(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) **1-0023363**

(51)[7] **A61K 38/16**; C07K 14/00; C07K 17/08; A61K 47/48

(13) **B**

(21) 1-2012-03601
(22) 29/04/2011
(86) PCT/EP2011/056824 29/04/2011
(87) WO2011/135067 03/11/2011
(30) 10161685.2 30/04/2010 EP
(45) 27/04/2020 385
(43) 25/04/2013 301A
(73) MOLECULAR PARTNERS AG (CH)
Wagistrasse 14, CH-8952 Schlieren(CH)
(72) BINZ, Hans Kaspar (CH); FORRER, Patrik (CH); STUMPP, Michael Tobias (DE)
(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) PROTEIN GẮN KẾT TÁI TỔ HỢP ỨC CHẾ SỰ TƯƠNG TÁC THỤ THỂ YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG NỘI MÔ MẠCH MÁU (VEGF-A) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến protein gắn kết đặc hiệu đối với VEGF-A, cụ thể là đề cập đến protein gắn kết tái tổ hợp chứa gốc polyetylen glycol và vùng gắn kết, mà ức chế sự gắn kết của VEGF-Axxx với VEGFR-2. Ví dụ về các protein gắn kết tái tổ hợp này là các protein mà chứa vùng lặp lại ankyrin có tính đặc hiệu gắn kết mong muốn, và gốc polyetylen glycol. Các protein gắn kết này hữu dụng trong điều trị bệnh ung thư và các tình trạng bệnh khác, ví dụ các bệnh về mắt như thoái hóa điểm vàng do tuổi già.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein gắn kết tái tổ hợp được cải biến đặc hiệu đối với VEGF-A, cũng như dược phẩm chứa các protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự hình thành mạch, sự tăng trưởng các mạch máu mới từ mạch máu đang tồn tại, là quy trình quan trọng trong một số tình trạng bệnh lý, bao gồm sự tăng trưởng khối u và các bệnh về mắt, cụ thể là các bệnh hình thành mạch mới ở mắt như thoái hóa điểm vàng do tuổi già (age-related macular degeneration-AMD) hoặc bệnh phù điểm vàng của võng mạc do tiểu đường (diabetic macular edema - DME) (Carmeliet, P., Nature 438, 932-936, 2005). Các yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (Vascular endothelial growth factors - VEGFs) kích thích sự hình thành mạch và sự hình thành mạch bạch huyết mới bằng cách hoạt hóa tyrosin kinaza thụ thể VEGF (VEGF receptor - VEGFR) trong các tế bào nội mạc (Ferrara, N., Gerber, H. P. và LeCouter, J., Nature Med. 9, 669-676, 2003).

Họ VEGF ở động vật có vú bao gồm năm glycoprotein được gọi là VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (cũng được gọi là FIGF) và yếu tố tăng trưởng nhau thai (placenta growth factor - PIGF, cũng được gọi là PGF). VEGF-A đã được thể hiện để là đích có hiệu quả đối với liệu pháp chống hình thành mạch (Ellis, L. M. và Hicklin, D. J., Nature Rev. Cancer 8, 579-591, 2008). Các phối tử VEGF-A gắn kết và hoạt hóa ba tyrosin kinaza thụ thể loại III giống nhau về mặt cấu trúc, VEGFR- 1 (cũng được gọi là FLT1), VEGFR-2 (cũng được gọi là KDR) và VEGFR-3 (cũng được gọi là FLT4) được chọn. Các phối tử VEGF có các đặc tính gắn kết khác biệt đối với mỗi thụ thể trong số các thụ thể tyrosin kinaza, mà góp phần vào sự đa dạng về chức năng của chúng. Đáp ứng với sự gắn kết phối tử, các tyrosin kinaza VEGFR hoạt hóa mạng lưới các con đường truyền tín hiệu xuôi dòng khác biệt. VEGFR-1 và VEGFR-2 chủ yếu được tìm thấy trên nội mạc mạch máu trong khi VEGFR-3 chủ yếu được tìm thấy trên nội mô bạch huyết. Tất cả các thụ thể này có vùng ngoại bào, vùng xuyên màng và trình tự tyrosin kinaza

đồng dạng bị gián đoạn bởi vùng xen kinaza. Gần đây neuropilin (NRP-1), ban đầu được xác định là thụ thể đối với họ semaphorin/ collapsin của chất trung gian dẫn truyền thần kinh, được thể hiện là hoạt động như là thụ thể đặc hiệu isoform đối với VEGF-A.

Các isoform khác nhau của VEGF-A được biết là được tạo ra bằng cách cắt nối có chọn lọc (alternative splicing) từ tám exon trong gen VEGF-A. Tất cả các isoform chứa các các exon 1-5 và exon cuối cùng, exon 8. Các exon 6 và 7, mà mã hóa vùng gắn kết heparin có thể có hoặc loại bỏ. Điều này dẫn đến một họ các protein được đặt tên theo số axit amin của chúng: VEGF-A165, VEGF-A121, VEGF-A189 v.v. Tuy nhiên, exon 8 chứa hai vị trí cắt 3' trong các trình tự nucleotit, mà có thể được tế bào sử dụng để tạo ra hai họ isoform giống nhau về chiều dài, nhưng khác trình tự axit amin ở đầu tận cùng C (Varey, A.H.R. et al., British J. Cancer 98, 1366-1379, 2008). VEGF-Axxx ("xxx" dùng để chỉ số axit amin của protein trưởng thành), họ tiền thân mạch của các isoform, được tạo ra bằng cách dùng trình tự ở đầu gần nhất trong exon 8 (dẫn đến có exon 8a). Các isoform VEGF-Axxxb chống hình thành mạch được mô tả mới đây được tạo ra bằng cách dùng vị trí cắt ở xa, xa hơn 66 bp dọc theo gen từ vị trí cắt ở đầu gần. Điều này dẫn đến sự cắt nối của exon 8a và sự tạo ra các trình tự mRNA mã hóa họ VEGF-Axxxb. VEGF-A165 là isoform tiền thân mạch chiếm ưu thế và thường được biểu hiện quá mức trong nhiều khối u rắn ở người. VEGF-A165b là isoform đầu tiên được mã hóa bằng exon 8b đã được xác định và được thể hiện là có hiệu quả chống hình thành mạch (Varey et al., loc. cit; Konopatskaya, O. et al., Molecular Vision 12, 626-632, 2006). Đó là dạng ức chế nội sinh của VEGF-A, mà làm giảm sự tăng sinh và sự di trú do VEGF-A của các tế bào biểu mô. Mặc dù nó có khả năng gắn kết với VEGFR-2, gắn kết VEGF-A165b không dẫn đến sự phosphoryl hóa thụ thể hoặc hoạt hóa các con đường truyền tín hiệu xuôi dòng.

Có nhiều phương pháp tiếp cận để ức chế sự truyền tín hiệu VEGF-A, bao gồm sự trung hòa phối tử hoặc thụ thể bởi kháng thể, và ngăn chặn sự hoạt hóa thụ thể VEGF-A và truyền tín hiệu bằng các chất ức chế tyrosin kinaza. Trị liệu hướng đích VEGF-A đã được chứng tỏ là có hiệu quả là tác nhân đơn lẻ trong AMD, DME, ung thư tế bào thận và ung thư tế bào gan, trong khi nó chỉ có hiệu quả khi kết hợp với hóa trị liệu cho các bệnh nhân bị ung thư trực tràng di căn, ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư vú di căn (Narayanan, R. et al., Nat Rev. Drug Discov. 5, 815-816, 2005; Ellis và Hicklin, loc. cit).

Ngoài kháng thể, các vùng gắn kết khác có thể được dùng để trung hòa phối tử hoặc thụ thể (Skerra, A., J. Mol. Recog. 13, 167-187, 2000; Binz, H. K., Amstutz, P. và Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268, 2005). Một loại vùng gắn kết mới trong số các vùng gắn kết dựa trên cơ sở các vùng lặp được chọn (WO 02/20565; Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C, Forrer, P., Grijtter, M. G., và Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 22, 575-582, 2004). WO 02/20565 mô tả thư viện lớn của các protein lặp lại có thể được tạo ra và sự áp dụng thông thường của chúng. Tuy nhiên, WO 02/20565 không mô tả sự lựa chọn các vùng lặp lại có đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx hoặc không tạo ra các môtip trình tự lặp lại của các vùng lặp lại gắn kết đặc hiệu với VEGF-Axxx.

VEGF-A đích hiện có trong điều trị không hiệu quả ở tất cả các bệnh nhân, hoặc đối với tất cả các bệnh (ví dụ, ung thư biểu hiện EGFR). Thậm chí, ngày càng trở nên rõ ràng rằng hiệu quả chữa bệnh liên quan đến trị liệu hướng đích VEGF-A là phức tạp và có thể liên quan đến nhiều cơ chế (Ellis và Hicklin, loc. cit). Ví dụ, các thuốc chống VEGF, như bevacizumab (Avastin®) hoặc ranibizumab (Lucentis®) (xem WO 96/030046, WO 98/045331 và WO 98/045332) hoặc các thuốc trong phát triển lâm sàng, như VEGF-Trap® (WO 00/075319) không phân biệt giữa các dạng tiền chống hình thành mạch và dạng chống hình thành mạch của VEGF-A, vì vậy chúng không ức chế cả hai. Kết quả là, chúng ức chế sự hình thành mạch, nhưng cũng lấy đi các mô lành của yếu tố sống sót cơ bản, cụ thể là VEGF-Axxxb, dẫn đến các tác dụng phụ giới hạn liều và gây độc, mà hạn chế hiệu quả. Các tác dụng phụ phổ biến đối với trị liệu kháng VEGF-A là thủng tạng rỗng, xuất huyết, cao huyết áp, nghẽn mạch huyết khối và protein niệu (Kamba, T. and McDonald, D.M., Br. J. Cancer 96, 1788-95, 2007). Một loại thuốc kháng VEGF có bán ngoài thị trường để điều trị AMD là pegaptanib (WO 98/018480; Macugen®, nhãn hiệu đã được đăng ký của Pfizer). Pegaptanib là aptame kháng VEGF được PEGyl hóa, sợi đơn axit nucleic mà gắn kết đặc hiệu với protein đích. Để điều trị AMD tân mạch có bằng chứng rõ ràng rằng các kết quả về thị lực với Lucentis® là vượt trội so với các kết quả về thị lực với Macugen®, và không có bằng chứng xác định để đề xuất sự khác nhau về độ an toàn giữa các loại thuốc này. Kết quả là, Macugen® không phải là trị liệu thường được dùng cho bệnh này.

Nói chung, tồn tại nhu cầu đối với các chất chống hình thành mạch được cải tiến để điều trị ung thư và các tình trạng bệnh lý khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật trong sáng chế là xác định các chất chống hình thành mạch mới, như các vùng lặp lại có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx, để điều trị tốt hơn và các tình trạng bệnh lý khác, ví dụ các bệnh về mắt như AMD hoặc DME. Giải pháp cho vấn đề này đạt được bằng các phương án được nêu trong các yêu cầu bảo hộ.

Sáng chế đề cập đến protein gắn kết tái tổ hợp chứa vùng lặp lại ankyrin và gốc polyetylen glycol có trọng lượng phân tử ít nhất là 5kDa, trong đó vùng ankyrin nêu trên gắn kết VEGF-Axxx với Kd nhỏ hơn 10^{-9}M và ức chế gắn kết của VEGF-Axxx với VEGFR-2.

Theo phương án được ưu tiên, gốc polyetylen glycol được ghép cặp với gốc Cys đơn lẻ của vùng gắn kết.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa một hoặc nhiều protein gắn kết hoặc axit nucleic nêu trên.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư và các tình trạng bệnh lý khác, ví dụ các bệnh về mắt như AMD hoặc DME, bằng cách dùng protein gắn kết theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Gắn kết VEGF-A 164 chó cụ thể của các protein lặp lại ankyrin được chọn. Sự tương tác của các dòng được chọn với VEGF-A164 của chó (VEGF) và protein đối chứng âm tính (MBP, protein gắn kết maltoza của Escherichia coli) được thể hiện bằng ELISA dịch chiết thô. VEGF-A164 của chó được biotinyl hóa và MBP được cố định trên NeutrAvidin. Các con số đề cập đến các dòng DARPin đơn lẻ trong kỹ thuật biểu lộ trên ribosom kháng lại VEGF-A164 của chó hoặc VEGF-A165 tương ứng của người.

A = Độ hấp thụ. Các thanh màu trắng thể hiện sự gắn kết với VEGF-A164 của chó, các thanh màu đen thể hiện sự gắn kết cơ sở không đặc hiệu với MBP.

Fig.2. Sự ức chế sự mọc quá nhanh vật dạng cầu bằng DARPin được chọn.

Độ dài của các mầm trong thử nghiệm ức chế sự mọc quá nhanh vật dạng cầu được thể hiện khi có mặt với các nồng độ khác nhau của (a) DARPin #30 (các axit amin từ 1 đến 126 của trình tự SEQ ID NO:4), DARPin có tính đặc hiệu đối với VEGF-Axxx, hoặc (b) DARPin NC, DARPin đối chứng âm tính không có tính đặc hiệu đối với VEGF-Axxx.

Fig.3. Sự nhận biết đặc hiệu các isoform VEGF-A.

Phép phân tích cộng hưởng plasom bề mặt (Surface Plasmon Resonance-SPR) của protein gắn kết trên các isoform VEGF-A.

(a) và (b): phân tích SPR của Avastin®. 250nM Avastin® được dùng cho tế bào dòng chảy có VEGF-A164 của chó được cố định (a) hoặc VEGF-A164b của chó (b) trong 100 giây, tiếp đó rửa bằng dòng chảy đệm.

(c) và (d): phân tích SPR của DARPin #27 (các axit amin từ 1 đến 159 của SEQ ID NO:1). 250nM của DARPin #27 được dùng cho tế bào dòng chảy có VEGF-A164 của chó được cố định (c) hoặc VEGF-A164b của chó (d) trong 100 giây, tiếp đó rửa bằng dòng chảy đệm.

RU = Đơn vị cộng hưởng.

Fig.4. Sự ức chế hiệu quả VEGF-A 165 của người trong trong mắt thỏ.

Mô hình thỏ bị rò mạch để thể hiện hiệu quả của DARPin trong ức chế VEGF-A165 của người ở mắt so với Lucentis®. Vào ngày 1, PBS, DARPin #30 hoặc Lucentis® được dùng bằng cách tiêm nội nhãn vào một mắt của mỗi thỏ (mắt được điều trị). Vào ngày 4 hoặc ngày 30 cả hai mắt của mỗi thỏ bị kích thích bằng cách tiêm nội nhãn 500ng VEGF-A165 của người. Vất cả các mắt được đánh giá 48 giờ sau khi tiêm VEGF-A165 bằng cách đo hàm lượng floresxein trong thủy tinh thể và võng mạc của tất cả các mắt một giờ sau khi tiêm tĩnh mạch natri floresxein.

R = tỷ lệ của các phép đo floresxein mắt được điều trị / mắt không được điều trị. Các độ lệch chuẩn được thể hiện bằng thanh sai số. 4-PBS = tỷ lệ 4 ngày sau khi tiêm PBS (đối chứng); 4-D = tỷ lệ 4 ngày sau khi tiêm DARPin #30; 30-D = tỷ lệ 30 ngày sau khi tiêm DARPin #30; 4-L = tỷ lệ 4 ngày sau khi tiêm Lucentis®; 30-L = tỷ lệ 30 ngày sau khi tiêm Lucentis®.

Mô tả chi tiết sáng chế

VEGF-A động vật có vú tồn tại dưới hai họ isoform được ghép khác nhau: (i) isoform "VEGF-Axxx" tiền tạo mạch được tạo ra bằng cắt nối ở đầu gần exon 8 và (ii) "VEGF-Axxxb" chống hình thành mạch được tạo ra bằng cắt nối ở đầu xa exon 8. Tốt hơn, nếu vùng gắn kết theo sáng chế là đặc hiệu đối với VEGF-Axxx tiền tạo mạch có nguồn gốc từ chó, thỏ, khỉ hoặc người. Tốt hơn nữa, nếu vùng gắn kết theo sáng chế đặc hiệu đối với VEGF-Axxx tiền tạo mạch có nguồn gốc từ người. Được ưu tiên nhất, vùng gắn kết theo sáng chế là đặc hiệu đối với VEGF-A165 của người.

