



(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)



1-0026387

(51)⁸ A61P 25/28; C07K 16/18; A61K 39/00 (13) B

(21) 1-2017-02796

(22) 18/02/2016

(86) PCT/US2016/018419 18/02/2016

(87) WO2016/137811 01/09/2016

(30) 62/121,116 26/02/2015 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2017 357A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) ALVARADO, Alberto (US); DRIVER, David (US); HAYASHI, Mansuo Lu (US);
LU, Jirong (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG TAU, PHÂN TỬ ADN, TẾ BÀO ĐỘNG VẬT
CÓ VÚ CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY, QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng thể kết tụ tau người, quy trình sản xuất và dược phẩm chứa kháng thể kháng tau này. Sáng chế cũng đề cập đến phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa kháng thể này và tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN này. Kháng thể kháng tau theo sáng chế hữu dụng để điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm bệnh Alzheimer, liệt trên nhân tiến triển, và bệnh Pick.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực y tế. Cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng tau, và dược phẩm chứa kháng thể kháng tau này. Kháng thể kháng tau theo sáng chế hữu dụng để điều trị các bệnh thoái hoá thần kinh bao gồm bệnh Alzheimer (Alzheimer's Disease - AD), liệt trên nhân tiến triển (Progressive Supranuclear Palsy - PSP), và bệnh Pick (Pick's Disease PD).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tau là protein liên kết vi cấu trúc hình ống sợi trục mà thúc đẩy sự lắp ghép và ổn định vi cấu trúc hình ống. AD và PSP là các bệnh thoái hoá thần kinh đặc trưng bệnh học bởi sự kết tụ tau bất thường. Cụ thể hơn, ở AD và PSP, tau được phosphoryl hóa ở mức cao được cho là thúc đẩy sự kết tụ sợi tau không tan dẫn đến làm mất ổn định vi cấu trúc hình ống, và độc tính neuron. Các nghiên cứu trên giống nuôi cấy tế bào và mô hình chuột đã thể hiện rằng các đám tau kết tụ trải rộng qua các mối nối khớp thần kinh và tau đơn phân tách rời (tự nhiên hoặc không kết tụ), gây ra sự hình thành đám tau kết tụ. Sự tiến triển về mặt giải phẫu thần kinh học của sự kết tụ và tích tụ tau ở các bệnh thoái hoá thần kinh như AD và PSP cho thấy rằng sự kết tụ sợi lan truyền theo các mạng lưới neuron, cuối cùng dẫn đến làm mất ổn định vi cấu trúc hình ống và cuối cùng khoanh vùng chức năng neuron suy giảm.

Mật độ và sự khoanh vùng giải phẫu thần kinh ở sự kết tụ tau có liên quan mật thiết đến các triệu chứng thần kinh học và sự tiến triển của bệnh AD và PSP. Chẳng hạn, ở bệnh AD, tau tạo ra các đám rối sợi thần kinh trong neuron (intraneuronal neurofibrillary tangles - NFT), mà có xu hướng phát triển theo trật tự từ vùng transentorhinal, đến vùng hệ viền (limbic), đến vùng vỏ não mới (neocortical), và có liên quan đến mức độ nghiêm trọng của chứng sa sút trí tuệ và phạm vi mất neuron. Ở bệnh PSP, sự kết tụ tau được thấy trong các neuron, tế bào hình sao, và tế bào thần kinh đệm ít gai trong vùng dưới vỏ não và vỏ não, và mật độ tau kết tụ đã thể hiện là có liên quan đến mức độ nghiêm trọng sự chứng mất neuron.

Các kháng thể kháng tau là đã biết. Chẳng hạn, sáng chế Mỹ số 8,926,974, và công bố đơn quốc tế số WO2011/026031, WO2012/049570, và WO2013/050567 bộc lộ các kháng thể kháng tau và việc sử dụng các kháng thể kháng tau để điều trị các bệnh thoái hoá thần kinh như AD. WO 2014/100600 mô tả các kháng thể đặc hiệu tau người và việc sử dụng chúng trong dược phẩm và chế phẩm để chẩn đoán.

WO 2014/059442 mô tả các kháng thể nhận biết tau oligome một cách đặc hiệu nhưng không liên kết với tau monome, tau dạng sợi hoặc các dạng không liên quan đến bệnh của tau.

WO 2012/149365 mô tả các kháng thể chọn lọc đối với các dime tau bệnh lý và việc sử dụng chúng trong điều trị, chẩn đoán và theo dõi các bệnh liên quan đến tau.

D.L. Castillo-Carranza và các đồng tác giả, "Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles", Vol. 34, no.12, 19 tháng 3 năm 2014, trang 4260-4272 mô tả việc gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể đơn dòng kháng oligome Tau. Tài liệu này thảo luận về vai trò của các oligome tau trong sự tiến triển bệnh và tính hợp lệ làm đích điều trị của các oligome tau đối với bệnh Alzheimer.

Tuy nhiên, cho đến nay chưa có kháng thể hướng đích tau nào được chấp thuận để sử dụng trong điều trị và hiện không có liệu pháp điều biến bệnh nào được phê chuẩn đối với AD hoặc PSP. Do đó, vẫn còn nhu cầu về các kháng thể kháng tau khác. Cụ thể, vẫn còn nhu cầu về các kháng thể kháng tau mà liên kết đặc hiệu với các thể kết tụ tau và giảm lan truyền sự hình thành kết tụ tau, hình thành NFT và sự mất noron. Các kháng thể kháng tau như vậy tốt hơn cũng có các đặc tính lý hóa tốt để tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển, sản xuất, và/hoặc bào chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể đơn dòng liên kết với tau người và chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light chain variable region - LCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable region - HCVR), trong đó LCVR chứa các vùng quyết định bổ cứu (complementarity determining region - CDR) LCDR1, LCDR2 và LCDR3 và HCVR chứa các CDR HCDR1, HCDR2 và HCDR3. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, trình tự axit amin của LCDR1 được nêu trong SEQ ID NO.3, trình tự axit amin của LCDR2 được nêu trong SEQ ID NO.4,

trình tự axit amin của LCDR3 được nêu trong SEQ ID NO.5, trình tự axit amin của HCDR1 được nêu trong SEQ ID NO.6, trình tự axit amin của HCDR2 được nêu trong SEQ ID NO.7, và trình tự axit amin HCDR3 được nêu trong SEQ ID NO.8.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng liên kết với tau người, chứa LCVR và HCVR, trong đó trình tự axit amin của LCVR được nêu trong SEQ ID NO.9 và trình tự axit amin của HCVR được nêu trong SEQ ID NO. 10. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng liên kết với tau người, chứa chuỗi nhẹ (light chain - LC) và chuỗi nặng (heavy chain- HC), trong đó trình tự axit amin của LC được nêu trong SEQ ID NO.1 và trình tự axit amin của HC được nêu trong SEQ ID NO.2.

