys	His	195	200	205	
Met	Asn	Glu	Thr	Ser	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Arg	Ile	Thr	Asn	Ile	210	215	220	
Ser	Ser	Asp	Asp	Ser	Gly	Lys	Gln	Ile	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Leu	225	230	235	240
Val	Gly	Glu	Asp	Gln	Asp	Ser	Val	Asn	Leu	Thr	Val	His	Phe	Ala	Pro	245	250	255	
Thr	Ile	Thr	Phe	Leu	Glu	Ser	Pro	Thr	Ser	Asp	His	His	Trp	Cys	Ile	260	265	270	
Pro	Phe	Thr	Val	Lys	Gly	Asn	Pro	Lys	Pro	Ala	Leu	Gln	Trp	Phe	Tyr	275	280	285	

Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
 340 345 350
 Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn
 370 375 380
 Glu Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu
 405 410 415
 Leu Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly
 420 425 430
 Met Lys Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser
 435 440 445
 Pro Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu
 450 455 460
 Gly Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile
 465 470 475 480
 Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp
 485 490 495
 Thr Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu
 500 505 510
 Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn
 515 520 525
 Leu Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys
 530 535 540
 Asp Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu
 545 550 555 560
 Leu Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys
 565 570 575
 Val Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly
 580 585 590
 Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met
 595 600 605
 Ala Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His
 610 615 620
 Ile Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His
 625 630 635 640
 Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn
 645 650 655
 Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser
 660 665 670
 Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp
 675 680 685
 Met Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp
 690 695 700
 Val Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys

```

705              710              715              720
Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr
              725              730              735
Gln Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr
              740              745              750
Glu Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn
              755              760              765
Ile Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro
              770              775              780
Val Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
785              790

```

<210> 92
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> TrkB của chuột
 aa 1-446: aa 32 qua 476 của NP_032771.1

```

<400> 92
Cys Pro Thr Ser Cys Lys Cys Ser Ser Ala Arg Ile Trp Cys Thr Glu
 1              5              10              15
Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val
 20              25              30
Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Leu Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu
 35              40              45
Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn
 50              55              60
Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe
 65              70              75              80
Leu Lys Asn Ser Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
 85              90              95
Thr Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu
100              105              110
Ile Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu
115              120              125
Lys Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr
130              135              140
Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Met Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
145              150              155              160
Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
165              170              175
Val Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Leu Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp
180              185              190
Pro Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
195              200              205
Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile

```

```

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

```

<210> 93

<211> 790

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> TrkB di truyền học (pRG984.mTrkB ecto-hTrkB TM/Cyto)

aa 1-398: aa 32 qua 429 của NP_001020245.1 hoặc

số Uniprot P15209-1; TrkB của người TM/Cyto

399-790 (aaa 431 của 822 của NP_001018074.1)

<400> 93

```

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

```

50	55	60
Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala Tyr Lys Ala Phe		
65	70	75
Leu Lys Asn Ser Asn Leu Arg His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu		80
	85	90
Thr Ser Leu Ser Arg Arg His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Asp Leu		95
	100	105
Ile Leu Thr Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Leu		110
	115	120
Lys Thr Leu Gln Glu Thr Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr		125
	130	135
Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Met Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile		140
145	150	155
Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Arg Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr		160
	165	170
Val Glu Glu Gly Lys Ser Val Thr Leu Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp		175
	180	185
Pro Leu Pro Thr Leu Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His		190
	195	200
Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile		205
	210	215
Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu		220
225	230	235
Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro		240
	245	250
Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile		255
	260	265
Pro Phe Thr Val Arg Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr		270
	275	280
Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His		285
	290	295
Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro		300
305	310	315
Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Met Ala Lys Asn Glu Tyr		320
	325	330
Gly Lys Asp Glu Arg Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Arg Pro Gly		335
	340	345
Val Asp Tyr Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Pro Glu Val Leu Tyr Glu Asp		350
	355	360
Trp Thr Thr Pro Thr Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Lys Ser Asn Glu		365
	370	375
Ile Pro Ser Thr Asp Val Ala Asp Gln Ser Asn Arg Glu His Leu Ser		380
385	390	395
Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu Leu		400
	405	410
Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly Met		415
	420	425
Lys Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser Pro		430
	435	440
Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu Gly		445
	450	455
Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile Glu		460
465	470	475
		480

```

Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp Thr
      485                      490                      495
Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu Leu
      500                      505                      510
Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn Leu
      515                      520                      525
Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys Asp
      530                      535                      540
Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu Leu
545                      550                      555                      560
Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys Val
      565                      570                      575
Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly Asp
      580                      585                      590
Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met Ala
      595                      600                      605
Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His Ile
      610                      615                      620
Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His Phe
625                      630                      635                      640
Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn Leu
      645                      650                      655
Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser Thr
      660                      665                      670
Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp Met
      675                      680                      685
Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp Val
      690                      695                      700
Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys Gln
705                      710                      715                      720
Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr Gln
      725                      730                      735
Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr Glu
      740                      745                      750
Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn Ile
      755                      760                      765
Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro Val
      770                      775                      780
Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
785                      790