Thuật ngữ “protein” dùng để chỉ polypeptit, trong đó ít nhất một phần của polypeptit này có hoặc có thể thu được một sự sắp xếp ba chiều xác định bằng cách tạo ra các cấu trúc bậc hai, bậc ba hoặc bậc bốn bên trong và/ hoặc giữa các chuỗi polypeptit của nó. Nếu một protein chứa hai hoặc nhiều polypeptit, các chuỗi polypeptit đơn lẻ này có thể được liên kết không đồng hóa trị hoặc đồng hóa trị, ví dụ bằng liên kết disulfua giữa hai polypeptit. Một phần của protein, mà một cách đơn lẻ có, hoặc có thể thu được một sự sắp xếp ba chiều xác định bằng cách tạo ra các cấu trúc bậc hai hoặc bậc ba, được gọi là "vùng protein ". Vùng protein này đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “tái tổ hợp" như được dùng trong protein tái tổ hợp, vùng protein tái tổ hợp và tương tự, có nghĩa là các polypeptit đã nêu được tạo ra bằng cách dùng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp (ví dụ được tạo ra bằng tổng hợp gen) mã hóa polypeptit có thể được tách dòng vào plasmit biểu hiện trong vi khuẩn (ví dụ pQE30, Qiagen). Khi plasmid biểu hiện tái tổ hợp được tạo ra như vậy được chèn vào vi khuẩn (ví dụ E. coli), vi khuẩn này có thể tạo ra polypeptit được mã hóa bằng ADN tái tổ hợp này. Polypeptit được tạo ra tương ứng được gọi là polypeptit tái tổ hợp.

Thuật ngữ "tag polypeptit" dùng để chỉ trình tự axit amin được gắn với polypeptit/protein, trong đó trình tự axit amin đã nêu là hữu dụng để tinh chế, phát hiện, hoặc tạo đích của polypeptit/protein đã nêu, hoặc trong đó trình tự axit amin đã nêu cải thiện đặc tính hóa lý của polypeptit/protein này, hoặc trong đó trình tự axit amin đã nêu có chức năng của chất tác động. Các tag, gốc và/ hoặc vùng đơn lẻ của protein gắn kết có thể được liên kết với nhau trực tiếp hoặc thông qua các liên kết polypeptit. Các tag polypeptit này đã được biết rõ trong lĩnh vực này và hoàn toàn sẵn có đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ về các tag polypeptit là các trình tự polypeptit nhỏ, ví dụ, các tag hoặc gốc His, myc, FLAG, hoặc Strep như các enzym (ví dụ các enzym như phosphataza kiềm), mà cho phép phát hiện polypeptit/protein đã nêu, hoặc các gốc mà có thể được dùng để tạo đích (như kháng thể hoặc mảnh kháng thể) và/ hoặc làm phân tử tạo hiệu ứng.

Thuật ngữ "liên kết polypeptit" dùng để chỉ trình tự axit amin, mà có khả năng liên kết, ví dụ, hai vùng protein, tag polypeptit và vùng protein, vùng protein và gốc không polypeptit như polyetylen glycol hoặc hai tag trình tự. Các vùng bổ sung, tag, gốc không polypeptit và các liên kết như vậy đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Danh sách ví dụ được đề cập trong bản mô tả của công bố đơn quốc tế số WO 02/20565. Các ví dụ cụ thể về các liên kết như vậy là liên kết glyxin-serin và liên kết prolin-threonin có độ dài thay đổi; Tốt hơn, nếu các liên kết đã nêu có độ dài nằm trong khoảng từ 2 đến 24 axit amin; Tốt hơn nữa, nếu các liên kết đã nêu có độ dài nằm trong khoảng từ 2 đến 16 axit amin.

Trong bản mô tả của sáng chế, thuật ngữ "polypeptit" đề cập đến phân tử bao gồm một hoặc nhiều chuỗi đa, tức là hai hoặc nhiều axit amin được liên kết qua các liên kết peptit. Tốt hơn, nếu polypeptit bao gồm nhiều hơn tám axit amin được liên kết qua các liên kết peptit.

Thuật ngữ "gốc polyme" dùng để chỉ gốc polyme chứa protein hoặc gốc polyme không chứa protein. Tốt hơn, nếu thuật ngữ "gốc polyme chứa protein " là polypeptit mà không tạo ra cấu trúc bậc ba ổn định trong khi không tạo ra nhiều hơn 10% (Tốt hơn, nếu không nhiều hơn 5%; cũng được ưu tiên, không nhiều hơn 2%; thậm chí tốt hơn nữa, nếu không nhiều hơn 1%; và tốt nhất là, lượng không phát hiện được, như được xác định

bằng cách sắc ký theo loại cỡ (size exclusion chromatography-SEC)) của oligome hoặc các kết cụm khi được giữ ở nồng độ khoảng 0,1mM trong PBS ở RT trong một tháng. Các gốc polyme chứa protein này chạy ở trọng lượng phân tử biểu kiến trong SEC mà cao hơn so với trọng lượng phân tử thực tế của chúng khi dùng protein hình cầu làm tiêu chuẩn trọng lượng phân tử cho SEC. Tốt hơn, nếu trọng lượng phân tử biểu kiến của các gốc polyme chứa protein đã nêu được xác định bằng SEC là cao hơn gấp 1,5 lần, 2 lần hoặc 2,5 lần so với trọng lượng phân tử thực tế của chúng được tính từ trình tự axit amin của chúng. Cũng tốt hơn, nếu trọng lượng phân tử biểu kiến của các gốc polyme không chứa protein đã nêu được xác định bằng SEC cao hơn gấp 2 lần, 4 lần hoặc 8 lần so với trọng lượng phân tử thực tế của chúng được tính từ thành phần phân tử của chúng. Tốt hơn, nếu nhiều hơn 50%, 70% hoặc thậm chí 90% axit amin của gốc polyme chứa protein đã nêu không tạo ra các cấu trúc bậc hai ổn định ở nồng độ khoảng 0,1mM trong PBS ở RT như được xác định bằng các phép đo Circular Dichroism (CD). Tốt nhất là, polyme chứa protein đã nêu thể hiện phổ UV CD gần điển hình của dạng cuộn ngẫu nhiên. Các phép phân tích CD này đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cũng được ưu tiên là gốc polyme chứa protein mà bao gồm nhiều hơn 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 hoặc 800 axit amin. Ví dụ về các gốc polyme có protein là XTEN® (nhãn hiệu đã được đăng ký của Amunix; WO 07/103515) polypeptit, hoặc polypeptit chứa các gốc prolin, alanin và serin như được mô tả trong WO 08/155134. Các gốc polyme có protein này có thể được gắn kết đồng hóa trị với, ví dụ, vùng gắn kết theo sáng chế bằng sự tạo ra polypeptit dung hợp di truyền bằng cách dùng các kỹ thuật tách dòng ADN, tiếp đó là sự biểu hiện và tinh chế tiêu chuẩn của chúng. Ví dụ về protein gắn kết chứa vùng lặp lại gắn kết VEGF-Axxx và gốc polyme chứa protein này được thể hiện trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:4. Các vị trí axit amin từ 1 đến 159 của SEQ ID NO:1 tương ứng với vùng lặp lại này và vị trị axit amin 161 đến 1025 của SEQ ID NO:1 tương ứng với gốc polyme chứa protein. Các vị trí axit amin từ 1 đến 126 của SEQ ID NO:4 tương ứng với vùng lặp lại này và các vị trí axit amin 131 đến 640 của SEQ ID NO:4 tương ứng với gốc polyme chứa protein.

Gốc polyme theo sáng chế có thể thay đổi rộng về trọng lượng phân tử (tức là từ khoảng 1kDa đến khoảng 150 kDa). Tốt hơn, nếu gốc polyme này có trọng lượng phân tử ít nhất là 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70 hoặc 100 kDa.

Tốt hơn, nếu gốc polyme đã nêu được gắn kết bằng liên kết polypeptit với vùng gắn kết. Ví dụ về các liên kết polypeptit này là các axit amin từ 1 đến 8 của SEQ ID NO:8 và SEQ ID NO:9.

Ví dụ về các gốc polyme không chứa protein là tinh bột hydroxyetyl (hydroxyetyl starch - HES), polyetylen glycol (PEG), polypropylen glycol, hoặc polyoxyalkylen. Thuật ngữ "được PEGyl hóa" có nghĩa là gốc PEG được gắn kết đồng hóa trị với, ví dụ, polypeptit theo sáng chế. Ví dụ về các protein lặp lại chứa liên kết polypeptit giữa vùng lặp lại và gốc Cys ở đầu tận cùng C hữu dụng để gắn kết gốc polyme không chứa protein là SEQ ID NO:2, 3, 5, 6 và 7.

Theo phương án cụ thể, gốc PEG hoặc polyme không chứa protein bất kỳ khác có thể, ví dụ, được tạo cặp với xystein thiol qua liên kết maleimit bằng xystein được tạo cặp qua liên kết peptit với đầu tận cùng N- hoặc C- của vùng gắn kết như đã được mô tả ở đây (ví dụ SEQ ID NO:3).

Thuật ngữ "protein gắn kết" dùng để chỉ protein chứa một hoặc nhiều vùng gắn kết và một hoặc nhiều gốc polyme như được giải thích thêm sau đây. Tốt hơn, nếu protein gắn kết đã nêu chứa đến bốn vùng gắn kết. Tốt hơn nữa, nếu protein gắn kết đã nêu chứa đến hai vùng gắn kết. Tốt nhất là, protein gắn kết đã nêu chỉ chứa một vùng gắn kết. Ngoài ra, protein gắn kết bất kỳ này có thể chứa vùng protein bổ sung mà không phải là, gốc multime hóa, tag polypeptit, liên kết polypeptit và/ hoặc gốc Cys đơn lẻ. Ví dụ về các gốc multime hóa là vùng biến đổi trên chuỗi nặng của kháng thể mà ghép đôi để tạo ra vùng Fc của kháng thể chức năng, và khóa kéo leuxin hoặc polypeptit chứa thiol tự do mà tạo ra cầu nối disulfua liên phân tử giữa hai polypeptit này. Gốc Cys đơn lẻ có thể được dùng để kết hợp các gốc khác với polypeptit này, ví dụ, bằng cách dùng hóa maleimit đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Tốt hơn, nếu protein gắn kết đã nêu chứa đến bốn gốc polyme. Tốt hơn nữa, nếu protein gắn kết đã nêu chứa đến hai gốc polyme. Tốt nhất là, protein gắn kết đã nêu chỉ một gốc polyme.

Cũng tốt hơn, nếu protein gắn kết đã nêu có trọng lượng phân tử biểu kiến ít nhất là 70, 100, 200, 300, 500 hoặc 800kDa khi được phân tích ở nồng độ 0,1mM trong PBS ở RT bằng SEC dùng protein hình cầu dưới dạng chuẩn trọng lượng phân tử.

Thuật ngữ "vùng gắn kết" có nghĩa là vùng protein có cùng "nếp gấp (sắp xếp ba chiều) dưới dạng khung protein và có đặc tính được xác định trước, như được định nghĩa sau đây. Vùng gắn kết này có thể thu được bằng các kỹ thuật thao tác protein tổ hợp hợp lý hoặc phổ biến nhất, các kiến thức đã biết trong lĩnh vực này (Skerra, 2000, loc. cit; Binz et al., 2005, loc. cit). Ví dụ, vùng gắn kết có đặc tính đã được xác định trước có thể thu được bằng phương pháp bao gồm các bước (a) tạo ra một bộ sưu tập đa dạng vùng protein có cùng nếp gấp như khung protein như được định nghĩa thêm sau đây; và (b) sàng lọc bộ sưu tập đa dạng đã nêu và/ hoặc lựa chọn từ bộ sưu tập đa dạng đã nêu để thu được ít nhất một vùng protein có đặc tính được xác định trước đã nêu. Bộ sưu tập đa dạng của vùng protein này có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp theo hệ thống sàng lọc và/ hoặc lựa chọn được dùng, và có thể bao gồm việc dùng các phương pháp đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như biểu lộ trên thực khuẩn thể hoặc biểu lộ trên ribosom.

Thuật ngữ "khung protein" có nghĩa là protein có các vùng bề mặt được bộc lộ trong đó việc lồng, thay thế hoặc mất axit amin là khá cao. Ví dụ về khung protein mà có thể được dùng để tạo ra các vùng gắn kết theo sáng chế là kháng thể hoặc mảnh kháng thể như các mảnh Fv hoặc Fab chuỗi đơn, protein A từ Staphylococcus aureus, protein gắn kết bilin từ Pieris brassicae hoặc các lipocalin khác, các protein lặp lại ankyrin hoặc các protein lặp lại khác, và fibronectin của người. Khung protein đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này (Binz et al., 2005, loc. cit.; Binz et al., 2004, loc. cit.).

Thuật ngữ "đặc tính được xác định trước" dùng để chỉ đặc tính như gắn kết với đích, phong bế đích, hoạt hóa phản ứng qua trung gian đích, hoạt tính enzyme, và các đặc tính liên quan khác. Tùy thuộc vào loại đặc tính mong muốn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định được dạng và các bước cần thiết để thực hiện việc sàng lọc và/ hoặc lựa chọn vùng gắn kết có đặc tính mong muốn. Tốt hơn, nếu đặc tính được xác định trước đã nêu là gắn kết với đích.

Tốt hơn, nếu protein gắn kết theo sáng chế không phải là kháng thể hoặc mảnh kháng thể, như mảnh Fab hoặc scFv. Kháng thể và mảnh kháng thể là đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Cũng tốt hơn, nếu vùng gắn kết theo sáng chế không chứa gấp khúc của kháng thể khi có trong kháng thể và/ hoặc vùng the fibronectin loại III. Gấp khúc kháng thể là gấp khúc protein all-β thông thường bao gồm kẹp 2 lớp của khoảng 7 sợi β đối song song được sắp xếp trong hai mảnh β. Các gấp khúc của kháng thể đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, các vùng gắn kết chứa gấp khúc của kháng thể đã được mô tả trong WO 07/080392 hoặc WO 08/097497.

Tốt hơn nữa, nếu vùng gắn kết theo sáng chế không chứa vùng tương tự kháng thể như được tìm thấy trong VEGFR-1 hoặc VEGFR-2. Các vùng gắn kết này đã được mô tả trong WO 00/075319.

Vùng gắn kết được ưu tiên là vùng gắn kết có hiệu quả chống hình thành mạch. Hiệu quả chống hình thành mạch của vùng gắn kết có thể được xác định bằng các thử nghiệm đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như thử nghiệm mọc mầm của vật dạng cầu HUVEC được mô tả trong ví dụ 2.

Được ưu tiên hơn là vùng gắn kết chứa từ 70 đến 300 axit amin, cụ thể là từ 100 đến 200 axit amin.

Được ưu tiên hơn là vùng gắn kết không có gốc Cys tự do. Gốc Cys tự do không có liên quan đến sự tạo ra liên kết disulfua. Thậm chí được ưu tiên hơn là vùng gắn kết không có gốc Cys bất kỳ.

Vùng gắn kết được ưu tiên theo sáng chế là vùng lặp lại hoặc vùng lặp lại được tạo ra, tốt hơn là như được mô tả trong WO 02/20565.

Vùng gắn kết được đặc biệt ưu tiên là vùng lặp ankyrin được tạo ra (Binz, H. K. et al., 2004, loc. cit), tốt hơn là như được mô tả trong WO 02/20565. Ví dụ về các vùng lặp lại ankyrin được tạo ra được thể hiện trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Các định nghĩa sau đây đối với các protein lặp lại dựa vào các định nghĩa trong công bố đơn sáng chế WO 02/20565. Công bố đơn quốc tế số WO 02/20565 còn mô tả chung chung về các đặc tính, kỹ thuật và ứng dụng của protein lặp lại.

Thuật ngữ "các protein lặp lại" dùng để chỉ protein chứa một hoặc nhiều vùng lặp lại. Tốt hơn, nếu mỗi protein lặp lại trong số các protein lặp lại đã nêu chứa đến bốn vùng lặp lại. Tốt hơn nữa, nếu mỗi protein lặp lại trong số các protein lặp lại đã nêu chứa đến hai vùng lặp lại. Tốt nhất là, mỗi protein lặp lại trong số các protein lặp lại chỉ chứa một vùng lặp lại. Ngoài ra, protein lặp lại đã nêu có thể chứa vùng protein không lặp lại bổ sung, tag polypeptit và/ hoặc liên kết polypeptit.

Thuật ngữ "vùng lặp lại" dùng để chỉ vùng protein chứa hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại liên tục dưới dạng đơn vị cấu trúc, trong đó các đơn vị cấu trúc đã nêu có cùng gấp khúc, và xếp thành chồng chặt để tạo ra, ví dụ, cấu trúc siêu xoắn có một lõi kỵ nước nối.

Thuật ngữ "protein lặp lại được tạo ra" và "vùng lặp lại được tạo ra " lần lượt dùng để chỉ protein lặp lại hoặc vùng lặp lại, thu được như là kết quả của quy trình theo sáng chế được giải thích trong công bố đơn số WO 02/20565. Các protein lặp lại được tạo ra và các vùng lặp lại được tạo ra là dạng tổng hợp và không phải có ngoài tự nhiên. Chúng lần lượt là các protein hoặc vùng nhân tạo, thu được bằng sự biểu hiện axit nucleic được tạo ra tương ứng.

Tốt hơn, nếu sự biểu hiện này được tiến hành ở các tế bào nhân thật hoặc các tế bào nhân xơ, như tế bào vi khuẩn, hoặc bằng cách dùng hệ biểu hiện in vitro không phải tế bào.