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng mà liên kết với tau người. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng mà liên kết với epitop cấu hình của tau người. Theo một phương án cụ thể, epitop cấu hình của tau người bao gồm các gốc axit amin 7-9 và 312-322 của tau người, trong đó trình tự axit amin của tau người được nêu trong SEQ ID NO.13.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Ngoài ra, bản mô tả bộc lộ phương pháp điều trị AD, PSP, hoặc PD bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng được phẩm theo sáng chế.

Ngoài ra, bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị các bệnh thoái hoá thần kinh. Cụ thể hơn, bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp điều trị AD, PSP, hoặc PD bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể đơn dòng theo sáng chế để sử dụng trong điều trị. Cụ thể hơn, sáng chế cũng đề xuất kháng thể đơn dòng theo sáng chế để sử dụng trong điều trị AD, PSP, hoặc PD.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể đơn dòng theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị AD, PSP, hoặc PD.

Sáng chế cũng đề cập đến phân tử axit nucleic và vector biểu hiện mã hóa kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử ADN

chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.2. Theo một phương án cụ thể, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1 được nêu trong SEQ ID NO.11 và trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.2 được nêu trong SEQ ID NO.12.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN theo sáng chế trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể đơn dòng chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.

Hơn nữa, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được tạo ra theo quy trình, trong đó quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.1 và trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO.2, trong điều kiện sao cho kháng thể đơn dòng được biểu hiện, và bước thu hồi từ tế bào chủ này kháng thể đơn dòng chứa LC và HC, trong đó trình tự axit amin của LC được nêu trong SEQ ID NO.1 và trình tự axit amin của HC được nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng theo sáng chế để sử dụng trong điều trị.

Tốt hơn, nếu kháng thể đơn dòng theo sáng chế là để sử dụng trong điều trị bệnh được chọn từ bệnh Alzheimer, bệnh liệt trên nhân tiến triển và bệnh Pick.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả, “kháng thể” là phân tử globulin miễn dịch chứa 2 HC và 2 LC được liên kết liên phân tử bằng các liên kết disulfua. Phần tận cùng amin của mỗi LC và HC bao gồm vùng biến đổi gồm khoảng 100-120 axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm nhận biết kháng nguyên qua các CDR nằm trong đó. Các vùng CDR nằm xen kẽ với các vùng bảo tồn hơn gọi là các vùng khung (framework region - “FR”). Mỗi LCVR và HCVR gồm 3 CDR và 4 FR, được sắp xếp từ đầu tận vùng amino đến

đầu tận cùng carboxy theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 3 CDR của LC được gọi là “LCDR1, LCDR2, và LCDR3,” và 3 CDR của HC được gọi là “HCDR1, HCDR2, và HCDR3.” Các CDR chứa hầu hết các gốc mà tạo ra các tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Chức năng liên kết của kháng thể với kháng nguyên cụ thể bị ảnh hưởng nhiều bởi sáu CDR. Việc gán các axit amin vào các miền CDR nằm trong vùng LCVR và HCVR của kháng thể theo sáng chế dựa trên quy tắc đánh số Kabat nổi tiếng (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), và quy tắc đánh số North (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)).

Các LC được phân loại là kappa hoặc lambda, mỗi chuỗi này đặc trưng bởi vùng hằng định cụ thể đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm các LC kappa. Các HC được phân loại là gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và lần lượt xác định các kiểu tương đương của kháng thể là IgG, IgM, IgA, IgD, hoặc IgE. Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm các HC IgG. Các kháng thể IgG có thể được chia tiếp thành các phân lớp, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Theo một phương án cụ thể, các kháng thể đơn dòng theo sáng chế là IgG4. Phần tận cùng bằng carboxy của mỗi HC định ra vùng hằng định chủ yếu chịu trách nhiệm về chức năng tác động. Theo một phương án cụ thể, các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có một hoặc nhiều cải biến trong vùng hằng định của mỗi HC làm giảm chức năng tác động. Theo một phương án cụ thể hơn, các kháng thể đơn dòng theo sáng chế là IgG4 và có các cải biến trong vùng hằng định của cả hai HC mà làm giảm chức năng tác động bao gồm axit amin alanin ở cả hai gốc 230 và 231 (việc đánh số gốc dựa trên HC làm ví dụ có SEQ ID NO.2). Theo một phương án cụ thể hơn nữa, các kháng thể đơn dòng theo sáng chế là IgG4 và có các cải biến trong vùng hằng định của cả hai HC mà làm giảm chức năng tác động bao gồm axit amin alanin ở cả hai gốc 230 và 231 và có các cải biến khác trong vùng hằng định của cả hai HC thúc đẩy sự ổn định bao gồm axit amin prolin ở gốc 224 và sự khuyết axit amin lysin ở gốc 443 (việc đánh số gốc dựa trên HC làm ví dụ có SEQ ID NO.2).

Các kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng (“mAbs”). Các mAb theo sáng chế là các mAb hoàn toàn chứa 2 HC và 2 LC. Như được đề cập trong bản mô tả,

các mAb là các kháng thể thu được từ bản sao hoặc dòng duy nhất bao gồm, chẳng hạn, dòng sinh vật nhân điển hình, dòng sinh vật nhân nguyên thủy hoặc dòng thể thực khuẩn, và không phải là phương pháp tạo ra dòng này. Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra, chẳng hạn, bằng các công nghệ lai, công nghệ tái tổ hợp, công nghệ biểu hiện bằng thể thực khuẩn, công nghệ tổng hợp, ví dụ, ghép CDR, hoặc sự kết hợp của các công nghệ như vậy hoặc các công nghệ khác đã biết trong lĩnh vực này.