```

<210> 94

<211> 791

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AGM TrkB (pRGN984.agmTrkB)

1-791: aa 32 qua 822 của XP_007967815.1

<400> 94

Cys Pro Arg Ser Cys Lys Cys Ser Ala Ser Arg Ile Trp Cys Ser Asp
 1 5 10 15
 Pro Ser Pro Gly Ile Val Ala Phe Pro Arg Leu Glu Pro Asn Ser Val
 20 25 30
 Asp Pro Glu Asn Ile Thr Glu Ile Phe Ile Ala Asn Gln Lys Arg Leu
 35 40 45
 Glu Ile Ile Asn Glu Asp Asp Val Glu Ala Tyr Val Gly Leu Arg Asn
 50 55 60
 Leu Thr Ile Val Asp Ser Gly Leu Lys Phe Val Ala His Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Asn Ser Asn Leu Gln His Ile Asn Phe Thr Arg Asn Lys Leu
 85 90 95
 Thr Ser Leu Ser Arg Lys His Phe Arg His Leu Asp Leu Ser Glu Leu
 100 105 110
 Ile Leu Val Gly Asn Pro Phe Thr Cys Ser Cys Asp Ile Met Trp Ile
 115 120 125
 Lys Thr Leu Gln Glu Ala Lys Ser Ser Pro Asp Thr Gln Asp Leu Tyr
 130 135 140
 Cys Leu Asn Glu Ser Ser Lys Asn Ile Pro Leu Ala Asn Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Pro Asn Cys Gly Leu Pro Ser Ala Asn Leu Ala Ala Pro Asn Leu Thr
 165 170 175
 Val Glu Glu Gly Lys Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ser Val Ala Gly Asp
 180 185 190
 Pro Val Pro Asn Met Tyr Trp Asp Val Gly Asn Leu Val Ser Lys His
 195 200 205
 Met Asn Glu Thr Ser His Thr Gln Gly Ser Leu Arg Ile Thr Asn Ile
 210 215 220
 Ser Ser Asp Asp Ser Gly Lys Gln Ile Ser Cys Val Ala Glu Asn Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Glu Asp Gln Asp Ser Val Asn Leu Thr Val His Phe Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Thr Phe Leu Glu Ser Pro Thr Ser Asp His His Trp Cys Ile
 260 265 270
 Pro Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
 340 345 350
 Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn
 370 375 380
 Glu Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu

				405					410				415				
Leu	Val	Met	Leu	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Arg	His	Ser	Lys	Phe	Gly		
			420					425					430				
Met	Lys	Gly	Pro	Ala	Ser	Val	Ile	Ser	Asn	Asp	Asp	Asp	Ser	Ala	Ser		
		435					440					445					
Pro	Leu	His	His	Ile	Ser	Asn	Gly	Ser	Asn	Thr	Pro	Ser	Ser	Ser	Glu		
		450				455					460						
Gly	Gly	Pro	Asp	Ala	Val	Ile	Ile	Gly	Met	Thr	Lys	Ile	Pro	Val	Ile		
465					470					475					480		
Glu	Asn	Pro	Gln	Tyr	Phe	Gly	Ile	Thr	Asn	Ser	Gln	Leu	Lys	Pro	Asp		
			485					490						495			
Thr	Phe	Val	Gln	His	Ile	Lys	Arg	His	Asn	Ile	Val	Leu	Lys	Arg	Glu		
			500					505					510				
Leu	Gly	Glu	Gly	Ala	Phe	Gly	Lys	Val	Phe	Leu	Ala	Glu	Cys	Tyr	Asn		
		515					520					525					
Leu	Cys	Pro	Glu	Gln	Asp	Lys	Ile	Leu	Val	Ala	Val	Lys	Thr	Leu	Lys		
		530				535					540						
Asp	Ala	Ser	Asp	Asn	Ala	Arg	Lys	Asp	Phe	His	Arg	Glu	Ala	Glu	Leu		
545					550					555					560		
Leu	Thr	Asn	Leu	Gln	His	Glu	His	Ile	Val	Lys	Phe	Tyr	Gly	Val	Cys		
			565					570						575			
Val	Glu	Gly	Asp	Pro	Leu	Ile	Met	Val	Phe	Glu	Tyr	Met	Lys	His	Gly		
			580					585					590				
Asp	Leu	Asn	Lys	Phe	Leu	Arg	Ala	His	Gly	Pro	Asp	Ala	Val	Leu	Met		
		595					600					605					
Ala	Glu	Gly	Asn	Pro	Pro	Thr	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Gln	Met	Leu	His		
		610				615						620					
Ile	Ala	Gln	Gln	Ile	Ala	Ala	Gly	Met	Val	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	His		
625					630					635					640		
Phe	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Thr	Arg	Asn	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Asn		
			645					650						655			
Leu	Leu	Val	Lys	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Val	Tyr	Ser		
		660						665					670				
Thr	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Val	Gly	Gly	His	Thr	Met	Leu	Pro	Ile	Arg	Trp		
		675				680						685					
Met	Pro	Pro	Glu	Ser	Ile	Met	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Thr	Glu	Ser	Asp		
		690				695					700						
Val	Trp	Ser	Leu	Gly	Val	Val	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Tyr	Gly	Lys		
705					710					715					720		
Gln	Pro	Trp	Tyr	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Glu	Val	Ile	Glu	Cys	Ile	Thr		
			725					730						735			
Gln	Gly	Arg	Val	Leu	Gln	Arg	Pro	Arg	Thr	Cys	Pro	Gln	Glu	Val	Tyr		
		740						745					750				
Glu	Leu	Met	Leu	Gly	Cys	Trp	Gln	Arg	Glu	Pro	His	Met	Arg	Lys	Asn		
		755					760					765					
Ile	Lys	Gly	Ile	His	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu	Ala	Lys	Ala	Ser	Pro		
	770					775					780						
Val	Tyr	Leu	Asp	Ile	Leu	Gly											
785					790												

<210> 95

<211> 807

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MM TrkB (mmTrkB)

1-807: aa 32 qua 838 của NP_001248226.1

<400> 95

Cys	Pro	Thr	Ser	Cys	Lys	Cys	Ser	Ala	Ser	Arg	Ile	Trp	Cys	Ser	Asp	1	5	10	15
Pro	Ser	Pro	Gly	Ile	Val	Ala	Phe	Pro	Arg	Leu	Glu	Pro	Asn	Ser	Val	20	25	30	
Asp	Pro	Glu	Asn	Ile	Thr	Glu	Ile	Phe	Ile	Ala	Asn	Gln	Lys	Arg	Leu	35	40	45	
Glu	Ile	Ile	Asn	Glu	Asp	Asp	Val	Glu	Ala	Tyr	Val	Gly	Leu	Arg	Asn	50	55	60	
Leu	Thr	Ile	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	Lys	Phe	Val	Ala	His	Lys	Ala	Phe	65	70	75	80
Leu	Lys	Asn	Ser	Asn	Leu	Gln	His	Ile	Asn	Phe	Thr	Arg	Asn	Lys	Leu	85	90	95	
Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Phe	Arg	His	Leu	Asp	Leu	Ser	Glu	Leu	100	105	110	
Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Pro	Phe	Thr	Cys	Ser	Cys	Asp	Ile	Met	Trp	Ile	115	120	125	
Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Asp	Thr	Gln	Asp	Leu	Tyr	130	135	140	
Cys	Leu	Asn	Glu	Ser	Ser	Lys	Asn	Ile	Pro	Leu	Ala	Asn	Leu	Gln	Ile	145	150	155	160
Pro	Asn	Cys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ala	Asn	Leu	Ala	Ala	Pro	Asn	Leu	Thr	165	170	175	
Val	Glu	Glu	Gly	Lys	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Asp	180	185	190	
Pro	Val	Pro	Asn	Met	Tyr	Trp	Asp	Val	Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Lys	His	195	200	205	
Met	Asn	Glu	Thr	Ser	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Leu	Arg	Ile	Thr	Asn	Ile	210	215	220	
Ser	Ser	Asp	Asp	Ser	Gly	Lys	Gln	Ile	Ser	Cys	Val	Ala	Glu	Asn	Leu	225	230	235	240
Val	Gly	Glu	Asp	Gln	Asp	Ser	Val	Asn	Leu	Thr	Val	His	Phe	Ala	Pro	245	250	255	
Thr	Ile	Thr	Phe	Leu	Glu	Ser	Pro	Thr	Ser	Asp	His	His	Trp	Cys	Ile	260	265	270	
Pro	Phe	Thr	Val	Lys	Gly	Asn	Pro	Lys	Pro	Ala	Leu	Gln	Trp	Phe	Tyr	275	280	285	
Asn	Gly	Ala	Ile	Leu	Asn	Glu	Ser	Lys	Tyr	Ile	Cys	Thr	Lys	Ile	His	290	295	300	
Val	Thr	Asn	His	Thr	Glu	Tyr	His	Gly	Cys	Leu	Gln	Leu	Asp	Asn	Pro	305	310	315	320
Thr	His	Met	Asn	Asn	Gly	Asp	Tyr	Thr	Leu	Ile	Ala	Lys	Asn	Glu	Tyr	325	330	335	

Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
 340 345 350
 Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn
 370 375 380
 Glu Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu
 405 410 415
 Leu Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly
 420 425 430
 Met Lys Asp Phe Ser Trp Phe Gly Phe Gly Lys Val Lys Ser Arg Gln
 435 440 445
 Gly Val Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser
 450 455 460
 Pro Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu
 465 470 475 480
 Gly Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile
 485 490 495
 Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp
 500 505 510
 Thr Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu
 515 520 525
 Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn
 530 535 540
 Leu Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys
 545 550 555 560
 Asp Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu
 565 570 575
 Leu Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys
 580 585 590
 Val Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly
 595 600 605
 Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met
 610 615 620
 Ala Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His
 625 630 635 640
 Ile Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His
 645 650 655
 Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn
 660 665 670
 Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser
 675 680 685
 Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp
 690 695 700
 Met Pro Pro Glu Ser Ile Met Tyr Arg Lys Phe Thr Thr Glu Ser Asp
 705 710 715 720
 Val Trp Ser Leu Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Thr Tyr Gly Lys
 725 730 735
 Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Asn Glu Val Ile Glu Cys Ile Thr
 740 745 750
 Gln Gly Arg Val Leu Gln Arg Pro Arg Thr Cys Pro Gln Glu Val Tyr

```

      755              760              765
Glu Leu Met Leu Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro His Met Arg Lys Asn
      770              775              780
Ile Lys Gly Ile His Thr Leu Leu Gln Asn Leu Ala Lys Ala Ser Pro
785              790              795              800
Val Tyr Leu Asp Ile Leu Gly
              805

```

<210> 96

<211> 807

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> MF TrkB (mfTrkB)