Thuật ngữ "đơn vị cấu trúc" dùng để chỉ một phần theo trật tự cục bộ của polypeptit, được tạo ra bằng sự tương tác ba chiều giữa hai hoặc nhiều mảnh của cấu trúc bậc hai mà gần nhau dọc theo chuỗi polypeptit. Đơn vị cấu trúc này có môtip cấu trúc. Thuật ngữ "môtip cấu trúc" dùng để chỉ sự sắp xếp ba chiều của các nhân tố cấu trúc bậc hai có trong ít nhất một đơn vị cấu trúc. Các môtip cấu trúc đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, các đơn vị cấu trúc không có khả năng thu được sự sắp xếp ba chiều xác định; sự sắp xếp liên tục của chúng, ví dụ dưới

dạng các đơn vị lặp lại trong vùng lặp lại, dẫn đến sự làm cho ổn định lẫn nhau của các đơn vị gần kề dẫn đến cấu trúc siêu xoắn.

Thuật ngữ "đơn vị lặp lại" dùng để chỉ các trình tự axit amin chứa môtip trình tự lặp lại của một hoặc nhiều protein lặp lại có ngoài tự nhiên, trong đó "các đơn vị lặp lại" đã nêu được tìm thấy trong nhiều bản sao, và biểu hiện cấu trúc liên kết gấp khúc xác định chung đối với tất cả các môtip đã nêu xác định gấp khúc của protein. Ví dụ về các đơn vị lặp lại này là các đơn vị lặp lại armadilo, đơn vị lặp lại giàu leuxin, đơn vị lặp lại ankyrin, đơn vị lặp lại tetratricopeptit, các đơn vị lặp lại HEAT, và các đơn vị lặp lại biến thể giàu leuxin. Các protein có ngoài tự nhiên chứa hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại này được gọi là " các protein lặp lại ngoài tự nhiên". Các trình tự axit amin của các đơn vị lặp lại riêng lẻ của protein lặp lại có thể có số lượng đáng kể các đột biến, thay thế, thêm và/ hoặc mất khi được so sánh với nhau, trong khi hầu như vẫn giữ mẫu, hoặc môtip chung của các đơn vị lặp lại.

Tốt hơn, nếu các đơn vị lặp lại được dùng để giảm môtip trình tự lặp lại là các đơn vị lặp lại tương đồng thu được từ các vùng lặp lại được chọn trên đích, ví dụ như được mô tả trong Ví dụ 1 và có cùng tính đặc hiệu đích.

Thuật ngữ "môtip trình tự lặp lại" dùng để chỉ trình tự axit amin, mà được làm giảm từ một hoặc nhiều đơn vị lặp lại. Tốt hơn, nếu các đơn vị lăp lại đã nêu là từ các vùng lặp lại có tính đặc hiệu gắn kết đối với cùng đích.

Thuật ngữ "cấu trúc liên kết gấp khúc" dùng để chỉ cấu trúc bậc ba của đơn vị lặp lại đã nêu. Cấu trúc liên kết gấp khúc này sẽ được xác định bằng các dải axit amin tạo ra các polypeptit thẳng hoặc các vùng cuộn, hoặc kết hợp bất kỳ của hình xoắn α, mảnh β và/ hoặc polypeptit thẳng/vùng cuộn.

Thuật ngữ "liên tục" dùng để chỉ sự sắp xếp, trong đó các đơn vị lặp lại được sắp xếp lần lượt. Trong các protein lặp lại được tạo ra, có ít nhất 2 đơn vị lặp lại, thường khoảng 2 đến 6, cụ thể là ít nhất khoảng 6, thường là 20 hoặc nhiều hơn đơn vi lặp lại. Trong đa số trường hợp, các đơn vị lặp lại sẽ biểu hiện mức độ cao tính tương đồng trình tự (cùng các gốc axit amin ở các vị trí tương ứng) hoặc sự tương tự về trình tự (các gốc axit amin khác nhau, nhưng có đặc tính hóa lý tương tự), và một số trong số các gốc axit

amin này có thể là các gốc quan trọng được bảo tồn mạnh trong các đơn vị lặp lại khác nhau được tìm thấy trong các protein có ngoài tự nhiên. Tuy nhiên, mức độ cao sự thay đổi về trình tự bởi sự lồng và/ hoặc mất, và/ hoặc sự thay thế axit amin giữa các đơn vị lặp lại khác nhau được tìm thấy trong các protein xuất hiện ngoài tự nhiên sẽ có thể xảy ra miễn là cấu trúc liên kết gấp khúc thông thường được duy trì.

Các phương pháp xác định trực tiếp cấu trúc liên kết gấp khúc của các protein lặp lại bằng các biện pháp hóa lý như phép khảo sát tinh thể bằng tia X, quang phổ học NMR hoặc CD, đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp định dạng và xác định các đơn vị lặp lại hoặc các môtip trình tự lặp lại hoặc xác định họ các protein liên quan chứa các đơn vị lặp lại hoặc môtip, như tra cứu tương đồng (BLAST etc.), đã tồn tại trong một thời gian dài trong lĩnh vực sinh tin, và đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Bước tinh chế môtip trình tự lặp lại ban đầu có thể bao gồm quy trình lặp lại.

Thuật ngữ "đơn vị lặp lại" dùng để chỉ các trình tự axit amin lặp lại của các vùng lặp lại được tạo ra, mà ban đầu bắt nguồn từ các đơn vị lặp lại của các protein lặp lại có ngoài tự nhiên. Mỗi đơn vị lặp lại được chứa trong vùng lặp lại bắt nguồn từ một hoặc nhiều đơn vị lặp lại của họ hoặc dưới họ các protein lặp lại có ngoài tự nhiên, ví dụ họ các protein lặp lại armadillo hoặc các protein lặp lại ankyrin.

Thuật ngữ "đơn vị lặp lại" có thể chứa các vị trí với các gốc axit có mặt trong tất cả các bản sao của các đơn vị lăp lại tương ứng ("các vị trí cố định") và các vị trí có các gốc axit amin khác nhau hoặc "ngẫu nhiên" ("các vị trí ngẫu nhiên").

Thuật ngữ "mođun phủ" dùng để chỉ polypeptit được ngưng tụ với mođun lặp lại đầu tận cùng N- hoặc C- của vùng lặp lại, trong đó mođun phủ đã nêu tạo ra các sự tương tác bậc ba chặt với mođun lặp lại đã nêu qua đó tạo ra mũ mà bảo vệ lõi kỵ nước của mođun lăp lại đã nêu ở mặt không liên hệ với mođun lặp lại liên tục từ dung môi. Mođun đầu tận cùng N- và/ hoặc C- đã nêu có thể là, hoặc có thể có nguồn gốc từ, đơn vị mũ hoặc vùng khác được tìm thấy trong protein lặp lại có ngoài tự nhiên liền kề với đơn vị lặp lại. Thuật ngữ "đơn vị mũ" dùng để chỉ polypeptit uốn nếp có ngoài tự nhiên, trong đó polypeptit đã nêu xác định đơn vị cấu trúc cụ thể mà được ngưng tụ đầu tận cùng N- hoặc C- với đơn vị lặp lại, trong đó polypeptit đã nêu tạo ra các sự tương tác bậc ba chặt

với đơn vị lặp lại đã nêu nhờ đó tạo ra mũ mà bảo vệ lõi kỵ nước của đơn vị lăp lại đã nêu ở một mặt khỏi dung môi này. Các đơn vị mũ này có sự tương tự về trình tự với môtip của trình tự lặp lại đã nêu. Các mođun phủ và các lặp lại mũ đã được mô tả trong WO 02/020565. Ví dụ, mođun phủ đầu tận cùng N- của SEQ ID NO:2 được mã hóa bằng các axit amin từ vị trí 1 đến 32. Cũng được ưu tiên là mođun phủ đầu tận cùng N- có gốc glyxin hoặc aspartat ở vị trí 5.

Thuật ngữ "đích" dùng để chỉ phân tử đơn lẻ như phân tử axit nucleic, polypeptit hoặc protein, hydratcacbon, hoặc phân tử có ngoài tự nhiên bất kỳ khác, bao gồm phần bất kỳ của phân tử đơn lẻ này, hoặc phức hợp của hai hoặc nhiều phân tử này. Đích này có thể là toàn bộ tế bào hoặc mẫu mô, hoặc nó có thể là phân tử hoặc gốc bất kỳ không có ngoài tự nhiên. Tốt hơn, nếu đích này là polypeptit có ngoài tự nhiên hoặc không có ngoài tự nhiên hoặc polypeptit chứa các biến thể hóa học, ví dụ được cải biến bằng sự phosphoryl hóa, axetyl hóa, hoặc metyl hóa có ngoài tự nhiên hoặc không có ngoài tự nhiên. Trong ứng dụng cụ thể của sáng chế, đích là VEGF-Axxx hoặc VEGFR-2.

Thuật ngữ "trình tự liên ứng" dùng để chỉ trình tự axit amin, trong đó trình tự liên ứng đã nêu thu được bằng cách sắp xếp thành hàng cấu trúc và/ hoặc trình tự của nhiều đơn vị lặp lại. Việc dùng hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại được sắp xếp thành hàng cấu trúc và/ hoặc trình tự, và cho phép đối với các khoảng trống trong cách sắp xếp thành hàng, có thể xác định gốc axit amin thường xuyên nhất ở mỗi vị trí. Trình tự liên ứng chính là trình tự mà chứa các axit amin hay được mô tả nhất ở mỗi vị trí. Trong trường hợp mà hai hoặc nhiều axit amin được mô tả trên mức trung bình vị trí đơn lẻ, trình tự liên ứng có thể bao gồm một tập hợp con của các axit amin đó. Hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại đã nêu có thể thu được từ các đơn vị lặp lại chứa trong protein lặp lại đơn lẻ, hoặc từ hai hoặc nhiều protein lặp lại khác nhau.

Các trình tự liên ứng và phương pháp xác định chúng đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

"Gốc axit amin liên ứng" là axit amin được tìm thấy ở vị trí nhất định trong trình tự liên ứng. Nếu hai hoặc nhiều, ví dụ ba, bốn hoặc năm gốc axit amin được tìm thấy có xác suất tương tự trong hai hoặc nhiều đơn vị lặp lại, axit amin liên ứng này có thể là một

trong số các axi amin hay được tìm thấy nhất hoặc hỗn hợp của hai hoặc nhiều gốc axit amin đã nêu.

Được ưu tiên nữa là protein gắn kết hoặc vùng gắn kết không có ngoài tự nhiên.

Thuật ngữ "không có ngoài tự nhiên" có nghĩa là tổng hợp hoặc không có nguồn gốc từ tự nhiên, cụ thể hơn, thuật ngữ này có nghĩa là có nguồn gốc từ bàn tay con người. Thuật ngữ "protein gắn kết không có ngoài tự nhiên" hoặc " vùng gắn kết không có ngoài tự nhiên" có nghĩa là protein gắn kết đã nêu hoặc vùng gắn kết đã nêu là tổng hợp (tức là được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học từ các axit amin) hoặc tái tổ hợp và không có nguồn gốc ngoài tự nhiên. "Protein gắn kết không có ngoài tự nhiên " hoặc "vùng gắn kết không có ngoài tự nhiên" lần lượt là protein hoặc vùng nhân tạo, thu được bằng sự biểu hiện của axit nucleic được tạo ra tương ứng. Tốt hơn, nếu sự biểu hiện này được tiến hành trong các tế bào nhận thật hoặc tế bào vi khuẩn, hoặc bằng cách dùng hệ biểu hiện in vitro không chứa tế bào. Ngoài ra, thuật ngữ này có nghĩa là trình tự của protein gắn kết đã nêu hoặc vùng gắn kết đã nêu không có dưới dạng trình tự không phải là đầu vào trình tự không nhân tạo trong dữ liệu trình tự, ví dụ trong GenBank, EMBL-Bank hoặc Swiss-Prot. Các dữ liệu này và các dữ liệu trình tự tương tự khác đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Vùng gắn kết có khả năng ức chế sự gắn kết của VEGF-Axxx với VEGFR-2 hoặc bằng cách gắn kết với VEGF-Axxx hoặc bằng cách gắn kết với VEGFR-2 theo cách mà hằng số phân ly biểu kiến (K_d) nằm trong khoảng từ VEGF-Axxx đến VEGFR-2 tăng hơn 10^2 lần, tốt hơn là hơn 10^3 lần, tốt hơn nữa là hơn 10^4 lần, tốt hơn nữa là 10^5 lần, và tốt nhất là hơn 10^6 lần. Tốt hơn, nếu K_d đối với sự tương tác của vùng gắn kết với VEGF-Axxx hoặc VEGFR-2 thấp hơn 10^{-7}M, tốt hơn là thấp hơn 10^{-8}M, tốt hơn nữa là thấp hơn 10^{-9}M, tốt hơn nữa là thấp hơn 10^{-10}M, và tốt nhất là thấp hơn 10^{-11}M. Các phương pháp để xác định hằng số phân ly về sự tương tác protein-protein, như các kỹ thuật dựa vào cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Vùng gắn kết được ưu tiên gắn kết VEGF-Axxx. Thậm chí được ưu tiên hơn là vùng gắn kết mà gắn kết VEGF-A165 của người.

Thuật ngữ "PBS" có nghĩa là dung dịch nước đệm phosphat chứa NaCl 137mM, phosphat 10mM và KCl 2,7mM và có độ pH 7,4.

Được ưu tiên là protein gắn kết và/ hoặc vùng gắn kết mà không làm mất đi cấu trúc ba chiều nguyên bản của nó sau khi ủ trong PBS chứa dithiothreitol 100mM (DTT) trong 1 hoặc 10 giờ ở 37°C.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến protein gắn kết chứa vùng gắn kết ức chế sự gắn kết của VEGF-Axxx với VEGFR-2 và có nhiệt độ biến tính nóng chảy được chỉ ra hoặc được ưu tiên và các đặc tính không kết tụ như được định nghĩa ở trên, trong đó protein gắn kết đã nêu ức chế sự mọc mầm của vật dạng cầu HUVEC có trị số IC_{50} nhỏ hơn 100nM.

Thuật ngữ "HUVEC" có nghĩa là tế bào biểu mô tĩnh mạch rốn của người, mà có thể được tách từ tĩnh mạch rốn của người bình thường và đáp ứng đối với sự kích thích của VEGF-A.

Các thử nghiệm để đo độ mọc mầm của vật dạng cầu HUVEC, như được mô tả trong Ví dụ 2, đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Trị số IC_{50} là nồng độ của chất, như protein gắn kết hoặc vùng gắn kết, mà đòi hỏi đối với sự ức chế 50% in vitro của thông số được xác định trong thử nghiệm, như độ mọc mầm của vật dạng cầu HUVEC. Trị số IC_{50} có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (Korff T. và Augustin H.G., J. Cell Biol. 143(5), 1341 -52, 1998).

Được ưu tiên là protein gắn kết và/ hoặc vùng gắn kết mà ức chế sự mọc mầm của vật dạng cầu HUVEC bằng trị số IC_{50} thấp hơn 10nM, tốt hơn là thấp hơn 1nM, tốt hơn nữa là thấp hơn 0,1nM, và tốt nhất là thấp hơn 0,05nM.

Được ưu tiên hơn là protein gắn kết monome và/ hoặc vùng gắn kết mà ức chế sự mọc mầm của vật dạng cầu HUVEC với trị số IC_{50} thấp hơn trị số IC_{50} tương ứng của ranibizumab (Lucentis®, nhãn hiệu đã được đăng ký của Genentech), bevacizumab (Avastin®, nhãn hiệu đã được đăng ký của Genentech), aflibercept (VEGF Trap®, nhãn

hiệu đã được đăng ký của Regeneron), hoặc pegaptanib (Macugen®, nhãn hiệu đã được đăng ký của Pfizer).

K_d đối với sự tương tác của vùng gắn kết được ưu tiên với VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF hoặc PDGF lớn hơn 1nM, tốt hơn là lớn hơn 10nM, tốt hơn nữa là lớn hơn 10^2 nM, thậm chí tốt hơn nữa là lớn hơn 10^3 nM, và tốt nhất là lơn hơn 10^4 nM.

Tốt hơn, nếu VEGF-Axxx là VEGF-A 164 của chó hoặc VEGF-A 165 của người hoặc VEGF-A165 của người, và VEGF-Axxxb là VEGF-A 164b của chó hoặc VEGF-A165b của khỉ hoặc VEGF-A165b của người.

Phương án được ưu tiên khác là protein gắn kết tái tổ hợp chứa vùng gắn kết, trong đó vùng gắn kết đã nêu ức chế sự gắn kết của VEGF-Axxx với VEGFR-2 và trong đó vùng gắn kết đã nêu là vùng lặp lại hoặc vùng lặp lại được tạo ra. Vùng lặp lại như vậy có thể chứa một, hai, ba hoặc nhiều hơn các mođun lặp lại ở bên trong mà sẽ tham gia vào gắn kết với VEGF-Axxx. Tốt hơn, nếu vùng lặp lại như vậy chứa mođun phủ tận cùng N, hai đến bốn mođun lặp lại bên trong, và mođun phủ ở đầu tận cùng C. Tốt hơn, nếu vùng gắn kết đã nêu là vùng lặp lại ankyrin hoặc vùng lặp lại ankyrin được tạo ra.