Phương pháp sản xuất và tinh chế kháng thể đã được biết rõ trong lĩnh vực này và có thể xem trong, chẳng hạn, Harlow and Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y., chapters 5-8 and 15, ISBN 0-87969-314-2. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch bằng cặp sợi xoắn ốc (paired helical filaments - "PHF") của tau người từ mô não của bệnh nhân được xác định là mắc AD (Jicha et al., *J. Neurosci. Res.*, 15:48(2), 128-132 (April, 1997)), và kháng thể thu được có thể được thu hồi, tinh chế, và các trình tự axit amin được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế được thiết kế di truyền để chứa một hoặc nhiều vùng khung của người bao quanh các CDR thu được từ kháng thể không phải của người. Các trình tự dòng mầm vùng khung của người có thể mua được từ hãng ImMunoGeneTics (INGT) qua trang mạng của họ, <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ *The Immunoglobulin FactsBook* của Marie-Paule Lefranc và Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, các vùng khung HC và vùng khung LC dòng mầm cụ thể để sử dụng trong kháng thể đơn dòng theo sáng chế lần lượt bao gồm 5-51 và A27.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, kháng thể, hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể, được tạo ra ở dạng phân lập. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân lập" chỉ protein, peptit hoặc axit nucleic không chứa hoặc hầu như không chứa các đại phân tử khác được phát hiện trong môi trường tế bào.

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sản xuất và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Chẳng hạn, các trình tự cADN mã hóa HC (ví dụ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO.2) và LC (ví dụ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO.1) có thể được tách dòng và đưa vào vector biểu hiện GS (glutamin synthetaza). Vector biểu hiện globulin miễn dịch được thiết kế di truyền sau đó có thể được chuyển nhiễm ổn định vào các tế bào CHO. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh

vực này sẽ thấy được rằng việc biểu hiện kháng thể ở động vật có vú sẽ dẫn đến sự glycosyl hóa, tiêu biểu là ở các vị trí N-glycosyl hóa bảo tồn cao trong vùng Fc. Các dòng ổn định có thể được biến đổi để biểu hiện kháng thể liên kết đặc hiệu với các thể kết tụ tau. Các dòng dương tính có thể được nhân rộng trong môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh để sản xuất kháng thể trong thiết bị phản ứng sinh học. Môi trường, mà kháng thể được tiết vào đó, có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, môi trường này có thể được đưa lên cột Protein A hoặc G Sepharose FF mà đã được cân bằng với dung dịch đệm tương thích, như dung dịch muối đệm phosphat một cách thuận tiện. Cột được rửa để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể gắn kết được giải hấp, chẳng hạn, bằng gradien pH và các phân đoạn kháng thể được phát hiện, như bằng phương pháp SDS-PAGE, và sau đó gộp chung lại. Kháng thể có thể được cô đặc và/hoặc lọc vô trùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Thể kết tụ và các multimer hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi ion, hoặc sắc ký hydroxyapatit. Sản phẩm có thể được làm lạnh đông ngay, chẳng hạn ở -70°C hoặc có thể được đông khô.

Các kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân. Cụ thể hơn, các kháng thể theo sáng chế được trình bày là điều trị được nhóm các rối loạn thoái hóa thần kinh, gọi là bệnh lý tau, bao gồm AD, PSP, và PD. Mặc dù các kháng thể đơn dòng theo sáng chế được trình bày là hữu dụng trong điều trị AD, PSP, và PD, các kháng thể như vậy cũng có thể hữu dụng trong điều trị các bệnh lý tau khác, bao gồm bệnh não do chấn thương mạn tính. Như được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả, “sự điều trị” và/hoặc “việc điều trị” và/hoặc “điều trị” được dự định để chỉ tất cả các quy trình trong đó có thể có việc làm chậm, làm gián đoạn, làm ngừng, kiểm soát, chấm dứt, hoặc đảo ngược sự tiến triển của các rối loạn được mô tả trong bản mô tả, nhưng không nhất thiết là việc loại bỏ hoàn toàn tất cả các triệu chứng của rối loạn. Việc điều trị bao gồm việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở người mà có thể có lợi từ việc giảm sự lan truyền của ít nhất một trong số sự hình thành thể kết tụ tau, sự hình thành NFT và sự mất neuron, và bao gồm: (a) việc ức chế tiến triển tiếp theo của bệnh, tức là, làm ngừng sự phát triển của bệnh; và (b) làm thuyên giảm bệnh, tức là làm cho bệnh hoặc rối loạn thoái triển hoặc làm giảm các triệu chứng hoặc biến chứng của chúng.

Như được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả, thuật ngữ “bệnh nhân,” “đối tượng,” và “cá thể,” chỉ người. Theo các phương án nhất định, bệnh nhân còn đặc trưng bởi bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh lý (ví dụ, rối loạn thoái hoá thần kinh) mà có thể có lợi từ việc giảm sự lan truyền của ít nhất một trong số sự hình thành thể kết tụ tau, sự hình thành NFT, và sự mất noron. Theo một phương án khác, bệnh nhân còn đặc trưng bởi nguy cơ phát triển bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng bệnh lý thoái hoá thần kinh mà có thể có lợi từ việc giảm sự lan truyền của ít nhất một trong số sự hình thành thể kết tụ tau, sự hình thành NFT, và sự mất noron.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “liên kết” tau chỉ tương tác của kháng thể với epitop của thể kết tụ tau người. Tốt hơn, nếu epitop là epitop cấu hình của tau người. Theo một phương án cụ thể, thuật ngữ “liên kết” tau chỉ tương tác với epitop cấu hình bao gồm các gốc axit amin 7-9 và 312-322 của thể kết tụ tau người (việc đánh số gốc dựa trên tau người làm ví dụ có SEQ ID NO.13). Cần hiểu rằng có các biến thể đã biết của protein tau người, ví dụ thu được từ các biến thể ghép nối. Tuy nhiên, các biến thể đã biết như vậy có epitop cấu hình bao gồm các gốc axit amin 7-9 và 312-322 của SEQ ID NO.13. Tuy nhiên, các biến thể đã biết có thể dẫn đến thay đổi việc đánh số gốc đối với các gốc axit amin 7-9 và 312-322 của SEQ ID NO.13. Mặc dù việc đánh số gốc có thể thay đổi ở một số biến thể, các axit amin chứa epitop vẫn giống nhau. Thuật ngữ “epitop” như được sử dụng ở đây chỉ các vị trí ba chiều riêng biệt trên kháng nguyên mà được nhận diện bởi các kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm, mà có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này và chứa kháng thể đơn dòng theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang và/hoặc chất pha loãng dược dụng (ví dụ, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012, tài liệu này tóm tắt các kỹ thuật bào chế thường đã biết đối với nhà bào chế). Các chất mang thích hợp dùng cho dược phẩm bao gồm nguyên liệu bất kỳ, mà khi được kết hợp với kháng thể đơn dòng theo sáng chế, vẫn giữ được hoạt tính của phân tử này và không tác động tới hệ miễn dịch của bệnh nhân.

Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân có nguy cơ, hoặc thể hiện bệnh hoặc rối loạn mô tả trên đây qua các đường ngoài tiêu hóa (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong bắp, hoặc qua da). Dược phẩm theo sáng chế chứa lượng “hữu hiệu” hoặc lượng “hữu hiệu điều trị”,

nếu được sử dụng thay đổi lẫn nhau trong bản mô tả, kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Lượng hữu hiệu chỉ lượng cần thiết (theo liều và trong các khoảng thời gian và cho các phương pháp sử dụng) để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng hữu hiệu của kháng thể đơn dòng có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và thể trọng của cá thể, và khả năng tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể của kháng thể đơn dòng. Lượng hữu hiệu cũng là lượng mà trong đó các tác dụng độc hoặc bất lợi bất kỳ của kháng thể đơn dòng theo sáng chế nhỏ hơn rất nhiều so với các tác dụng có lợi trong điều trị.

Kháng thể kháng tau được thiết kế di truyền

Khi tạo ra kháng thể kháng tau theo sáng chế, các vấn đề quan trọng về độ ổn định hóa học và vật lý được tính đến. Các vấn đề được tính đến bao gồm ái lực liên kết thấp, tính sinh miễn dịch, sự kết tụ, sự dime hóa HC, cũng như sự khử amit, sự oxy hóa, sự đồng phân hóa và sự tháo cuộn vùng biến đổi.

Chẳng hạn, kháng thể IgG1 chuột MC-1 ("MC-1") (Albert Einstein College of Medicine, Jicha et al., 1997), mà nhận biết epitop cấu hình của protein tau ở các gốc axit amin 7-9 và 312-322 (việc đánh số gốc dựa trên protein tau người làm ví dụ có trình tự axit amin SEQ ID NO.13), đầu tiên được làm giống như của người bằng cách thiết kế ba CDR của HC của MC-1 chuột vào nhiều gen dòng mầm vùng khung HC người và ba CDR của LC của MC-1 chuột vào nhiều gen dòng mầm vùng khung LC người. Các cấu trúc đã làm giống như của người của MC-1 sử dụng 96 tổ hợp khác nhau của các vùng khung chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, đại diện cho từng họ trong số mười hai họ dòng mầm vùng khung HC (các vùng khung HC người cụ thể: 1-24, 1-46, 1-69, 2-05, 3-15, 3-23, 3-53, 3-72, 4-04, 4-39, 5-51, và 6-01) và từng họ trong số tám họ dòng mầm LC (các vùng khung LC người cụ thể: A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12, O11, và O-2). Các gen dòng mầm vùng khung tương ứng được tách dòng vào vector biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ IgG4 người và chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293 để biểu hiện và phân tích liên kết bằng ELISA. Mặc dù nhiều cặp vùng khung thể hiện một số mức độ liên kết với tau người theo ELISA, các cấu trúc kháng thể thu được thể hiện vô số các vấn đề bao gồm ái lực liên kết yếu, sự kết tụ, sự dime hóa HC, và các vấn đề về độ ổn định hóa học như sự khử amit, sự oxy hóa, và sự đồng phân hóa ở các vùng biến đổi.

Do đó, các cải biến được thiết kế di truyền để phát triển kháng thể kháng tau có ái lực liên kết tốt hơn, loại trừ hoặc làm giảm sự dime hóa HC, giảm tính sinh miễn dịch, và độ ổn định hóa học và vật lý tốt hơn. Các cải biến về axit amin (tương ứng với MC-1, Jicha et al., 1997) được đưa vào HCDR2 và HCDR3, và LCDR1, LCDR2, và LCDR3. Kháng thể chuột đã cải biến được làm giống như của người bằng cách đưa ba CDR của HC vào nhiều gen dòng mầm vùng khung HC người và ba CDR của LC vào nhiều gen dòng mầm vùng khung LC người chủ yếu như được mô tả trên đây. Hơn nữa, các nghiên cứu sâu rộng về độ ổn định của protein được thực hiện và các kháng thể đơn dòng được thiết kế di truyền được sàng lọc để biểu hiện và các đặc tính bền nhiệt cũng như các đặc tính về ái lực liên kết. Kháng thể đơn dòng chứa bảy đột biến CDR (vị trí axit amin dựa trên cách đánh số gốc axit amin thẳng của kháng thể làm ví dụ theo sáng chế nêu trong bảng 1: HCDR2 ở N61E và E62K; HCDR3 ở P103V và Y105D; LCDR1 ở G34Q; LCDR2 ở S57D; và LCDR3 ở H98L) được xác định là có ái lực liên kết, độ ổn định hóa học và vật lý cải thiện, và tính sinh miễn dịch đối với các kháng thể đơn dòng theo sáng chế (tương ứng với MC-1, Jicha et al., 1997). Không có cải biến nào trên đây được xác định trong đặc tính của MC-1 hoặc của các cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người.

Kháng thể đơn dòng kháng tau được thiết kế di truyền làm ví dụ theo sáng chế được thể hiện trong bảng 1. Kháng thể đơn dòng kháng tau được thiết kế di truyền làm ví dụ bao gồm vùng khung HC người 5-51 và vùng khung LC người A27. Mỗi quan hệ giữa nhiều vùng khác nhau trong kháng thể đơn dòng kháng tau được thiết kế di truyền làm ví dụ là như sau (việc đánh số các axit amin áp dụng cách đánh số thẳng; việc gán các axit amin vào các miền biến đổi dựa trên hệ thống International Immunogenetics Information System® có trên trang mạng www.imgt.org; việc gán các axit amin vào các miền CDR dựa trên quy tắc đánh số North nổi tiếng, trừ việc đánh số HCDR2 dựa trên quy tắc đánh số Kabat nổi tiếng):

Bảng 1: Các vùng axit amin của kháng thể đơn dòng kháng tau được thiết kế di truyền làm ví dụ theo sáng chế.