1-807 : aa 32 qua 838 của XP_005582102.1

<400> 96

```

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

```

Pro Phe Thr Val Lys Gly Asn Pro Lys Pro Ala Leu Gln Trp Phe Tyr
 275 280 285
 Asn Gly Ala Ile Leu Asn Glu Ser Lys Tyr Ile Cys Thr Lys Ile His
 290 295 300
 Val Thr Asn His Thr Glu Tyr His Gly Cys Leu Gln Leu Asp Asn Pro
 305 310 315 320
 Thr His Met Asn Asn Gly Asp Tyr Thr Leu Ile Ala Lys Asn Glu Tyr
 325 330 335
 Gly Lys Asp Glu Lys Gln Ile Ser Ala His Phe Met Gly Trp Pro Gly
 340 345 350
 Ile Asp Asp Gly Ala Asn Pro Asn Tyr Pro Asp Val Ile Tyr Glu Asp
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ala Ala Asn Asp Ile Gly Asp Thr Thr Asn Arg Ser Asn
 370 375 380
 Glu Ile Pro Ser Thr Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Arg Glu His Leu
 385 390 395 400
 Ser Val Tyr Ala Val Val Val Ile Ala Ser Val Val Gly Phe Cys Leu
 405 410 415
 Leu Val Met Leu Phe Leu Leu Lys Leu Ala Arg His Ser Lys Phe Gly
 420 425 430
 Met Lys Asp Phe Ser Trp Phe Gly Phe Gly Lys Val Lys Ser Arg Gln
 435 440 445
 Gly Val Gly Pro Ala Ser Val Ile Ser Asn Asp Asp Asp Ser Ala Ser
 450 455 460
 Pro Leu His His Ile Ser Asn Gly Ser Asn Thr Pro Ser Ser Ser Glu
 465 470 475 480
 Gly Gly Pro Asp Ala Val Ile Ile Gly Met Thr Lys Ile Pro Val Ile
 485 490 495
 Glu Asn Pro Gln Tyr Phe Gly Ile Thr Asn Ser Gln Leu Lys Pro Asp
 500 505 510
 Thr Phe Val Gln His Ile Lys Arg His Asn Ile Val Leu Lys Arg Glu
 515 520 525
 Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Cys Tyr Asn
 530 535 540
 Leu Cys Pro Glu Gln Asp Lys Ile Leu Val Ala Val Lys Thr Leu Lys
 545 550 555 560
 Asp Ala Ser Asp Asn Ala Arg Lys Asp Phe His Arg Glu Ala Glu Leu
 565 570 575
 Leu Thr Asn Leu Gln His Glu His Ile Val Lys Phe Tyr Gly Val Cys
 580 585 590
 Val Glu Gly Asp Pro Leu Ile Met Val Phe Glu Tyr Met Lys His Gly
 595 600 605
 Asp Leu Asn Lys Phe Leu Arg Ala His Gly Pro Asp Ala Val Leu Met
 610 615 620
 Ala Glu Gly Asn Pro Pro Thr Glu Leu Thr Gln Ser Gln Met Leu His
 625 630 635 640
 Ile Ala Gln Gln Ile Ala Ala Gly Met Val Tyr Leu Ala Ser Gln His
 645 650 655
 Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys Leu Val Gly Glu Asn
 660 665 670
 Leu Leu Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser Arg Asp Val Tyr Ser
 675 680 685
 Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly His Thr Met Leu Pro Ile Arg Trp

690		695		700											
Met	Pro	Pro	Glu	Ser	Ile	Met	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Thr	Glu	Ser	Asp
705					710					715					720
Val	Trp	Ser	Leu	Gly	Val	Val	Leu	Trp	Glu	Ile	Phe	Thr	Tyr	Gly	Lys
				725						730					735
Gln	Pro	Trp	Tyr	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Glu	Val	Ile	Glu	Cys	Ile	Thr
			740					745					750		
Gln	Gly	Arg	Val	Leu	Gln	Arg	Pro	Arg	Thr	Cys	Pro	Gln	Glu	Val	Tyr
		755					760					765			
Glu	Leu	Met	Leu	Gly	Cys	Trp	Gln	Arg	Glu	Pro	His	Met	Arg	Lys	Asn
	770					775					780				
Ile	Lys	Gly	Ile	His	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu	Ala	Lys	Ala	Ser	Pro
785					790					795					800
Val	Tyr	Leu	Asp	Ile	Leu	Gly									
				805											

<210> 97

<211> 447

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng H1M8037C

<400> 97

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

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

<210> 98

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ H1M8037C

<400> 98

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

```

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

```

<210> 99

<211> 445

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ H4H9780P

<400> 99

```

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

```

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

<210> 100

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ H4H9780P

<400> 100

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

62

210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu 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 Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 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 Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 102

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ H4H9814P

<400> 102

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

<400> 103															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Phe	Arg	Asp	Tyr
			20					25					30		
Glu	Met	Ile	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Ser	Tyr	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Ser	Ile	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Val	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ser	Arg	Arg	Thr	Thr	Met	Ile	Arg	Gly	Ile	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Gly	Leu	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala
		115					120					125			
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser
		130				135					140				
Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
145					150					155					160
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
				165					170					175	
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
			180					185					190		
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr

```

      195              200              205
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
  210              215              220
Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
  225              230              235              240
Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
      245              250              255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
      260              265              270
Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
      275              280              285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
      290              295              300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
  305              310              315              320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
      325              330              335
Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
      340              345              350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
      355              360              365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
      370              375              380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
  385              390              395              400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
      405              410              415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
      420              425              430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu
      435              440              445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
  450

```

<210> 104

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ H4H9816P2

<400> 104

```

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