Protein gắn kết tái tổ hợp được ưu tiên chứa vùng gắn kết như đã được mô tả ở đây, kết hợp với gốc polyetylen glycol (PEG), tốt hơn là trong đó gốc PEG đã nêu được ghép cặp với gốc Cys đơn lẻ của vùng gắn kết đã nêu. Tốt hơn, nếu gốc Cys đã nêu được thể hiện về mặt di truyền ở đầu tận cùng C của vùng gắn kết đã nêu. Tiếp đó, gốc PEG có thể được tạo cặp bằng biện pháp hóa học, ví dụ bằng cách dùng hóa học maleimit đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ về protein gắn kết chứa gốc PEG được kết hợp với gốc Cys đơn lẻ được xác định trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Phương án được ưu tiên của sáng chế đề xuất protein gắn kết tái tổ hợp chứa vùng gắn kết như đã được mô tả ở đây, trong đó vùng gắn kết đã nêu được kết hợp ở đầu tận cùng C của nó qua liên kết peptit gắn với SEQ ID NO:8, mà được kết hợp ở thiol xystein ở đầu tận cùng C với PEG cặp đôi maleimit, như α[3-(3-maleimido-1 - oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen (NOF, Sunbright ME-200MA (20kD) hoặc Sunbright ME-400MA (40kD)). Theo một phương án α-[3-(3-maleimido-1 -

oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen có trọng lượng phân tử ít nhất là khoảng 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, hoặc 100 kD. Theo một số phương án, α-[3-(3-maleimido-1 -oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen có trọng lượng phân tử ít nhất là khoảng 20 hoặc ít nhất khoảng 40 kD.

Phương án được ưu tiên khác là protein gắn kết tái tổ hợp như được xác định ở trên chứa ít nhất một vùng lặp lại có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx, trong đó vùng lặp lại đã nêu cạnh tranh để gắn kết với VEGF-Axxx với vùng lặp lại được chọn từ nhóm trong số các vùng lặp lại của SEQ ID NO:1 đến 7. Tốt hơn, nếu vùng lặp lại đã nêu cạnh tranh để gắn kết với VEGF-Axxx bằng vùng lặp lại của SEQ ID NO:1 hoặc 3. Tốt hơn nữa, nếu vùng lặp lại đã nêu cạnh tranh để gắn kết với VEGF-Axxx với vùng lặp lại của SEQ ID NO:3.

Thuật ngữ "cạnh tranh để gắn kết" có nghĩa là sự không có khả năng của hai vùng gắn kết khác nhau theo sáng chế để gắn kết đồng thời với cùng đích, trong khi cả hai có khả năng gắn kết với cùng đích một cách đơn lẻ. Do đó, hai vùng vùng gắn kết này cạnh tranh để gắn kết với đích đã nêu. Các phương pháp, như các phép đo ELISA cạnh tranh hoặc SPR cạnh tranh (ví dụ bằng cách dùng dụng cụ Proteon của hãng BioRad), để xác định liệu hai vùng gắn kết cạnh tranh để gắn kết với đích hay không đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Protein gắn kết tái tổ hợp mà cạnh tranh để gắn kết với VEGF-Axxx với protein lặp lại được chọn có thể được xác định bằng các phương pháp đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym cạnh tranh (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA).

Phương pháp được ưu tiên khác là protein gắn kết tái tổ hợp chứa vùng lặp lại có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx được chọn từ nhóm bao gồm các vùng lặp lại của SEQ ID NO:1 đến 7. Tốt hơn, nếu vùng lặp lại đã nêu được chọn từ các vùng lặp lại của SEQ ID NO:2 hoặc 3. Tốt hơn nữa, nếu vùng lặp lại đã nêu là vùng lặp lại của SEQ ID NO:3.

Một hoặc nhiều gốc polyetylen glycol có thể được gắn ở các vị trí khác nhau trong protein gắn kết, và gắn kết này có thể đạt được bằng cách cho phản ứng với amin, thiol

hoặc nhóm phản ứng thích hợp khác. Gắn kết của các gốc polyetylen glycol (PEGyl hóa) có thể được định hướng điểm, trong đó nhóm phản ứng thích hợp được đưa vào protein để tạo ra điểm trong đó sự PEGyl hóa xuất hiện một cách ưu tiên, hoặc có mặt ban đầu trong protein gắn kết. Nhóm thiol này có thể có mặt ở gốc xystein; và nhóm amin này có thể là, ví dụ, amin bậc một được tìm thấy ở đầu tận cùng N của nhóm polypeptit hoặc nhóm amin có mặt trong chuỗi bên của axit amin, như lysin hoặc arginin. Theo phương án được ưu tiên, protein gắn kết được cải biến để có gốc xystein ở vị trí mong muốn, cho phép sự PEGyl hóa định hướng điểm trên xystein, ví dụ bằng cách cho phản ứng với dẫn xuất polyetylen glycol có chức năng maleimit. Gốc polyetylen glycol có thể thay đổi rộng về trọng lượng phân tử (tức là từ khoảng 1kDa đến khoảng 100kDa) và có thể là phân nhánh hoặc thẳng. Tốt hơn, nếu polyetylen glycol này có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 50kDa, tốt hơn là khoảng 10 đến khoảng 40kDa, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 15 đến khoảng 30kDa, và tốt nhất là khoảng 20kDa.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic mã hóa protein gắn kết tái tổ hợp cụ thể. Ngoài ra, vectơ chứa phân tử axit nucleic đã nêu được cân nhắc.

Ngoài ra, dược phẩm chứa một hoặc nhiều protein gắn kết nêu trên, cụ thể là protein gắn kết tái tổ hợp chứa các vùng lặp lại, hoặc các phân tử axit nucleic mã hóa protein gắn kết tái tổ hợp cụ thể, và tùy ý chất mang và/ hoặc chất pha loãng dược dụng được cân nhắc.

Chất mang và/ hoặc chất pha loãng dược dụng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này và được giải thích cụ thể hơn sau đây. Thậm chí ngoài ra, chế phẩm chẩn đoán chứa một hoặc nhiều protein gắn kết tái tổ hợp nêu trên, cụ thể là protein gắn kết chứa các vùng lặp lại được cân nhắc.

Protein gắn kết theo sáng chế ức chế hoặc ngăn chặn sự hình thành mạch bệnh lý do VEGF gây ra, sự rò mạch (chứng phù), tăng áp phổi, sự tạo khối u và/ hoặc rối loạn do viêm. Với "sự ức chế" người ta hiểu rằng protein tái tổ hợp này ngăn chặn các bệnh lý nêu trên đến một mức độ nhất định, ví dụ đến 10% hoặc 20%, tốt hơn nữa là 50%, cụ thể là 70%, 80% hoặc 90%, hoặc thậm chí 95%.

Thuật ngữ "phù" có nghĩa là tình trạng do rò mạch gây ra. Sự giãn và tính thấm tăng trong lúc viêm có thể là cơ chế bệnh lý nổi bật. Ví dụ, phù dẫn đến sự nặng thêm của chứng nhồi máu sau khi đột quỵ và có thể gây ra hội chứng tăng huyết áp trong sọ đe dọa đến tính mạng ở bệnh nhân ung thư. Ngoài ra, sự tràn ra của protein huyết tương giúp làm lan tràn di căn của các khối u bị che khuất, và sự tắc nghẽn đường hô hấp có thể gây ra các cơn hen chết người. Sự rò mạch tăng mà xuất hiện trong quá trình viêm có thể dẫn đến rối loạn hô hấp, cổ trướng, xơ hóa màng bụng (peritoneal sclerosis) (ở bệnh nhân lọc máu), sự tạo dính (phẫu thuật bụng) và sự lan tràn di căn.

Thuật ngữ "sự hình thành mạch" có nghĩa là quy trình cơ bản mà qua đó các mạch máu mới được tạo ra. Giai đoạn tạo mạch sơ cấp ở người diễn ra trong ba tháng đầu tiên của sự phát triển phôi thai nhưng sự hình thành mạch cũng xuất hiện dưới dạng quá trình sinh lý bình thường trong giai đoạn tăng trưởng mô, như sự tăng cơ hoặc chất béo và trong chu kỳ kinh nguyệt và mang thai.

Thuật ngữ "sự hình thành mạch bệnh lý" dùng để chỉ sự tạo ra và sự tăng trưởng của các mạch máu trong sự duy trì và sự tiến triển của nhiều tình trạng bệnh. Ví dụ cụ thể về sự hình thành mạch bệnh lý được tìm thấy trong các mạch máu (chứng vữa xơ động mạch, u mạch, u nội mô mạch máu), xương và khớp (viêm khớp dạng thấp, viêm màng hoạt dịch, sự suy giảm xương và sụn, viêm tủy xương, sự tăng trưởng màng máu mắt hột (pannus growth), sự tạo chồi xương, khối u và di căn), da (mụn cóc, u hạt sinh mủ, sự mọc lông, xacôm Kaposi, sẹo, phù do dị ứng, khối u), gan, thận, phổi, tai và các biểu mô khác (các quá trình viêm nhiễm bao gồm viêm gan, viêm thận tiểu cầu, viêm phổi; và hen, polyp mũi, viêm tai, rối loạn cấy ghép, rối loạn tái sinh gan, khối u và di căn), tử cung, buồng trứng và nhau (chảy máu tử cung do rối loạn cơ năng do dụng cụ tránh thai bên trong tử cung, sự tạo nang noãn, chứng kích thích quá mức buồng trứng, bệnh lạc nội mạc tử cung, khối u), não, thần kinh và mắt (bệnh võng mạc trẻ đẻ non, bệnh võng mạc tiểu đường, các rối loạn về màng mạch và các rối loạn về mắt khác, hoại tử, khối u và di căn), tim và cơ xương do quá tải trong công việc, mô mỡ (béo phì), các cơ quan nội tiết (viêm tuyến giáp, tuyến giáp to ra, rối loạn cấy ghép tụy), sự tạo huyết (hội chứng Kaposi trong AIDS), ung thư máu (bệnh bạch cầu), và các mạch bạch huyết (di căn khối u, rối loạn tăng sinh lympho).

Thuật ngữ "bệnh thiếu máu võng mạc" có nghĩa là nguồn cung cấp máu và oxy của võng mạc bị giảm, các vùng ngoại vi của võng mạc mất nguồn dinh dưỡng của chúng và ngừng hoạt động chức năng thích hợp. Ví dụ cụ thể về bệnh thiếu máu võng mạc là bệnh màng lưới. Các bệnh thông thường mà dẫn đến bệnh màng lưới là bệnh võng mạc tiểu đường, tắc tĩnh mạch võng mạc trung tâm, chứng hẹp động mạch cảnh, và bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm. Bệnh võng mạc tiểu đường là nguyên nhân chủ yếu của sự mất thị lực ở bệnh nhân đái tháo đường. Trong bệnh võng mạc thiếu máu cục bộ, sự tăng trưởng của các mạch máu mới xảy ra (sự tạo mạch mới). Các mạch máu này thường tăng trưởng trên bề mặt võng mạc, ở dây thần kinh thị giác, hoặc ở phía trước của mắt trên mống mắt. Các mạch máu mới này không thể thay thế dòng chất dinh dưỡng cần thiết và, thay vào đó, có thể gây ra nhiều vấn đề như chảy máu thủy tinh thể, sự bong võng mạc, và bệnh tăng nhãn áp không kiểm soát. Các vấn đề này xảy ra do các mạch máu mới dễ vỡ và dễ xuất huyết. Nếu được chặn đứng trong các giai đoạn đầu, bệnh võng mạc tiểu đường có tăng sinh đôi khi có thể được chặn đứng bằng quang đông võng mạc. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, phẫu thuật lấy bỏ dịch trong mắt là lựa chọn duy nhất.

Bên cạnh các bệnh về võng mạc này, các bệnh mạch máu của mắt cũng bao gồm các bệnh tạo mạch mới ở mắt, như thoái hóa điểm vàng và bệnh phù điểm vàng của võng mạc do tiểu đường (diabetic macular edema - DME). Thoái hóa điểm vàng là do sự tăng trưởng tân mạch của màng mạch bên dưới điểm vàng. Có hai loại thoái hóa điểm vàng: khô và ướt. Trong khi thoái hóa điểm vàng ướt chỉ chứa 15% tất cả thoái hóa điểm vàng, gần như tất cả thoái hóa điểm vàng ướt dẫn đến mù. Ngoài ra, thoái hóa điểm vàng ướt gần như đều do thoái hóa điểm vàng khô. Một khi một mắt bị tác động bởi thoái hóa điểm vàng ướt, tình trạng này hầu hết đều tác động đến mắt còn lại. Thoái hóa điểm vàng ướt thường được gọi là thoái hóa điểm vàng ướt do tuổi già của AMD ướt bởi vì nó hầu hết được tìm thấy ở người già.

Bệnh võng mạc tiểu đường (DR) và DME đang dẫn đến các nguyên nhân của mù trong nhóm tuổi lao động của hầu hết các nước phát triển. Số lượng ngày càng tăng các cá thể bị đái tháo đường trên toàn thế giới đề xuất rằng DR và DME sẽ tiếp tục là nguyên nhân chủ yếu đối với sự mất thị lực và sự suy giảm chức năng liên quan trong nhiều năm tới. Một số cơ chế hóa sinh, bao gồm sự hoạt hóa protein kinaza C-β, sự tạo yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu tăng, mức căng thẳng oxi hóa, và sự tích lũy sorbitol nội bào và

sự glycosyl hóa các sản phẩm cuối cùng tăng, có thể góp phần làm vỡ mạch mà là đặc điểm của DR/DME. Sự ức chế các con đường này ảnh hưởng đến triển vọng can thiệp đối với DR và DME.

Thuật ngữ "tăng áp phổi" có nghĩa là rối loạn trong đó huyết áp trong động mạch phổi cao bất thường. Trong trường hợp không có các bệnh khác về tim hoặc phổi, nó được gọi là tăng áp phổi nguyên phát. Sự hẹp lan tỏa của các động mạch phổi như là đáp ứng đối với lực cản tăng đối với dòng máu. Tỷ lệ mắc phải là 8 trong số 100000 người. Tuy nhiên, tăng áp phổi cũng có thể xảy ra dưới dạng biến chứng của bệnh viêm phổi tắc nghẽn mạn tính (Chronic Obstructive Pulmonary Diseases - COPD) như khí thũng, viêm phế quản hoặc xơ hóa mô kẽ lan tỏa và ở các bệnh nhân bị COPD dạng hen. Tỷ lệ mắc phải COPD là xấp xỉ 5 trong số 10000 người.

Ngoài ra, protein gắn kết theo sáng chế có thể được dùng để điều trị viêm và cụ thể hơn là các rối loạn do viêm.

Thuật ngữ "viêm" như được dùng ở đây có nghĩa là sự phản ứng tại chỗ đối với thương tổn của các mô sống, cụ thể là sự phản ứng tại chỗ của các mạch máu nhỏ, các hàm lượng của chúng và các cấu trúc liên quan của chúng. Sự đi qua của các thành phần máu qua thành mạch máu vào trong các mô là dấu hiệu của viêm, và tập hợp mô được tạo thành như vậy được gọi là rỉ những chất từ trong máu ra võng mạc (exudates) hoặc phù. Quá trình độc mà gây hại cho mô sống, ví dụ nhiễm vi khuẩn, quá nhiệt, lạnh, tổn thương cơ học như nghiền, axit, kiềm, bức xạ, hoặc sự nhiễm virút có thể dẫn đến viêm không kể là cơ quan hoặc mô liên quan. Cần rõ ràng rằng các bệnh được phân loại là "bệnh viêm" và các phản ứng mô từ bỏng đến viêm phổi, bệnh phong, bệnh lao, và viêm khớp dạng thấp đều là "viêm".