SEQ ID NO:2			SEQ ID NO:1		
HCVR	Vùng	Vị trí	LCVR	Vùng	Vị trí
	FRH1	1-22		FRL1	1-23
	HCDR1	23-35		LCDR1	24-39
	FRH2	36-49		FRL2	40-53
	HCDR2	50-66		LCDR2	54-61
	FRH3	67-96		FRL3	62-93
	HCDR3	97-105		LCDR3	94-102
	FRH4	106-116		FRL4	103-112
Vùng hằng định	CH	117-442	Vùng hằng định	CL	113-219

Các ví dụ và thử nghiệm sau đây chứng tỏ rằng các kháng thể đơn dòng theo sáng chế hữu dụng để điều trị các rối loạn thoái hoá thần kinh có liên quan đến sự lan truyền các thể kết tụ tau như AD, PSP, hoặc PD. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, các ví dụ sau được đưa ra chỉ để minh họa và không mang tính giới hạn, và người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực có thể tiến hành các cải biến khác nhau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Biểu hiện kháng thể kháng Tau được thiết kế di truyền

Các kháng thể đơn dòng kháng tau được thiết kế di truyền theo sáng chế có thể được biểu hiện và tinh chế chủ yếu như sau. Vector biểu hiện glutamin synthetaza (GS) chứa trình tự ADN SEQ ID NO.11 (mã hóa trình tự axit amin LC SEQ ID NO.1) và trình tự ADN SEQ ID NO.12 (mã hóa trình tự axit amin HC SEQ ID NO.2) được dùng để chuyển nhiễm dòng tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO) bằng phương pháp điện chuyển. Vector biểu hiện mã hóa đoạn khởi đầu SV Early (virus Simian 40E) và gen GS. Việc biểu hiện GS cho phép tổng hợp hóa sinh glutamin, một axit amin cần thiết cho các tế bào CHO. Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được

sàng lọc lượng lớn bằng 50 μ M L-methionin sulfoximin (MSX). Khả năng ức chế GS của MSX được sử dụng để tăng tính nghiêm ngặt của việc sàng lọc. Các tế bào có sự tích hợp cADN vector biểu hiện vào vùng có hoạt tính phiên mã của hệ gen tế bào chủ có thể được chọn so với các tế bào CHO kiểu hoang dại, mà biểu hiện mức GS nội sinh. Sản phẩm chuyển nhiễm góp chung được đưa vào đĩa với mật độ thấp để các tế bào biểu hiện ổn định sinh trưởng nhanh chóng gần như thành dòng vô tính. Các giếng trội được sàng lọc về mức biểu hiện kháng thể và sau đó nhân lên trong môi trường nuôi cấy dạng huyền phù không chứa huyết thanh cần dùng để sản xuất. Môi trường đã cạn trong mà kháng thể tiết vào đó được đưa lên cột ái lực Protein A mà đã được cân bằng bằng dung dịch đệm tương hợp, như nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4). Cột này được rửa bằng NaCl 1M để loại bỏ các thành phần liên kết không đặc hiệu. Kháng thể đơn dòng kháng tau được giải hấp, ví dụ, bằng natri xitrat ở độ pH (khoảng) 3,5 và các phân đoạn được trung hòa bằng dung dịch đệm Tris 1M. Các phân đoạn kháng thể đơn dòng kháng tau được phát hiện, chẳng hạn bằng SDS-PAGE hoặc sắc ký phân tích loại trừ theo kích thước, và sau đó góp chung lại. Thể kết tụ và các multime hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi ion, hoặc sắc ký hydroxyapatit. Kháng thể đơn dòng kháng tau theo sáng chế được cô đặc và/hoặc lọc vô khuẩn bằng các kỹ thuật thông thường. Độ tinh khiết của kháng thể đơn dòng kháng tau sau các bước sắc ký này lớn hơn 95%. Kháng thể đơn dòng kháng tau theo sáng chế có thể được làm lạnh đông ngay ở -70°C hoặc bảo quản ở 4°C trong vài tháng.

Động học và ái lực liên kết

Thử nghiệm cộng hưởng từ bề mặt (Surface Plasmon Resonance - SPR), đo bằng thiết bị BIACORE® 2000 (mồi bằng dung dịch đệm chạy HBS-EP+ (GE Healthcare, 10 mM Hepes độ pH=7,4 + 150 mM NaCl + 3 mM EDTA + 0,05% chất hoạt động bề mặt P20) ở 25°C), được sử dụng để xác định liên kết của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 với cả tau monome (ví dụ, tau tự nhiên hoặc không kết tụ) và các thể kết tụ tau người (đều có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:13). Liên kết của cấu trúc kháng thể MC-1 đã làm giống như của người (có tổ hợp vùng khung: chuỗi nặng 5-51, chuỗi nhẹ A27) với tau monome và thể kết tụ tau người được xác định theo cùng phương pháp.

Trừ việc tất cả các chất phản ứng và nguyên liệu là từ hãng BIACORE® AB (Uppsala, Sweden) như đã lưu ý. Chip CM5 chứa protein A cố định (được tạo ra bằng phản ứng kết hợp amin NHS-EDC chuẩn) trên cả bốn ô lưu lượng (flow cell - FC) được sử dụng để dùng phương pháp bắt giữ. Các mẫu kháng thể được chuẩn bị ở nồng độ 0,5µg/mL bằng cách pha loãng vào dung dịch đệm chạy. Tau monome và tau dạng sợi được chuẩn bị ở nồng độ 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,82, 3,91, 1,95, và 0 (mẫu trắng) nM bằng cách pha loãng vào dung dịch đệm chạy. Mỗi chu trình phân tích bao gồm: (1) bắt giữ các mẫu kháng thể trên các ô lưu lượng riêng rẽ (FC2, FC3, và FC4); (2) bơm 250µL (300 giây) tau monome hoặc thể kết tụ tau qua FC tương ứng ở tốc độ 50 µL/phút; (3) trở lại dòng đệm trong 20 phút để theo dõi pha phân ly; (4) tái tạo bề mặt chip bằng cách bơm 25 µL (30 giây) glyxin, độ pH=1,5; (5) cân bằng bề mặt chip bằng cách bơm 50 µL (60 giây) HBS-EP+.