Protein gắn kết theo sáng chế có thể được dùng để xử lý sự tạo khối u. Thuật ngữ "khối u" có nghĩa là một khối mô bất thường mà xuất hiện không rõ nguyên nhân từ các tế bào của cơ thể hiện có, không có chức năng có chủ đích, và được mô tả là có xu hướng tăng trưởng độc lập và không kiểm soát. Các khối u hơi khác so với viêm hoặc sự sưng khác bởi vì các tế bào trong khối u là bất thường về hình dạng bên ngoài và các đặc tính khác của chúng. Nói chung, các tế bào bất thường, tức là loại tế bào tạo khối u, khác so với các tế bào bình thường trải qua một hoặc nhiều sự biến đổi sau đây:

(1) sự phình trướng, hoặc sự tăng kích thước các tế bào đơn lẻ; (2) sự tăng sản hoặc sự tăng số lượng tế bào trong khu vực xác định; (3) sự mất biệt hóa, hoặc sự thoái hóa các đặc tính sinh lý của tế bào theo hướng loại nguyên thủy hơn hoặc không được biệt hóa. Các khối u có thể lành tính, ví dụ u mỡ, u mạch, xương, u sụn, và u tuyến giáp. Ví dụ về u ác tính là ung thư (như u vú, ung thư trong đường hô hấp và đường tiêu hóa, các tuyến nội tiết, và hệ sinh dục tiết niệu), sarcoma (trong các mô liên kết, bao gồm mô sợi, mô mỡ, cơ, mạch máu, xương, và sụn), ung thư biểu mô liên kết (trong cả biểu mô và mô liên kết) bệnh bạch cầu và bệnh liên quan đến tế bào lympho, các khối u của mô thần kinh (bao gồm não), và khối u ác tính (ung thư của các tế bào da được nhuộm). Việc dùng protein gắn kết theo sáng chế chống lại khối u cũng có thể kết hợp với liệu pháp chống lại khối u bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực này như chiếu xạ, trị liệu bằng quang động học, hóa trị liệu hoặc phẫu thuật.

Dược phẩm chứa protein gắn kết như được mô tả ở trên và chất mang, tá dược hoặc chất làm ổn định dược dụng (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]). Các chất mang, tá dược hoặc chất làm ổn định thích hợp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là muối, dung dịch Ringer, dung dịch dextroza, dung dịch Hank, dầu cố định, etyl oleat, dextroza 5% trong nước muối, các chất mà làm tăng độ đẳng trương và tính ổn định hóa học, chất đệm và chất bảo quản. Các chất mang thích hợp khác bao gồm chất mang bất kỳ mà tự nó không cảm ứng sự tạo kháng thể gây hại cho cá thể nhận chế phẩm này như protein, polysacarit, axit polylactic, axit polyglycolic, các axit amin chứa polyme và copolyme axit amin. Dược phẩm cũng có thể là chế phẩm hỗn hợp, chứa hoạt chất bổ sung, như chất chống ung thư hoặc chất chống hình thành mạch (ví dụ VEGF-Axxxb của người; tốt hơn, nếu là VEGF-A165b của người).

Dược phẩm được ưu tiên để điều trị các bệnh về mắt chứa protein gắn kết như được mô tả ở trên và một chất làm sạch như chất làm sạch không phân ly, bao gồm nhưng ở polysorbat 20 (ví dụ khoảng 0,04%), chất đệm như histidin, phosphat hoặc axit lactic và đường như sucroza hoặc trehaloza. Tốt hơn, nếu chế phẩm chứa protein gắn kết như được mô tả ở trên và PBS. Dược phẩm đã nêu hoặc dược phẩm bất kỳ khác được mô tả ở đây có thể được dùng tại chỗ, hoặc tại chỗ đối với phần của mắt hoặc được tiêm vào mắt ví dụ vào dưới màng kết, quanh cầu mắt hoặc khoang sau hành mắt hoặc trực tiếp

vào mắt. Theo cách khác, dược phẩm đã nêu hoặc dược phẩm khác có thể được dùng nội hấp bằng cách dùng qua đường tiêm. Tốt hơn, nếu dược phẩm đã nêu hoặc dược phẩm khác được dùng cho mắt bằng cách tiêm thủy tinh thể. Cũng tốt hơn, nếu dược phẩm đã nêu được dùng cho mắt tại chỗ và dưới dạng giọt tra mắt. Giọt tra mắt có thể được dùng cho giác mạc (phần trong suốt ở trung tâm của mắt) nhờ đó cho phép các phân tử này thấm vào mắt. Đối với việc điều trị bệnh ảnh hưởng đến phía sau của mắt, có thể mong muốn nhất là protein gắn kết thâm nhập vào màng cứng khi được tiêm vào màng cứng hoặc quanh cầu mắt. Việc dùng protein gắn kết có thể được thực hiện sau bước mở đầu của việc điều chỉnh bề mặt của mắt để cải thiện độ thâm nhập các phân tử này. Tốt hơn, nếu lớp biểu mô màng sừng được điều biến bằng một sự tăng độ thâm nhập để cho phép thâm nhập nhanh và đủ của các phân tử như ví dụ được mô tả ở trên. Việc dùng protein gắn kết theo sáng chế chống lại bệnh về mắt cũng có thể được kết hợp với liệu pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực này như liệu pháp quang động học.

Các chế phẩm này được dùng đối với việc sử dụng phải là vô trùng. Điều này được hoàn thành dễ dàng thông qua màng lọc vô trùng.

Các chế phẩm giải phóng duy trì có thể được bào chế. Theo một phương án theo sáng chế, mô cấy mắt có thể được dùng để tạo ra protein gắn kết theo sáng chế. Ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm chất nền bán thấm của polyme kỵ nước rắn chứa polypeptit theo sáng chế, trong đó chất nền ở dạng các hạt định hình, ví dụ phim, hoặc vi nang. Ví dụ về chất nền giải phóng duy trì bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-metacrylat), hoặc rượu poly(vinylic)), polylactic, các copolyme của axit L-glutamic và gama-etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không phân hủy, các copolyme axit glycolic- axit lactic phân hủy như LUPRON DEPOT® (vi cầu dùng cho tiêm bao gồm copolyme axit glycolic axit lactic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Dược phẩm có thể được dùng bằng phương pháp thích hợp bất kỳ trong kiến thức của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Đường dùng được ưu tiên là đường ngoài đường tiêu hóa. Trong việc dùng ngoài đường tiêu hóa, dược phẩm theo sáng chế sẽ được bào chế ở dạng tiêm liều đơn vị như dung dịch, huyền phù hoặc nhũ tương, kết

hợp với tá dược dược dụng như được xác định ở trên. Liều và đường dùng sẽ tùy thuộc vào cá thể được điều trị và bệnh cụ thể.

Nói chung, dược phẩm được dùng sao cho protein gắn kết theo sáng chế được xác định ở liều nằm trong khoảng từ 1µg kg đến 20mg/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10µg/kg đến 5mg/kg, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2mg/kg. Tốt hơn, nếu nó được xác định dưới dạng liều thuốc to. Việc truyền liên tục cũng có thể được dùng và bao gồm sự phân phối dưới da liên tục qua vi bơm thẩm thấu. Nếu như vậy, dược phẩm có thể được truyền ở liều nằm trong khoảng từ 5 đến 20µg/kg/ phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 7 đến 15µg/kg/ phút. Cụ thể là, dược phẩm được dùng bằng việc tiêm vào mắt sao cho protein gắn kết theo sáng chế được xác định ở liều nằm trong khoảng từ 0,1mg đến 10mg/ tiêm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,3 đến 6mg / tiêm, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1mg đến 4mg / tiêm. Ngoài ra, dược phẩm được dùng dạng tra giọt vào mắt sao cho một giọt dung dịch chứa protein gắn kết theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 120mg/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 20 đến 100mg/ml, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 40 đến 80mg/ml được dùng cho mắt.

Theo phương án của sáng chế, protein gắn kết ức chế hoạt tính của VEGF-Axxx, như được mô tả ở trên, có thể được dùng kết hợp với protein gắn kết hoặc phân tử nhỏ ức chế hoạt tính của PIGF, có cùng mức độ ức chế PIGF như được mô tả ở trên đối với VEGF-Axxx. Phương án này dựa trên thực tế là PIGF được nhận thấy là tạo mạch ở các vị trí nơi mà các mức VEGF-Axxx tăng. Ngoài ra, protein gắn kết ức chế hoạt tính của VEGF-Axxx, như được mô tả ở trên, có thể được dùng kết hợp với protein gắn kết hoặc phân tử nhỏ ức chế hoạt tính của yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (platelet-derived growth factor - PDGF), VEGF-C hoặc các thành viên khác của họ VEGF của protein, yếu tố hoại tử u anpha (tumor necrosis factor alpha (TNFalpha), dạng tương tự phối tử denta 4 (Dll4), intolokin 6 (IL-6), neuropilin hoặc angiopoietin 2 (Ang2).

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp điều trị. Theo một khía cạnh, phương pháp điều trị bệnh màng lưới được đề xuất, phương pháp này bao gồm cho bệnh nhân dùng protein gắn kết theo sáng chế với lượng có hiệu quả điều trị bệnh, cụ thể là protein gắn kết mà ức chế sự tương tác giữa VEGF-Axxx của người và VEGFR-2 của người,

nhưng không phải sự tương tác giữa VEGF-Axxxb của người và VEGFR-2 của người, và protein gắn kết ức chế sự hình thành mạch qua trung gian VEGFR-2.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp dùng protein gắn kết như đã được mô tả để ức chế hoạt tính sinh học của VEGF-A trong tế bào hoặc để ức chế hoạt tính sinh học qua trung gian VEGFR-2. Tế bào có thể ở trong trạng thái in vivo hoặc ex vivo, và có thể là, ví dụ, tế bào của cơ thể sống, tế bào nuôi cấy hoặc tế bào trong mẫu mô. Phương pháp này có thể bao gồm cho tế bào đã nêu tiếp xúc với tương tác VEGF-A/VEGFR-2 bất kỳ ức chế protein gắn kết được bộc lộ ở đây, với lượng và thời gian đủ để ức chế hoạt tính sinh học này.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng có tình trạng bệnh đáp ứng với sự ức chế của VEGF-Axxx hoặc VEGFR-2. Phương pháp này bao gồm cho đối tượng đã nêu dùng protein gắn kết với lượng có hiệu quả đã được mô tả ở đây. Tình trạng bệnh có thể là tình trạng được đặc trưng sự hình thành mạch không thích hợp. Tình trạng bệnh có thể là tình trạng tăng sinh quá mức. Ví dụ về tình trạng bệnh (hoặc rối loạn bệnh) thích hợp để điều trị bao gồm các rối loạn tự miễn, các rối loạn viêm, các rối loạn võng mạc (đặc biệt là các rối loạn võng mạc do tăng sinh), và các bệnh ung thư, cụ thể là một trong số các bệnh được mô tả ở trên. Protein gắn kết bất kỳ trong số các protein gắn kết được mô tả ở đây có thể được dùng để bào chế thuốc cho việc điều trị rối loạn bệnh này, đặc biệt là rối loạn bệnh được chọn từ nhóm bao gồm: rối loạn tự miễn, rối loạn do viêm, bệnh màng lưới và ung thư.

Các tình trạng bệnh (hoặc rối loạn) được ưu tiên thích hợp để điều trị là ung thư tế bào thận di căn dòng đầu tiên, u nguyên bào đệm tái phát, ung thư ruột kết, ung thư vú âm tính HER2, ung thư vú dương tính HER2, ung thư phổi tế bào không nhỏ, u lympho tế bào B lớn lan tỏa, ung thư dạ dày tiến triển dòng đầu tiên, ung thư vú di căn âm tính HER2 dòng đầu tiên, ung thư vú di căn dương tính HER2 dòng đầu tiên, ung thư buồng trứng di căn dòng đầu tiên, u mô đệm đường tiêu hóa, hạch có dạng ung thư nguy cơ cao, ung thư tuyến tiền liệt dai dẳng do hormon, u nguyên bào đệm mới được chẩn đoán, ung thư đầu và cổ di căn, ung thư buồng trứng nhạy cảm với platin tái phát, ung thư vú di căn dòng thứ hai, ung thư phổi tế bào nhỏ lan tỏa, ung thư phổi tế bào không nhỏ không vảy bị di căn CNS đã được điều trị trước và bệnh đa u tủy tái phát, ung thư tuyến tiền liệt,

ung thư phổi tế bào không nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC), ung thư đại tràng và ung thư tuyến tụy, ung thư buồng trứng giai đoạn muộn (advanced ovarian cancer - AOC), các bệnh nhân bị AOC bị bệnh cổ trướng ác tính triệu chứng và bệnh u lympho không Hodgkin.

Protein gắn kết tái tổ hợp theo sáng chế có thể thu được và/ hoặc được phát triển thêm bằng nhiều phương pháp như biểu hiện trên bề mặt của thực khuẩn thể (WO 90/02809, WO 07/006665) hoặc các tế bào vi khuẩn (WO 93/10214), biểu hiện ribosom (WO 98/48008), biểu hiện trên plasmit (WO 93/08278) hoặc bằng cách dùng các cấu trúc protein lặp lại ARN đồng hóa trị (WO 00/32823), hoặc sự biểu hiện và chọn lọc / sàng lọc nội bào như thử nghiệm bổ sung protein (WO 98/341 120). Các phương pháp này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Thư viện các protein lặp lại ankyrin hữu dụng để chọn lọc / sàng lọc protein gắn kết tái tổ hợp theo sáng chế có thể thu được theo các quy trình chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (WO 02/020565, Binz, H.K. et al., JMB, 332, 489-503, 2003, và Binz et al., 2004, loc. cit). Việc dùng thư viện này để chọn lọc DARPin đặc hiệu VEGF-Axxx được xác định trong Ví dụ 1.Tương tự, các môtip trình tự lặp lại ankyrin như được trình bày ở trên có thể thường tạo ra các thư viện các protein lặp lại ankyrin mà có thể được dùng để chọn lọc hoặc sàng lọc DARPin đặc hiệu VEGF-Axxx. Ngoài ra, các vùng lặp lại của sáng chế có thể được lắp theo mođun từ các mođun lặp lại theo các sáng chế hiện nay và các mođun phủ thích hợp (Forrer, P., et al., FEBS letters 539, 2-6, 2003) sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn (ví dụ WO 02/020565, Binz et al., 2003, loc. cit. và Binz et al., 2004, loc. cit).

Sáng chế không bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Các nguồn khác có thể được dùng và được xử lý theo toàn bộ nội dung được mô tả sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tất cả các vật liệu khởi đầu và các chất phản ứng được bộc lộ dưới đây đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết, và có bán ngoài thị trường hoặc có thể được điều chế bằng cách dùng các kỹ thuật đã biết rõ.

Vật liệu

Các chất hóa học được mua của hãng Fluka (Thụy sĩ). Các oligonucleotit được mua của hãng Microsynth (Thụy sỹ). Trừ phi được quy định khác, ADN polymeraza, enzym giới hạn và chất đệm được mua của hang New England Biolabs (USA) hoặc Fermentas (Lithuania). Chủng sản sinh protein và tách dòng là xanh E. coli XL1 (Stratagene, USA). Các biến thể VEGF là của các hệ thống R&D (Minneapolis, USA) hoặc được sản xuất trong các tế bào buồng trứng của chuột hamster Trung Quốc hoặc trong Pichia pastoris và được tinh chế theo quy trình chuẩn (Rennel, E. S. et al., European J. Cancer 44, 1883-94, 2008; Pichia expression system from Invitrogen). Các biến thể VEGF biotinyl hóa thu được về mặt hóa học qua kết cặp gốc biotin với các amin bậc một của các biến thể VEGF được tinh chế bằng cách dùng các chất phản ứng và phương pháp biotinyl hóa tiêu chuẩn (Pierce, USA).

Sinh học phân tử

Trừ phi có quy định khác, các phương pháp được thực hiện theo các quy trình chuẩn đã được mô tả (Sambrook J., Fritsch E. F. và Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New York).

Thư viện protein lặp lại ankyrin được tạo ra

Các thư viện protein lặp lại ankyrin được tạo ra N2C và N3C đã được mô tả (WO 02/20565; Binz et al. 2003, loc. cit.; Binz et al. 2004, loc. cit.). Con số trong N2C và N3C mô tả số lượng các mođun lặp lại ngẫu nhiên giữa các mođun phủ đầu tận cùng N và ở đầu tận cùng C. Danh pháp được dùng để xác định các vị trí bên trong các đơn vị và các mođun lặp lại dựa vào Binz et al. 2004, loc. cit. với sự biến thể mà biên giới của các mođun lặp lại và các đơn vị lặp lại được thay đổi bằng một vị trí axit amin. Ví dụ, vị trí 1 của mođun lặp lại của Binz et al. 2004 (loc. cit.) tương ứng với vị trí 2 của mođun lặp lại của sự bộc lộ hiện tại và do đó vị trí 33 của mođun lặp lại của Binz et al. 2004, loc. cit. tương ứng với vị trí 1 của mođun lặp lại tiếp theo của sự bộc lộ hiện tại.

Tất cả các trình tự ADN được xác nhận bằng cách xác định trình tự, và trọng lượng phân tử theo tính toán của tất cả các protein được mô tả được xác nhận bằng phổ khối.

Ví dụ 1: Chọn lọc protein gắn kết chứa vùng lặp lại có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx

Việc sử dụng biểu hiện ribosom (Hanes, J. và Pluckthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997) nhiều protein lặp lại ankyrin được tạo ra (DARPin) có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx được chọn từ các thư viện DARPin N2C hoặc N3C được mô tả bởi Binz và cộng sự 2004 (loc. cit.).

Sự gắn kết của các dòng được chọn theo hướng các đích đặc hiệu (VEGF-Axxx) và không đặc hiệu (MBP, protein gắn kết maltoza của E. coli) được đánh giá bằng ELISA dịch chiết thô chỉ ra rằng các protein gắn kết VEGF-Axxx đã được chọn thành công (Fig. 1). Các vùng lặp lại của SEQ ID NO:1 đến 7 tạo ra các trình tự axit amin của các protein gắn kết được chọn chứa vùng lặp lại có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx. Sự phân tích trình tự của các chất gắn kết được chọn cho thấy các môtip trình tự lặp lại ankyrin đặc hiệu sẵn có đối với một số họ được chọn của các chất gắn kết.

Chọn lọc các protein lặp lại ankyrin đặc hiệu VEGF-Axxx bằng biểu hiện ribosom

Việc chọn lọc các protein lặp lại ankyrin đặc hiệu VEGF-Axxx được tiến hành bằng biểu hiện ribosom (Hanes và Pluckthun, loc. cit.) bằng cách dùng VEGF-A164 của chó hoặc VEGF-A165 của người làm protein đích, thư viện các protein lặp lại ankyrin được tạo ra như đã được mô tả (WO 02/020565, Binz et al., 2003, loc. cit. và Binz et al., 2004, loc. cit) và các quy trình chuẩn được thiết lập (Zahnd, C, Amstutz, P. và Pluckthun, A., Nat. Methods 4, 69-79, 2007).

Các chu kỳ chọn lọc biểu hiện ribosom được tiến hành trên các biến thể VEGF của chó hoặc của người (bao gồm các biến thể biotinyl hóa được cố định trên neutravidin hoặc streptavidin) với cả hai thư viện DARPin N2C và N3C bằng cách dùng các quy trình chuẩn đã được thiết lập (Binz et al. 2004, loc. cit.). Số chu kỳ PCR phiên mã ngược (reverse transcription-RT)-sau mỗi chu kỳ chọn lọc được giảm liên tục từ 40 xuống 30,

điều chỉnh đến hiệu suất do sự tăng các chất kết dính. Bốn chu kỳ chọn lọc ban đầu trên vốn mang lại VEGF của chó của DARPin ái lực nanomol, như được chỉ ra bằng ELISA và các phép đo SPR của các dòng đơn lẻ. Để phát hiện DARPin có ái lực được cải thiện hơn, các chọn lọc không theo tỷ lệ bổ sung được tiến hành trên VEGF của người hoặc chó biotinyl hóa được cố định trên neutravidin hoặc streptavidin, tạo vốn sau các chu kỳ chọn lọc biểu hiện ribosom thứ hai và thứ ba đầu tiên, tiếp đó là chu kỳ chọn lọc theo tỷ lệ trên VEGF của người.

Các dòng được chọn gắn kết đặc hiệu với VEGF-Axxx như được thể hiện bằng ELISA dịch chiết thô.

Các DARPin được chọn riêng lẻ gắn kết đặc hiệu VEGF-Axxx được xác định bằng xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) bằng cách dùng các dịch chiết Escherichia coli thô của các tế bào biểu hiện DARPin bằng cách dùng quy trình tiêu chuẩn. Các dòng được chọn được tách dòng vào vectơ biểu hiện pQE30 (Qiagen), biến nạp vào xanh E. coli XL1 (Stratagene) và tiếp đó được cho sinh trưởng qua đêm ở 37°C trong đĩa sâu 96 lỗ (mỗi dòng trong một giếng đơn) chứa 1ml môi trường sinh trưởng (2YT chứa glucoza 1% và ampixilin 100µg/ml). 1ml 2YT mới chứa ampicxlin 50µg/ml được ủ với 100µl môi trường nuôi cấy qua đêm trong đĩa sâu 96 lỗ. Sau khi ủ trong 2h ở 37°C, sự biểu hiện được cảm ứng bằng IPTG (nồng độ cuối cùng 1mM) và tiếp tục trong 3h. Các tế bào được thu hoạch, tạo huyền phù lại trong B-PERII 100 µl (Pierce) và ủ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng kèm lắc. Tiếp đó, thêm PBS-TB 900µl (PBS được bổ sung BSA 0,2%, Tween 20 0,1%, độ pH 7.4) và loại bỏ các mảnh vụn tế bào bằng ly tâm.

Cho 100µl của mỗi dòng được dung giải vào một giếng của đĩa MaxiSorp phủ NeutrAvidin chứa biến thể VEGF-Axxx hoặc MBP không liên quan được cố định qua gốc biotin của chúng và ủ trong 1h ở RT. Sau khi rửa phạm vi rộng bằng PBS-T (PBS được bổ sung Tween 20 0,1%, độ pH 7,4) khai thác đĩa này bằng cách dùng các quy trình ELISA tiêu chuẩn sử dụng kháng thể kháng RGS(His)$_4$ đơn dòng (34650, Qiagen) dưới dạng kháng thể sơ cấp và kháng thể dê kháng chuột đa dòng được gắn kết với phosphataza kiềm (A3562, Sigma) dưới dạng chất phản ứng thứ hai. Tiếp đó, sự gắn kết này được phát hiện bằng cách dùng dinatri 4-nitrophenyl phosphat (4NPP, Fluka) dưới

dạng cơ chất cho phosphataza kiềm. Sự hiện ảnh màu được đo ở 405nm. Các kết quả từ ELISA dịch chiết thô của ví dụ mả được dùng để nhận biết các DARPin gắn kết với VEGF-Axxx được thể hiện trong Fig. 1.

Việc sàng lọc hàng trăm dòng khác nhau bằng ELISA dịch chiết tế bào thô này thể hiện hơn một trăm DARPin có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx. Các protein gắn kết này được chọn để phân tích thêm. Ví dụ về các trình tự axit amin của vùng lặp lại ankyrin được chọn mà gắn kết đặc hiệu với VEGF-Axxx được nêu trong SEQ ID NO:1 đến 7.

Suy luận các môtip trình tự lặp lại từ các vùng lặp lại được chọn có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx

Các trình tự axit amin của các vùng lặp lại được chọn có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx được phân tích thêm bằng các dụng cụ phân tích trình tự đã biết đối với người hành nghề trong lĩnh vực này (WO 02/020565; Forrer et al., 2003, loc. cit.; Forrer, P., Binz, H.K., Stumpp, M.T. và Pluckthun, A., ChemBioChem, 5(2), 183-189, 2004). Tuy nhiên, ngược với WO 02/020565 trong đó các môtip lặp lại có ngoài tự nhiên được dùng để suy ra các môtip trình tự lặp lại, ở đây các môtip trình tự lặp lại được suy luận từ các đơn vị lặp lại của các vùng lặp lại được chọn có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx. Nhờ đó các họ của các vùng lặp lại được chọn chứa môtip trình tự lặp lại thông thường được xác định.

Biểu hiện mức độ cao và tan được của DARPin

Để phân tích rõ hơn, các dòng được chọn thể hiện gắn kết VEGF-Axxx đặc hiệu trong ELISA dịch chiết tế bào thô như được mô tả ở trên được biểu hiện trong các tế bào xanh E. coli XL1 và được tinh chế bằng cách dùng tag His của chúng bằng cách dùng các quy trình tiêu chuẩn. Sử dụng 25ml môi trường nuôi cấy qua đêm tĩnh (LB, glucoza 1%, 100mg/l ampixilin; 37°C) để ủ 1l môi trường nuôi cấy (cùng môi trường). Ở A(600) = 0,7, các môi trường nuôi cấy này được cảm ứng bằng IPTG 0,5mM và được ủ ở 37°C trong 4h. Ly tâm các môi trường nuôi cấy và tạo huyền phù lại các hạt nhỏ thu được trong 40ml TBS500 (Tris-HCl 50mM, NaCl 500mM, pH 8) và siêu âm. Ly tâm lại dịch tan, và thêm glyxerol (10% (thể tích) nồng độ cuối cùng) và imidazol (nồng độ cuối cùng

20mM) vào dịch nổi thu được. Tinh chế các protein qua cột axit ninitrilotriaxetic (thể tích cột 2,5ml) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (QIAgen, Đức). Lên đến 200mg DARPin hòa tan tốt có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx có thể được tinh chế từ một lít môi trường nuôi cấy E. coli có độ tinh khiết > 95% như được dự tính từ SDS-15% PAGE. Các DARPin này được dùng để mô tả đặc tính cụ thể hơn.

Ví dụ 2: Xác định các giá trị IC của DARPin được chọn có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx trong thử nghiệm sự mọc quá nhanh của vật dạng cầu

Sự bổ sung VEGF-Axxx vào vật dạng cầu HUVEC được gắn vào chất nền colagen dẫn đến sự mọc mầm vật dạng cầu. Sự bổ sung chất ức chế của VEGF-Axxx sẽ ngăn chặn sự tạo mầm, mà có thể được định lượng về thống kê bằng số lượng và độ dài mầm. Bằng cách thêm nồng độ khác nhau của chất ức chế và lượng ổn định của VEGF, IC_{50} có thể được xác định.

Sự ức chế tạo mầm vật dạng cầu bằng DARPin đặc hiệu VEGF-Axxx

Các thử nghiệm sự mọc quá nhanh vật dạng cầu được tiến hành theo các quy trình tiêu chuẩn (Korff et al., loc. cit). Các DARPin có tính đặc hiệu đối với VEGF-Axxx được chọn và tinh chế đến độ tinh khiết > 96% như được mô tả trong Ví dụ 1. Các tế bào tĩnh mạch rốn của người được cho sinh trưởng để xác định số lượng tế bào trong môi trường nuôi cấy một lớp. Sau khi trypsin hóa, huyền phù tế bào được đặt trong giọt treo để tạo vật dạng cầu, tức là xấp xỉ 500 HUVEC kết cụm được sắp xếp. Các vật dạng cầu được gắn vào trong chất nền colagen và được kích thích bằng VEGF-A165 để tạo thuận lợi cho sự mọc quá nhanh của mầm. Các chất ức chế sự mọc mầm được thêm bổ sung để quan sát các tác động của chúng đến sự ức chế sự mọc mầm. Số lượng mầm/ vật dạng cầu và độ dài mầm được định lượng bằng cách dùng phần mềm đồ họa.

Các kết quả từ hai thử nghiệm mọc mầm vật dạng cầu của ví dụ được thể hiện trong Fig. 2a (DARPin #30 có tính đặc hiệu gắn kết for VEGF-Axxx) và Fig. 2b (DARPin NC, DARPin đối chứng âm tính không có tính đặc hiệu gắn kết đối với VEGF-Axxx; ví dụ DARPin E3_5 (Binz et al., 2005, loc. cit.). Các DARPin hoạt động tốt nhất trong thử nghiệm này có các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 10 đến 50 pM, trong khi

Avastin®, Lucentis® và Macugen® thể hiện các giá trị IC_{50} trong các thử nghiệm song song nằm trong khoảng từ 150 đến 500pM.

Ví dụ 3: Xác định đặc hiệu đích của DARPin #27 so với Avastin® bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt

VEGF-A164 của chó hoặc VEGF-A164b của chó được cố định trong tế bào dòng chảy và sự tương tác của DARPin #27 (vùng lặp lại của SEQ ID NO:1, tương ứng với các axit amin từ 1 đến 159) và Avastin® có các đích cố định được phân tích.

Phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance-SPR)

SPR được đo bằng cách dùng thiết bị ProteOn (BioRad). Chất đệm chạy là HEPES 20mM, độ pH 7,4, NaCl 150mM và Tween 20 0,005%. Khoảng 1200 RU của VEGF-A164 của chó hoặc VEGF-A164b của chó được cố định trên chip GLC (BioRad). Các tương tác được đo ở dòng chảy 60µl/ phút với dòng chảy đệm 5 phút, sự tiêm 100 giây của Avastin® hoặc DARPin #27 ở nồng độ 250 nM và phép đo không theo tỷ lệ một vài phút với dòng chảy đệm. Tín hiệu của tế bào tham chiếu không phủ được loại bỏ khỏi các phép đo này.

Các kết quả được thể hiện trong Fig. 3a (sự tương tác của Avastin với VEGF-A164 của chó), Fig. 3b (sự tương tác của Avastin với VEGF-A164b của chó), Fig. 3c (sự tương tác của DARPin #27 với VEGF-A164 của chó) và Fig. 3d (sự tương tác của DARPin #27 với VEGF-A164b của chó). Trong khi Avastin tương tác rõ ràng với cả hai isoform VEGF cố định, DARPin #27 chỉ thể hiện sự tương tác với VEGF-A164 và không tương tác với VEGF-A164b.

Ví dụ 4: Hiệu quả in vivo của DARPin #30 trong ức chế VEGF-A 165 trong mô hình chuột rò mạch

DARPin #30 PEGyl hóa (vùng lặp lại của SEQ ID NO:4 tương ứng với các axit amin từ 1 đến 126) hoặc Lucentis® được dùng bằng cách tiêm nội nhãn vào mắt của thỏ để thử nghiệm hiệu quả của chúng để ức chế sự rò mạch được cảm ứng bởi sự tiêm thủy tinh thể tiếp theo của VEGF-A165 của người.

Các phép đo sự ức chế rò mạch ở thỏ

Sử dụng vào ngày 1 hoặc PBS, DARPin #30 được PEGyl hóa (125μg) hoặc lượng đẳng mol của Lucentis® (162μg) bằng cách tiêm nội nhãn vào một mắt của mỗi thỏ (mắt được xử lý). Ở ngày 4 hoặc ngày 30 mắt được xử lý của mỗi thỏ được thử thách bằng tiêm nội nhãn 500ng VEGF-A165 của người. Cả hai mắt của tất cả các con vật được đánh giá sau 48 giờ kể từ khi tiêm VEGF-A165 bằng cách đo hàm lượng floresxein trong tất cả các mắt sau 1h kể từ khi tiêm tĩnh mạch natri floresxein (50mg/kg trọng lượng cơ thể con vật, 10% (trọng lượng/thể tích) trong dung dịch muối 0,9% (trọng lượng/thể tích). Tỷ lệ các lượng sự phát huỳnh quang trong mắt được xử lý và mắt không được xử lý được tính đối với mỗi con vật. Tỷ lệ của lượng huỳnh quang tương ứng với sự không có sự rò huỳnh quang bổ sung trong mắt được xử lý, tỷ lệ lớn hơn so với lượng huỳnh quang cho thấy sự rò huỳnh quang trong mắt được xử lý nhiều hơn trong mắt đối chứng không được xử lý.

Điều chế DARPin được PEGyl hóa

Sự PEGyl hóa protein bằng cách tận dụng gốc Cys đơn lẻ và hóa học maleimit đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể được tiến hành theo các quy trình tiêu chuẩn (ví dụ của hãng Pierce). DARPin #30 chứa chất gắn kết ở đầu tận cùng C bổ sung (GGGSGGGSC, SEQ ID NO:8) được tinh chế đến độ gần như đồng nhất bằng cách dùng các phương pháp sắc ký tiêu chuẩn. Khử protein hoàn toàn bằng cách sử dụng DTT và tinh chế bằng cách lọc gel để loại bỏ DTT và trao dổi chất đệm bằng PBS. PEG-maleimit (metoxy-poly(etylen glycol)-oxopropylamino-propyl maleimit; NOF, no. Sunbright ME-200MA) được hòa tan trong PBS được trộn với DARPin trong PBS ở khoảng lượng dư mol 15% của PEG-maleimit trong 2-4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp đó, DARPin PEGyl hóa được tách từ DARPin không phản ứng và các gốc PEG không phản ứng bằng cách dùng sắc ký trao đổi anion tiêu chuẩn.

Các kết quả được thể hiện trong Fig. 4. Cả hai DARPin #30 PEGyl hóa và Lucentis® có khả năng bảo vệ mắt thỏ khỏi rò mạch do VEGF-A165 sau 4 ngày chúng được dùng bằng cách tiêm nội nhãn. Tuy nhiên, chỉ DARPin #30 PEGyl hóa, và không

phải là Lucentis®, có khả năng bảo vệ mắt thỏ khỏi rò mạch do VEGF-A165 sau 30 ngày tiêm nội nhãn.

Trong các thử nghiệm khác chu kỳ bán rã cuối cùng nội nhãn của các protein gắn kết khác nhau theo sáng chế được xác định sau khi tiêm nội nhãn vào mắt thỏ. DARPin #30 chứa chất gắn kết ở đầu tận cùng C bổ sung (GGGSGGGSC, SEQ ID NO:8) được gắn kết với gốc PEG không chứa protein kích thước 20kDa và 40kDa bằng cách dùng các PEG maleimit từ NOF (xem Ví dụ 5). Các chu kỳ bán rã cuối cùng được xác định là 3,5 ngày (+/- 0,3 ngày), 6,1 ngày (+/- 1,0 ngày) và 5.4 ngày (+/-0,8 ngày) đối với DARPin #30, DARPin #30 được gắn kết với gốc PEG kích thước 20kDa và DARPin #30 được gắn kết với gốc PEG 40kDA. Đáng ngạc nhiên là, sự tăng trọng lượng phân tử của gốc PEG không chứa protein có kích thước từ 20kDa đến 40kDa không làm cho chu kỳ bán rã cuối cùng tăng. Xu hướng tương tự được theo dõi trong các thử nghiệm tương ứng là protein gắn kết chứa vùng lặp lại của SEQ ID NO:1 (các axit amin từ 1 đến 159) hoặc SEQ ID NO:3 (các axit amin từ 1 đến 126) thay vì vùng lặp lại của SEQ ID NO:4 được dùng.