Dữ liệu liên kết của thể kết tụ tau được xử lý bằng cách sử dụng tham chiếu kép tiêu chuẩn và khớp với mô hình liên kết 1:1 bằng phần mềm Biacore 2000 Evaluation, phiên bản 4.1, để xác định tốc độ kết hợp (k_{on} , đơn vị $M^{-1}s^{-1}$), tốc độ phân ly (k_{off} , đơn vị s^{-1}), và R_{max} (đơn vị RU). Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính toán từ hệ thức $K_D = k_{off}/k_{on}$, và có đơn vị là phân tử mol/L. Dữ liệu liên kết của tau monome không thể xác định chính xác được bằng SPR như mô tả trên đây do tốc độ kết hợp và phân ly nhanh. Do đó, K_D đối với liên kết của tau monome thu được bằng cách sử dụng mô hình khớp liên kết ở trạng thái tĩnh từ việc xây dựng đồ thị nồng độ kháng nguyên theo đơn vị đáp ứng. Dữ liệu liên kết thu được được nêu trong bảng 2.

Bảng 2: Dữ liệu liên kết SPR đối với cả tau người dạng monome và thể kết tụ tau.

		k_{on} (Đơn vị $M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (Đơn vị $M^{-1}s^{-1}$)	K_D^* (nM)
mAb kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1	Tau monome	Không phát hiện được	Không phát hiện được	235
	Thể kết tụ tau	4,59e4	<1e-5	<0,22
Cấu trúc kháng thể MC-1 đã làm giống như của người	Tau monome	Không được xác định	Không được xác định	550
	Thể kết tụ tau	5,75e4	1,02e-4	1,77

*Kết quả K_D được xem là tương đối vì kết quả không được chuẩn hóa cho ảnh hưởng của khả lực.

Kết quả được nêu trong bảng 2 chứng tỏ rằng kháng thể đơn dòng tau theo ví dụ 1 không có liên kết đo được với tau monome để có thể xác định chính xác giá trị ái lực bằng phép phân tích Biacore (do tốc độ kết hợp và tốc độ phân ly nhanh). Trái lại, kết quả được nêu trong bảng 2 chứng tỏ rằng kháng thể đơn dòng kháng tau theo ví dụ 1 có ái lực với thể kết tụ tau tốt hơn so với cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người.

Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay - ELISA) được dùng để xác định ái lực liên kết tương đối của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 với các sợi tau kết tụ từ dịch đồng thể não AD. Dịch đồng thể não AD được chuẩn bị từ khoảng 80g vỏ não từ não của bệnh nhân AD. Một cách vắn tắt, dung dịch đệm (hỗn hợp chất ức chế proteaza TBS/1mM PMSF/1X Complete® (Roche, p/n. 11 697 498 001) và chất ức chế phosphataza (ThermoFischer, p/n. 78428)) được bổ sung vào mô não AD ở khoảng 10ml/1g (mô). Mô này được đồng hóa bằng thiết bị Kinematica Polytron cầm tay ở tốc độ 6-7. Sau đó mô này được đồng hóa tiếp bằng Parr Bomb (Parr Instrument, p/n. 4653) ở áp suất nitơ 1500 psi trong 30 phút. Dịch đồng thể được ly tâm ở 28.000g (rôto J14 Beckman) trong 30 phút ở 4°C. Dịch nuôi cấy nổi được thu gom, gộp chung và chạy qua cột giữ cao 4 cm Sepharose 400 Superflow để loại bỏ các mảnh vụn lớn hơn, sau đó chạy qua cột MC1-Affigel 10 dung tích 25 ml ở tốc độ dòng 50 - 60 ml một giờ, để tinh chế các sợi tau liên kết MC1. Để tối đa hóa tỷ lệ thu hồi ở bước tinh chế, các dịch nổi được tái sử dụng qua cột MC-1 trong vòng 18-20 giờ ở 4°C. Cột giữ được loại bỏ và cột MC1 được rửa bằng TBS với lượng ít nhất 40 lần thể tích cột. Các thể kết tụ tau liên kết sau đó được giải hấp bằng 2 thể tích cột KSCN 3M, thu gom thành các phân đoạn 1 ml. Nồng độ protein trong mỗi phân đoạn được giải hấp được kiểm tra bằng thử nghiệm Bradford đĩa vi chuẩn độ. Các phân đoạn chứa mức protein dương được gộp chung, cô đặc thành khoảng 2ml bằng thiết bị Centricon (Millipore Ultracel-30K) ở 4°C, và thẩm tách bằng thiết bị Slide-A-Lyzer (10K MWCO 3-12ml, Pierce) qua đệm bằng 1 lít TBS. Nồng độ tau trong các sợi tau được tinh chế từ dịch đồng thể não AD được xác định bằng phương pháp ELISA kiểu bánh kẹp (sandwich) bằng cách sử dụng kháng thể bắt giữ DA-9 và kháng thể phát hiện CP27.

Các sợi tau được tinh chế (50µl) trong PBS được phủ lên các giếng của đĩa 96 giếng (Coastar, p/n. 3690) ở nồng độ tương ứng với 0,7 µg/ml tau tổng số. Các đĩa được

ủ qua đêm ở 4°C, sau đó rửa ba lần bằng 150µl PBST (PBS chứa 0,05% Tween-20), phong bế trong 100µl BB3 (ImmunoChemistry Technology, p/n. 643) ở nhiệt độ trong phòng trong ít nhất 1 giờ (thường là 2 giờ). Sau khi phong bế, chất đệm phong bế được lấy ra khỏi giếng. Kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 và cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người (có tổ hợp vùng khung: chuỗi nặng 5-51, chuỗi nhẹ A27) được pha loãng trong dung dịch đệm 0,25% casein thành dung dịch gốc 1000nM, sau đó pha loãng hàng loạt 23 lần bằng các bước pha loãng hai lần. 50µl dung dịch gốc và kháng thể được pha loãng hàng loạt (kháng thể đơn dòng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 hoặc cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người) được bổ sung vào các giếng riêng rẽ và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó đĩa được rửa bốn lần bằng 200µl PBST mỗi giếng. 50µl kháng thể HRP kháng IgG người (được pha loãng 1:4000 vào dung dịch đệm 0,25% casein) được bổ sung vào và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó đĩa được rửa bằng 200µl PBST mỗi giếng 4 lần. 50µl TMB/H₂O₂ được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 10 phút. Phản ứng được ngừng bằng cách bổ sung 50µl dung dịch ngừng phản ứng (2N H₂SO₄) và tín hiệu so màu được xác định ở 450nm. Dữ liệu được đưa vào chương trình Prism 6 (GraphPad) và các giá trị EC₅₀ được tạo ra bằng cách khớp đường cong hồi quy phi tuyến tính và đáp ứng liều sigma. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. So sánh EC₅₀ của liên kết với các sợi Tau AD tinh chế

Kháng thể được thử nghiệm	EC ₅₀ (pM)
mAb tau làm ví dụ theo ví dụ 1	6,8
cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người	409,1

Như được thể hiện trong bảng 3, kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo sáng chế thể hiện ái lực cải thiện 60 lần (như được xác định bằng EC₅₀) đối với các sợi tau tinh chế so với cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người.