Ví dụ 5: Protein gắn kết tái tổ hợp

Ví dụ về protein gắn kết tái tổ hợp chứa vùng lặp lại gắn kết VEGF-Axxx và gốc polyme chứa protein là SEQ ID NO:1 và 4. Vùng lặp lại của SEQ ID NO:1 tương ứng với các axit amin từ 1 đến 159 và gốc polyme chứa protein của SEQ ID NO:1 tương ứng với các axit amin 160 đến 1024. Vùng lặp lại của SEQ ID NO:4 tương ứng với các axit amin từ 1 đến 126 và gốc polyme chứa protein của SEQ ID NO:4 tương ứng với các axit amin 127 đến 536.

Các protein gắn kết của SEQ ID NO:1 và 4 được biểu hiện trong tế bào chất của Escherichia coli bằng cách dùng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, hệ biểu hiện pQE của hãng Qiagen (Đức)). Gốc Met được mã hóa thêm bằng vectơ biểu hiện được cắt hiệu quả trong tế bào chất của E. coli từ polypeptit được biểu hiện bởi vì Met bắt đầu được theo sau bởi gốc Gly nhỏ (tức là axit amin ở vị trí 1 của SEQ ID NO:1 và 4). Các tế bào này được dung giải (ví dụ bằng cách dùng máy French press) và các protein gắn kết được tinh chế đến mức gần như

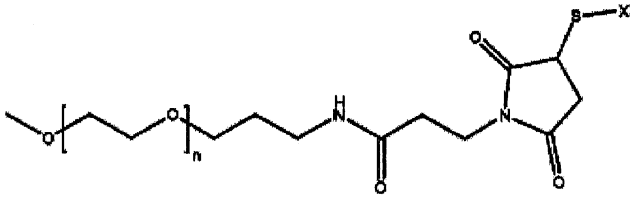
đồng nhất từ dịch chiết tế bào thô bằng cách dùng các kỹ thuật sắc ký tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Ví dụ về protein gắn kết tái tổ hợp chứa một vùng lặp lại gắn kết VEGF-Axxx và một gốc polyme không chứa protein được tạo ra bằng cách dùng các protein lặp lại của SEQ ID No:2, 3, 5, 6, và 7. Các protein lặp lại này chứa vùng lặp lại tận cùng N, tiếp đó là chất gắn kết polypeptit và Cys ở đầu tận cùng C. Các vùng lặp lại tương ứng này tương ứng với các axit amin từ 1 đến 159 đối với SEQ ID NO:2 và 7, và với các axit amin từ 1 đến 126 đối với SEQ ID NO:3 đến 6. Các protein lặp lại của SEQ ID NO:2, 3, 5, 6, và 7 được biểu hiện trong tế bào chất của Escherichia coli bằng cách dùng các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, The Expressionist của hãng Qiagen (Đức)). Gốc Met mà được mã hóa bổ sung bằng vectơ biểu hiện được phân cắt hiệu quả trong tế bào chất của E. coli từ polypeptit được biểu hiện bởi vì Met bắt đầu được theo sau bởi gốc Gly nhỏ (tức là axit amin ở vị trí 1 của SEQ ID NO:2, 3, 5, 6, và 7). Các tế bào này được dung giải (.ví dụ bằng cách dùng máy French press) và các protein gắn kết được tinh chế đến mức gần như đồng nhất từ dịch chiết tế bào thô bằng cách dùng các kỹ thuật sắc ký tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Tiếp đó, các protein lặp lại được tinh chế chứa gốc Cys đơn lẻ được gắn kết với gốc polyme không chứa protein bằng cách dùng hóa maleimit tiêu chuẩn như được nêu trong Ví dụ 4. Nhờ đó, protein gắn kết theo sáng chế chứa protein lặp lại của SEQ ID NO:2 và gốc PEG không chứa protein kích thước 40kDa (ví dụ maleimit-PEG (α-[3-(3-maleimido-1-oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen kích thước 40 kDa) từ NOF, sản phẩm số Sunbright ME-400MA), protein lặp lại của SEQ ID NO:3 và gốc PEG không chứa protein kích thước 20kDa (ví dụ maleimit-PEG (α-[3-(3-maleimido-1 -oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen kích thước 20 kDa) từ NOF, sản phẩm số Sunbright ME-200MA), protein lặp lại của SEQ ID NO:5 và gốc PEG không chứa protein kích thước 12kDa (ví dụ maleimit-PEG (α-[3-(3-maleimido-1 -oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen kích thước 12 kDa) từ NOF, sản phẩm số Sunbright ME-120MA), protein lặp lại của SEQ ID NO:6 và gốc PEG không chứa protein kích thước 5kDa (ví dụ maleimit-PEG (α-[3-(3-maleimido-1-

oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen kích thước 5 kDa) từ NOF, sản phẩm số Sunbright ME-050MA) và protein lặp lại của SEQ ID NO:7 và gốc PEG không chứa protein kích thước 2kDa (ví dụ maleimit-PEG (α-[3-(3-maleimido-1-oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen kích thước 2kDa) từ NOF, sản phẩm số Sunbright ME-020MA) được tạo ra. Tiếp đó, các protein lặp lại PEGyl hóa được tách thêm từ các protein lặp lại không được PEGyl hóa và PEG dư thừa bằng các kỹ thuật sắc ký tiêu chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Do đó, SEQ ID NO:2, 3, 5, 6, và 7 được kết hợp ở thiol của xystein ở đầu tận cùng C của chúng với maleimit PEG (α-[3-(3-maleimido-1 -oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen). Nhờ đó, cấu trúc sau đây được tạo ra:



trong đó X là SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6, hoặc 7; và n là số nguyên dương.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein gắn kết tái tổ hợp chứa miền lặp lại ankyrin chứa các axit amin 1 đến 126 nêu trong SEQ ID NO: 3 và polyetylen glycol có trọng lượng phân tử ít nhất là 5kDa.

2. Protein gắn kết theo điểm 1, trong đó miền ankyrin lặp lại đã nêu được liên hợp ở đầu tận cùng C của nó qua liên kết peptit với cầu nối polypeptit bao gồm 2 đến 24 axit amin và có gốc Cys ở đầu tận cùng C, trong đó thiol của Cys ở đầu tận cùng C đã nêu được liên hợp với polyetylen glycol đã nêu, trong đó polyetylen glycol đã nêu là polyetylen glycol được kết cặp maleimit.

3. Protein gắn kết theo điểm 2, trong đó polyetylen glycol được kết cặp maleimit đã nêu là α-[3-(3-maleimido-1-oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen.

4. Protein gắn kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3, trong đó polyetylen glycol đã nêu có trọng lượng phân tử khoảng 20kDa.

5. Protein gắn kết theo điểm 1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, trong đó thiol của Cys ở đầu tận cùng C nêu trong SEQ ID NO: 3 được liên hợp với polyetylen glycol đã nêu, trong đó polyetylen glycol đã nêu là polyetylen glycol kết cặp maleimit.

6. Protein gắn kết theo điểm 5, trong đó polyetylen glycol kết cặp maleimit đã nêu là α-[3-(3-maleimido-1-oxopropyl)amino]propyl-ω-metoxy-polyoxyetylen, và trong đó polyetylen glycol này có trọng lượng phân tử ít nhất là 10kDa.

7. Protein gắn kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm 5 đến 6, trong đó polyetylen glycol đã nêu có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng 10kDa đến 40kDa.

8. Protein gắn kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, trong đó miền ankyrin lặp lại đã nêu gắn kết với yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu -A165 (VEGF-A165) và ức chế sự gắn kết của VEGF-A165 với thụ thể yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu -2 (VEGFR-2).

9. Dược phẩm chứa protein gắn kết theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 8 và chất mang và/ hoặc chất pha loãng dược dụng.

Fig. 1

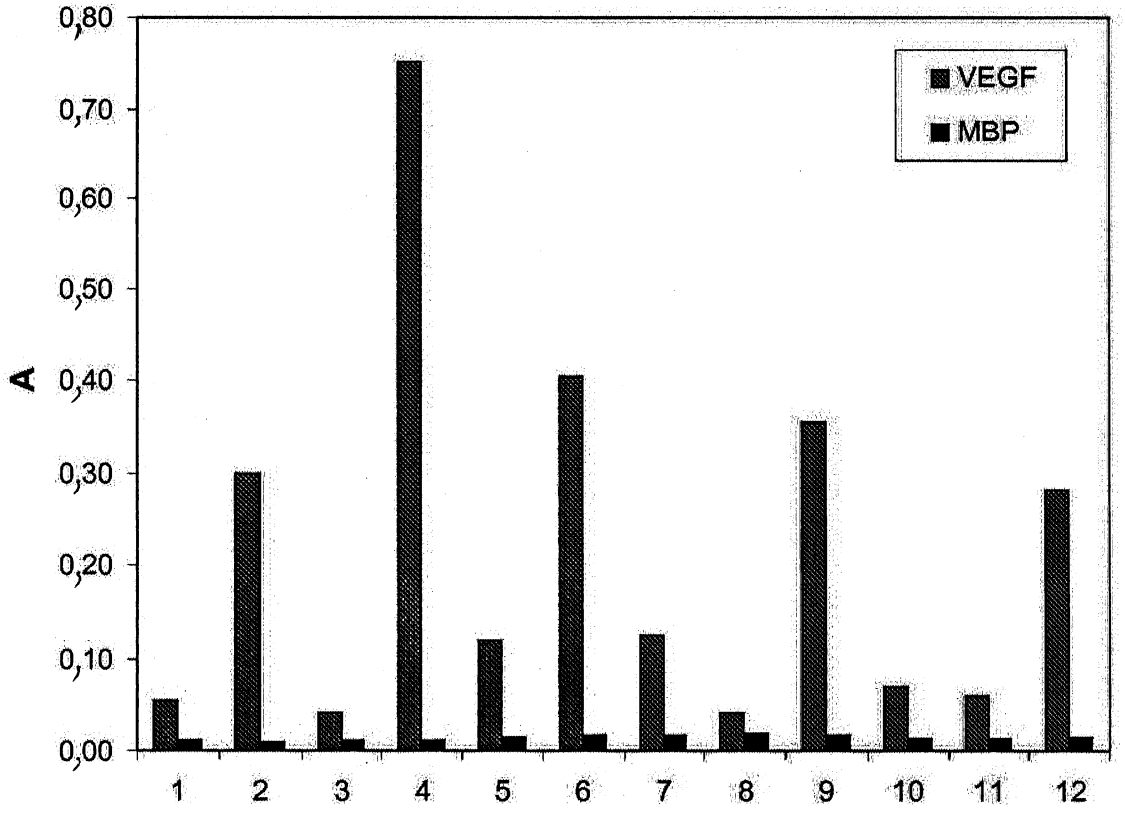

0,80
0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
A
VEGF
MBP
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Fig. 2a

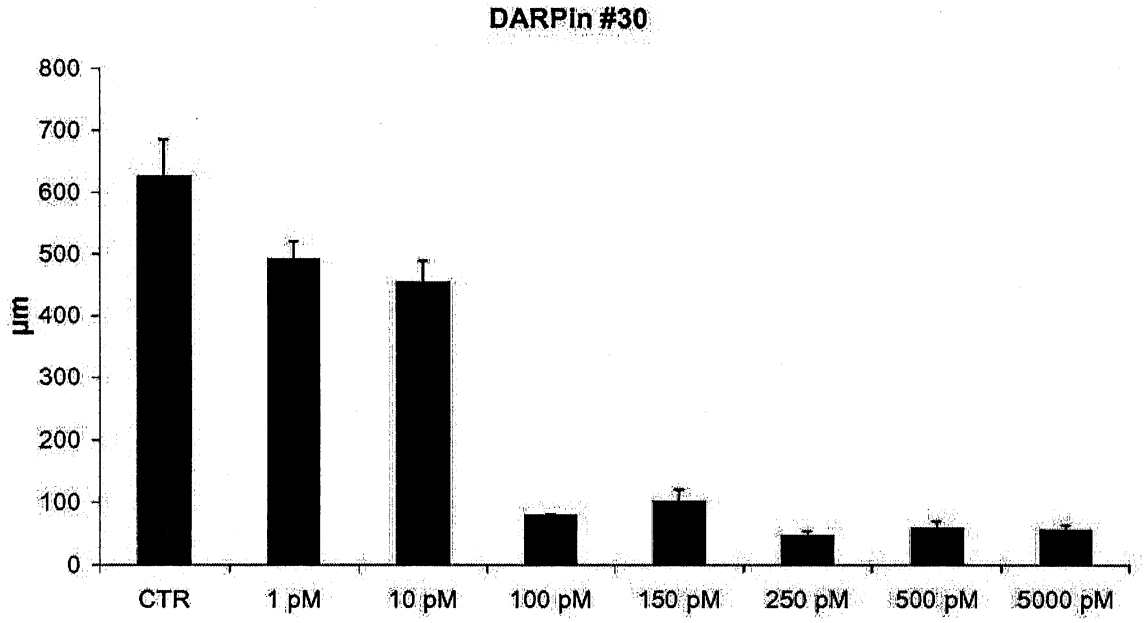

DARPin #30
µm
800
700
600
500
400
300
200
100
0
CTR
1 pM
10 pM
100 pM
150 pM
250 pM
500 pM
5000 pM

Fig. 2b

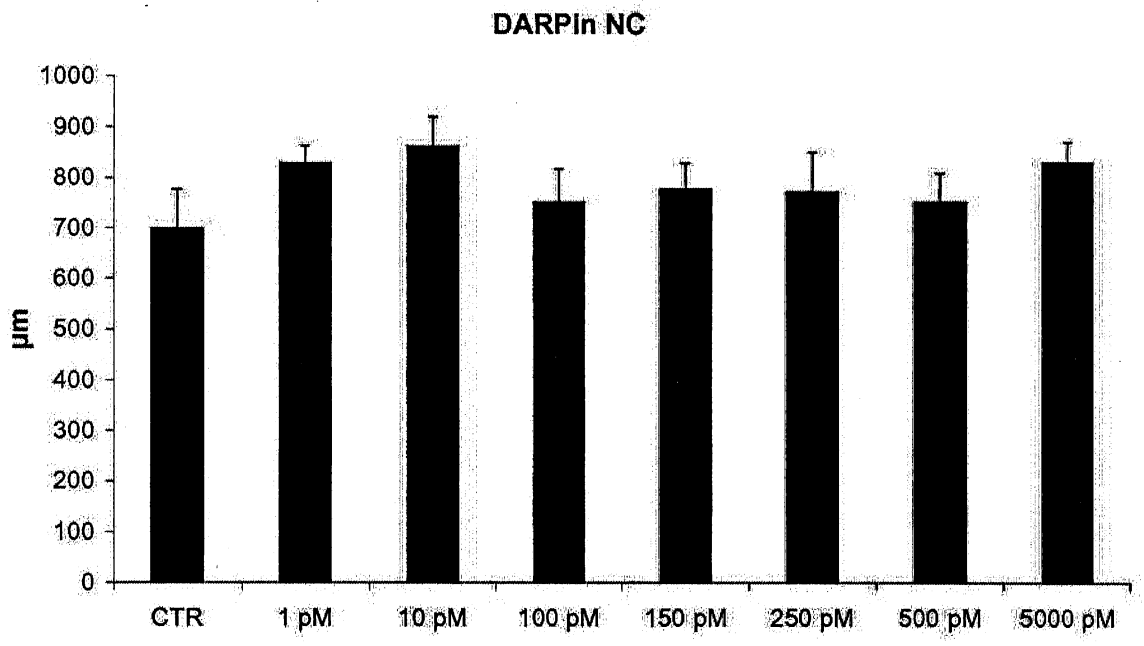

DARPin NC
µm
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
CTR
1 pM
10 pM
100 pM
150 pM
250 pM
500 pM
5000 pM

Fig. 3a

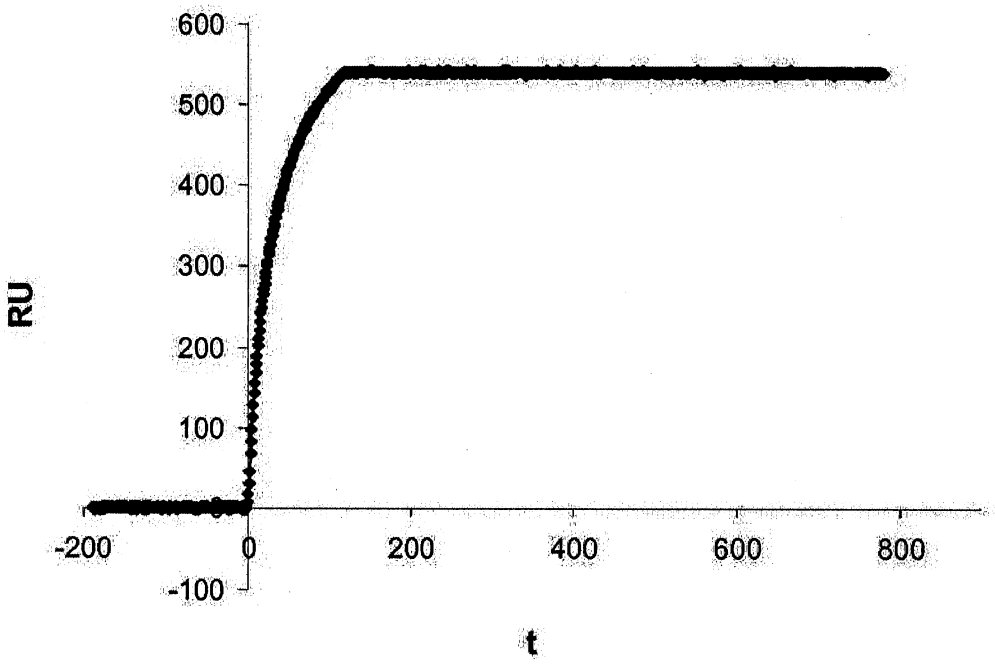

600
500
400
300
200
100
-100
RU
-200
0
200
400
600
800
t

Fig. 3b

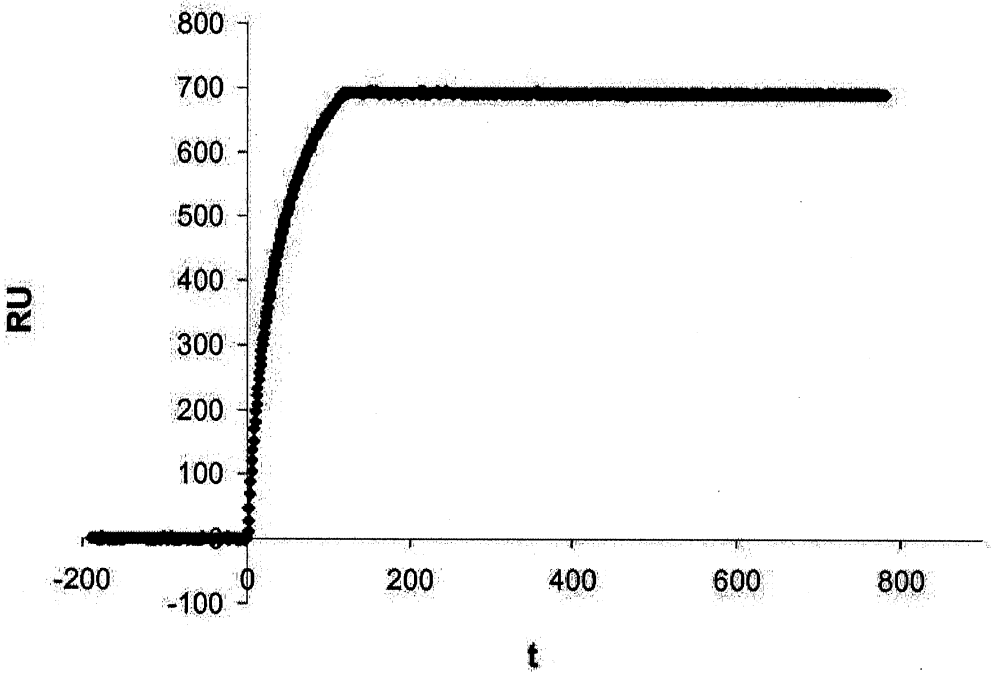

800
700
600
500
400
300
200
100
-100
RU
-200
0
200
400
600
800
t

Fig. 3c

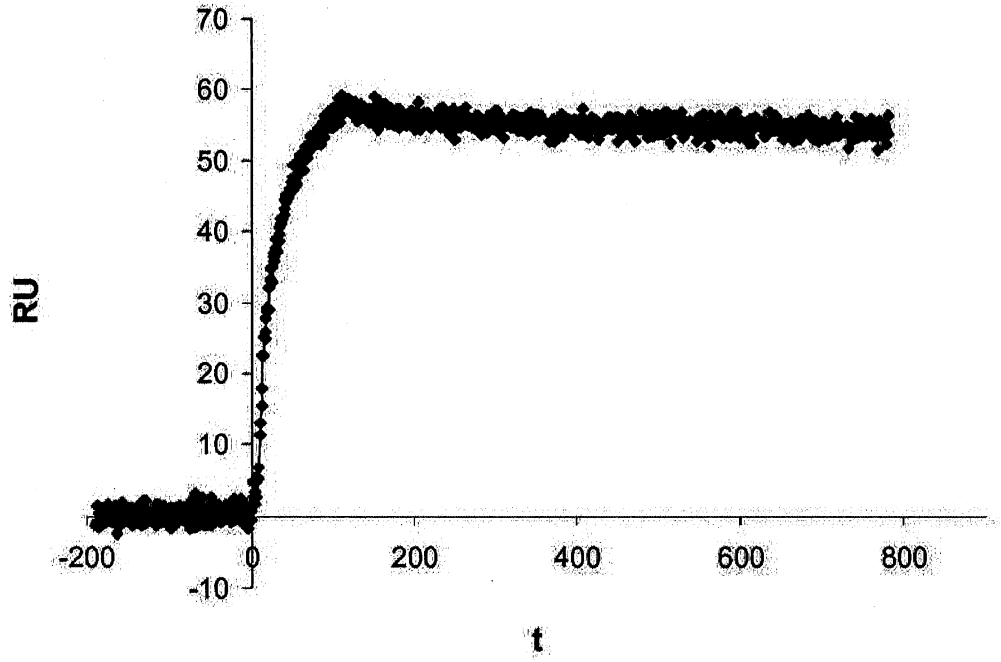

70
60
50
40
30
20
10
-10
RU
-200
0
200
400
600
800
t

Fig. 3d

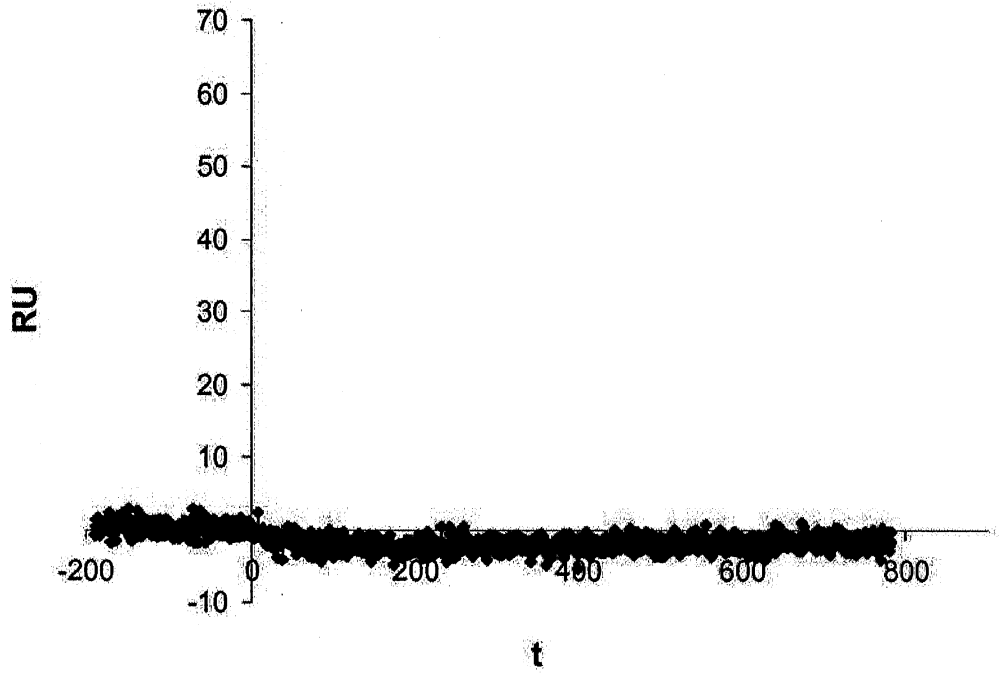
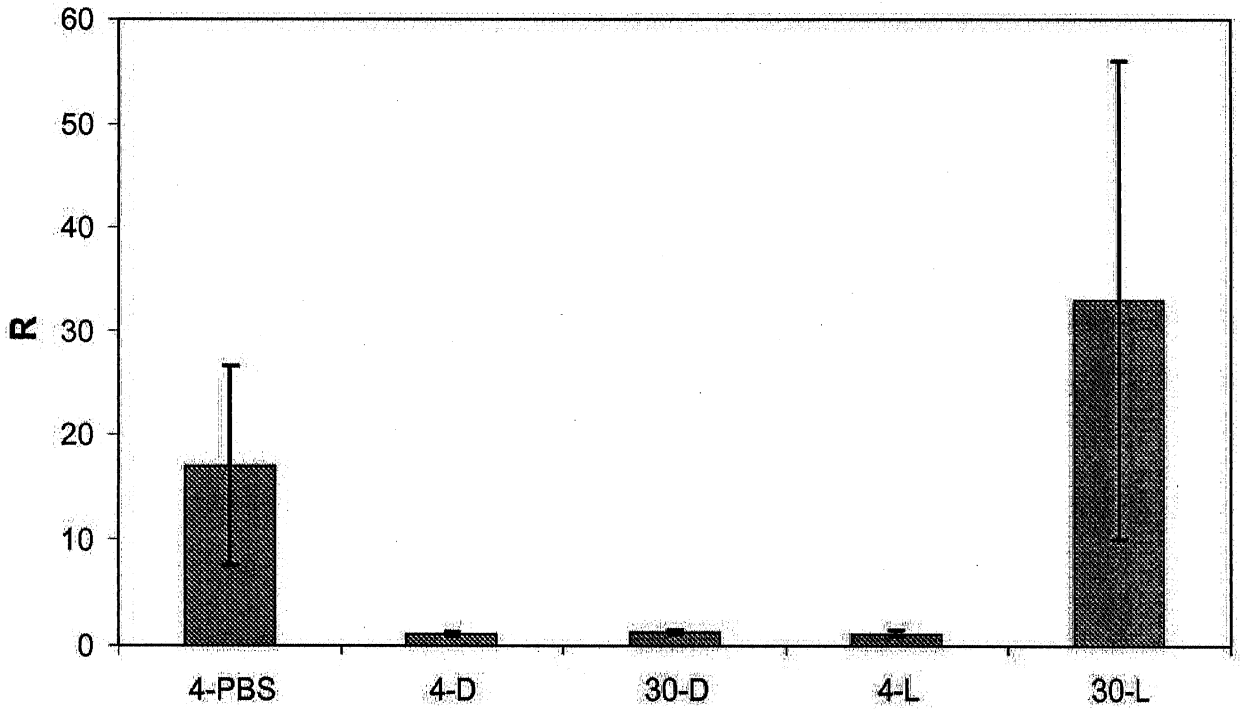

70
60
50
40
30
20
10
-10
RU
-200
0
200
400
600
800
t

Fig. 4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Molecular Partners AG
Binz, Hans Kaspar
Forrer, Patrik
Stumpp, Michael Tobias

<120> Protein gắn kết tái tổ hợp ức chế sự tương tác thụ thể yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF) và dược phẩm chứa chúng

<130> P384A

<150> EP10161685.2
<151> 2010-04-30

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1025
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Protein lặp lại ankyrin

<400> 1

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30

Phe Asp Trp Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Glu Gly
35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60

Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp
65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
85 90 95

Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Leu Gly Arg Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
115 120 125

```
Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
    130                 135                 140

Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Ser
145                 150                 155                 160

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
                165                 170                 175

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
            180                 185                 190

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
        195                 200                 205

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
    210                 215                 220

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
225                 230                 235                 240

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
                245                 250                 255

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala
            260                 265                 270

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
        275                 280                 285

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
    290                 295                 300

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala
305                 310                 315                 320

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
                325                 330                 335

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
            340                 345                 350

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
```

```
        355                 360                 365

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
    370                 375                 380

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
385                 390                 395                 400

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
                405                 410                 415

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
            420                 425                 430

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
        435                 440                 445

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
    450                 455                 460

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
465                 470                 475                 480

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
                485                 490                 495

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
            500                 505                 510

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
        515                 520                 525

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
    530                 535                 540

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
545                 550                 555                 560

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
                565                 570                 575

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
            580                 585                 590
```

```
Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
        595                 600                 605

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
    610                 615                 620

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
625                 630                 635                 640

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
                645                 650                 655

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
            660                 665                 670

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
        675                 680                 685

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
    690                 695                 700

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
705                 710                 715                 720

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
                725                 730                 735

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
            740                 745                 750

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
        755                 760                 765

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
    770                 775                 780

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
785                 790                 795                 800

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
                805                 810                 815

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
            820                 825                 830
```

```
Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu
        835                 840                 845

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
    850                 855                 860

Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
865                 870                 875                 880

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu
                885                 890                 895

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
            900                 905                 910

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
        915                 920                 925

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro
    930                 935                 940

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
945                 950                 955                 960

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
                965                 970                 975

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
            980                 985                 990

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro  Gly Thr Ser Glu Ser  Ala Thr Pro
        995                 1000                1005

Glu Ser  Gly Pro Gly Thr Ser  Thr Glu Pro Ser Glu  Gly Ser Ala
    1010                1015                1020

Pro Gly
    1025
```

<210> 2
<211> 168
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein lặp lại ankyrin

<400> 2

```
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1               5                  10                  15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
            20                  25                  30

Phe Asp Trp Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Glu Gly
        35                  40                  45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
    50                  55                  60

Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp
65                  70                  75                  80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
                85                  90                  95

Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
            100                 105                 110

Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp
        115                 120                 125

Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
    130                 135                 140

Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly
145                 150                 155                 160

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys
                165
```

<210> 3
<211> 135
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Protein lặp lại ankyrin

<400> 3

```
Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
```

```
1               5                   10                  15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
            20                  25                  30

Arg Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Pro Trp Gly
        35                  40                  45

His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
    50                  55                  60

Ala Ala Asp Phe Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Val
65                  70                  75                  80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
                85                  90                  95

Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
            100                 105                 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys
    130                 135
```

<210> 4
<211> 540
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Protein lặp lại ankyrin

<400> 4

```
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1               5                   10                  15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Thr
            20                  25                  30

Ala Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Val Pro Trp Gly
        35                  40                  45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
    50                  55                  60
```

```
Ala Lys Asp Phe Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Ile
65                  70                  75                  80

Gly His Gln Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val
                85                  90                  95

Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
            100                 105                 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
    130                 135                 140

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
145                 150                 155                 160

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
                165                 170                 175

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
            180                 185                 190

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
        195                 200                 205

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
    210                 215                 220

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
225                 230                 235                 240

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
                245                 250                 255

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
            260                 265                 270

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
        275                 280                 285

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
```

```
    290                 295                 300

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
305                 310                 315                 320

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
                325                 330                 335

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
            340                 345                 350

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
        355                 360                 365

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
    370                 375                 380

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
385                 390                 395                 400

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
                405                 410                 415

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
            420                 425                 430

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
        435                 440                 445

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
    450                 455                 460

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
465                 470                 475                 480

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
                485                 490                 495

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
            500                 505                 510

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
        515                 520                 525
```

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
530 535 540

<210> 5
<211> 135
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Protein lặp lại ankyrin

<400> 5

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Val Gly Gln
1 5 10 15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asp Gly Ala Asp Val Asn Ala
20 25 30

Ser Asp Phe Lys Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Gln Gly
35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
50 55 60

Ala Tyr Asp Met Leu Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Leu
65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
85 90 95

Asn Ala Gln Asp Arg Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
100 105 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser
115 120 125

Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys
130 135

<210> 6
<211> 130
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Protein lặp lại ankyrin

<400> 6

```
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Val Arg Ala Gly Gln
1               5                  10                  15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Thr Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
            20                  25                  30

Lys Asp Gln Phe Gly Phe Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala Tyr Asn Gly
        35                  40                  45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
    50                  55                  60

Ala Phe Asp Ile Phe Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Leu
65                  70                  75                  80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val
                85                  90                  95

Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Arg Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
            100                 105                 110

Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Ser Gly
        115                 120                 125

Ser Cys
    130
```

<210> 7
<211> 168
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Protein lặp lại ankyrin

<400> 7

```
Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
1               5                  10                  15

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
            20                  25                  30

Val Asp Tyr Ile Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly
        35                  40                  45
```

```
His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Val Asn
    50                  55                  60

Ala Glu Asp Phe Ala Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Asn
65                  70                  75                  80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
                85                  90                  95

Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
            100                 105                 110

Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
        115                 120                 125

Val Asn Thr Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
    130                 135                 140

Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly
145                 150                 155                 160

Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys
                165
```

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Cầu nối polypeptit

<400> 8

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys
1               5
```

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Cầu nối polypeptit

<400> 9

```
Gly Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys
1               5
```