Độ chọn lọc của kháng thể đơn dòng kháng tau theo ví dụ 1 với các thể kết tụ tau so với tau monome được xác định bằng phương pháp ELISA trực tiếp. Theo quy trình ELISA chủ yếu như đưa ra trên đây, tau tái tổ hợp (rTau) được phủ lên đĩa 96 giếng ở nồng độ tương ứng với nồng độ “cao” (1µg/mL) hoặc nồng độ “thấp” (15ng/mL). Nồng độ rTau cao, khi được phủ lên các đĩa giếng nhỏ, sẽ kết tụ, mô phỏng liên kết với tau kết

tụ. Nồng độ rTau thấp, khi được phủ lên các đĩa giếng nhỏ, mô phỏng liên kết với tau monome. Các đĩa được phủ với nồng độ rTau cao hoặc thấp lần lượt được cho tiếp xúc với kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 và liên kết của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ với nồng độ tương ứng của rTau được xác định chủ yếu như được mô tả trong thử nghiệm ELISA trên đây. Kết quả được nêu trong bảng 4.

Bảng 4. So sánh EC₅₀ của liên kết với rTau nồng độ cao với rTau nồng độ thấp

Nồng độ monome rTau	EC ₅₀ (pM)
“Cao” (1µg/mL)	6,0
“Thấp” (15ng/mL)	722,7

Như được thể hiện trong bảng 4, kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 thể hiện ái lực cải thiện 120 lần (như được xác định bằng EC₅₀) với thể kết tụ tau so với tau monome.

Nghiên cứu gắn kết với đích ex vivo

Liên kết của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 với tau kết tụ thu được từ não người được xác định thông qua phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch các phần cắt não được gắn trong parafin cố định bằng formalin (formalin-fixed paraffin-embedded - FFPE) thu được từ: cá thể “bình thường” (thể hiện sự kết tụ tau tối thiểu); bệnh nhân AD (thể hiện sự kết tụ tau nghiêm trọng và sự hình thành NFT, cũng như bệnh học mảng bám dạng tinh bột); bệnh nhân PD (thể hiện sự kết tụ tau nghiêm trọng). Phương pháp nhuộm cũng được thực hiện trên các phần cắt não thu được từ chuột “đối chứng” kiểu hoang dại mà không có tau người để xác định các mức nhuộm nền không đặc hiệu.

Các phần cắt FFPE được khử parafin và bù nước. Sau đó, tiến hành thu hồi kháng nguyên (bằng hệ mô hình Lab Vision PT, Thermo Scientific) trên các phần cắt bao gồm việc đun nóng các phần cắt trong đệm xitrat (Thermo Scientific, p/n. TA-250-PM1X) trong 20 phút ở 100°C sau đó làm mát các phần cắt này trong dH₂O. Các phần cắt này sau đó được cho qua bảy bước ủ sau đây (ở nhiệt độ trong phòng): (1) 10 phút trong 0,03% H₂O₂; (2) 30 phút trong huyết thanh dê bình thường pha loãng 1:20 (Vector Labs., p/n. S-1000) được pha loãng trong phút trong PBST; (3) 60 phút trong kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 hoặc cấu trúc kháng thể MC-1 đã được làm

giống như của người (có tổ hợp vùng khung: chuỗi nặng 5-51, chuỗi nhẹ A27) (cả kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ và cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người đều được chuẩn hóa đến 1mg/ml, sau đó pha loãng trong PBST đến độ pha loãng 1:4000 trước khi ủ với các phần cắt); (4) 30 phút trong kháng thể thỏ kháng IgG4 người (được tạo ra để kháng vùng Fc của kháng thể làm ví dụ) ở nồng độ 1,1 µg/ml trong PBST; (5) 30 phút trong kháng thể dê đã biotin hóa kháng IgG thỏ pha loãng 1:200 (Vector Labs., p/n. BA-1000) được pha loãng trong PBST; (6) 30 phút trong dung dịch phức avidin-biotin (Vector Labs., p/n. PK-7100); (7) 5 phút trong 3,3'-diaminobenzidin (Vector Labs., p/n. SK-4105). Các phần cắt được rửa giữa mỗi bước trong số 7 bước trên đây bằng PBST. Sau bảy bước ủ trên đây, các phần cắt được nhuộm tương phản bằng haematoxylin, loại nước và đặt lá kính. Đối với các phần cắt mô chuột “đối chứng”, quy trình trên được thay đổi ở bước ủ (3) bằng cách sử dụng độ pha loãng 1:8000 (thay vì độ pha loãng 1:4000) của cả kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ và cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người; và bằng cách thay các bước ủ (4) và (5) bằng bước ủ đơn 30 phút trong kháng thể dê đã biotin hóa kháng IgG người pha loãng 1:200 (Vector Labs. p/n. BA-3000) trong PBST.

Sau các quy trình chủ yếu như được mô tả trên đây, tiến hành phân tích liên kết của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 với tau thu được từ não người. Kết quả được nêu trong bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Phân tích bán định lượng liên kết với tau kết tụ trong các phần cắt não bệnh AD FFPE.

	Mức độ nghiêm trọng của sự kết tụ tau được phát hiện như xác định bằng hệ thống tính điểm bán định lượng (nghiêm trọng, +++; vừa phải, ++; nhẹ, +; âm tính, -)			
	Đối chứng kiểu hoang dại (chuột)	Đối chứng bình thường (người)	Bệnh Alzheimer	Bệnh Pick
mAb Tau làm ví dụ theo ví dụ 1	-	+	+++	+++
Cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người	-	-	+	+

Kết quả được nêu trong bảng 5 cho thấy rằng kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 thể hiện mức nhuộm với tau kết tụ, từ cả bệnh nhân AD và PD, trong các phần cắt não hồi hải mã cao hơn đáng kể so với cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người. Kết quả được nêu trong bảng 5 cũng cho thấy rằng kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 không thể hiện liên kết không đặc hiệu cao hơn so với cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người (kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ thể hiện liên kết với lượng tối thiểu tau kết tụ trong các phần cắt đối chứng từ người bình thường). Hơn nữa, vì các bệnh AD và PD đặc trưng bởi các biến thể ghép nối khác nhau của gen mã hóa tau, các kết quả này củng cố kết luận rằng kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 liên kết đặc hiệu với epitop cấu hình chứa các gốc axit amin 7-9 và 312-322 của tau người (việc đánh số gốc dựa trên tau người làm ví dụ có SEQ ID NO.13) luôn có trong các thể kết tụ tau ở cả bệnh AD và PD.

Vô hiệu sự lan truyền thể kết tụ tau in vitro

Đã biết rằng các chế phẩm não đồng thể từ chuột nhắt P301S khoảng 5 tháng tuổi, với sự có mặt của tau tự nhiên không kết tụ, gây ra sự kết tụ tau tự nhiên và chứng tỏ hiệu quả giống như lan truyền của sự kết tụ tau. Các chế phẩm đồng thể không tan Sarkosyl chứa mô não từ chuột nhắt P301S 4,5 đến 5 tháng tuổi được xử lý bằng siêu âm và pha loãng bằng OPTI-MEM (GIBCO của hãng Life Tech., p/n. 31985-062) để làm cho nồng độ cuối của tau đo được (trong mỗi chế phẩm) là 0,77 $\mu\text{g/ml}$. Mỗi chế phẩm này được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng với một trong số kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 (ở nồng độ: 21,00, 7,00, 2,33, 0,78, 0,26, 0,09, 0,03, và 0,01 $\mu\text{g/ml}$) hoặc cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người (ở nồng độ: 50,00, 16,67, 5,56, 1,85, 0,62, 0,21, 0,07, 0,02 và 0,01 $\mu\text{g/ml}$).

Các tế bào HEK293 (dòng tế bào thận phôi người) được chuyển nhiễm bằng phương pháp điện chuyển để biểu hiện theo các cảm ứng được dạng đột biến của tau người (1N4L, mà có serin thay cho prolin ở gốc 301 (P301S) (việc đánh số gốc dựa trên tau người làm ví dụ có SEQ ID NO.13)). (Falcon B., et al., J. Biol. Chem. 290:1049-1065, 2015). Các tế bào HEK293 đã chuyển nhiễm ổn định được đưa vào đĩa ở nồng độ 1×10^4 tế bào/giếng trong các giếng của đĩa 96 giếng trong môi trường đầy đủ (môi trường D-MEM (Invitrogen, p/n. 11965-092), 10% huyết thanh thai bò (Invitrogen, p/n. 16000), 1x penixilin-streptomycin (Invitrogen, p/n. 15140-122), 5 $\mu\text{g/ml}$ Blastisin (Invitrogen, p/n. R210-01), 200 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin (Invitrogen, p/n. R250-01)). Các đĩa được ủ trong ba

ngày ở 37°C. Sau khi ủ, 1 mg/ml tetracyclin được bổ sung vào ở độ pha loãng 1:1000 mỗi giếng (đến nồng độ cuối là 1 µg tetracyclin/ml môi trường) để cảm ứng sự biểu hiện tau đột biến. Các đĩa sau đó được ủ trong 24 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, môi trường nuôi cấy được lấy ra và 50µl chế phẩm đồng thể với một trong số các nồng độ tương ứng của một trong số kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo Ví dụ 1 hoặc cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người (được chuẩn bị như đã mô tả trên đây) được bổ sung vào. Các đĩa được ủ trong ba giờ, sau đó chế phẩm đồng thể được lấy ra và 100µl môi trường đầy đủ với 1µg/ml tetracyclin và cùng nồng độ tương ứng của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ hoặc cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người được bổ sung vào từng giếng tương ứng. Các đĩa được ủ trong 24 giờ ở 37°C, sau đó môi trường được lấy ra và 100µl môi trường đầy đủ và cùng nồng độ tương ứng của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ hoặc cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người được bổ sung vào các giếng tương ứng. Các đĩa được ủ trong 48 giờ ở 37°C. Sau khi ủ, các tế bào được rửa bằng 200µl DPBS và làm ráo nước.

Các tế bào này được tạo huyền phù lại trong 50µl dung dịch đệm H (TBS độ pH=7,4 chứa 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, chất ức chế proteaza và phosphatase (Thermo Scientific, p/n. 784420)) mỗi giếng và xử lý trong bể siêu âm trong 10 phút. Nồng độ protein tổng số được xác định bằng thử nghiệm protein BCA™ (Thermo Scientific, p/n. PI-23227). Các mức kết tụ tau được xác định bằng phương pháp ELISA bán kẹp. Các đĩa 96 giếng được phủ bằng 50µl kháng thể AT8 2µg/ml ở 4°C qua đêm. Các đĩa được rửa ba lần bằng PBST, sau đó phong bế bằng 100µl BB3 trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đường cong chuẩn được chuẩn bị bằng cách sử dụng chất chiết tổng số não bệnh AD bằng cách pha loãng hàng loạt trong dung dịch đệm 0,25% với độ pha loãng hai lần từ nồng độ ban đầu là 40 µg/ml đến nồng độ cuối là 0,3125 µg/ml. Sản phẩm phân giải tế bào được pha loãng vào đệm 0,25% casein đến nồng độ protein tổng là khoảng 0,1 mg/ml. 50 µl mỗi dịch pha loãng mẫu chuẩn hoặc mẫu tế bào pha loãng sau đó được bổ sung vào các giếng riêng rẽ của đĩa đã phong bế và ủ ở 4°C qua đêm, sau đó các đĩa được rửa bốn lần bằng PBST. Kháng thể CP27 biotin hóa được pha loãng 1:2000 trong đệm 0,25% casein và sau đó 50µl được bổ sung vào mỗi giếng chứa mẫu. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, sau đó các đĩa được rửa bốn lần bằng PBST. Streptavidin-HRP (Invitrogen, p/n. SNN2004) được pha loãng 1:5000 trong đệm 0,25% casein và sau đó 50µl được bổ sung vào mỗi giếng và các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong

phòng trong 1 giờ. Sau khi ủ, các đĩa được rửa 4 lần bằng PBST và 50µl hỗn hợp 1:1 chứa H₂O₂ và TMB (Thermo Scientific, p/n. 34021) được bổ sung vào. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút và phản ứng được ngừng bằng cách bổ sung 50µl H₂SO₄. Tín hiệu phân tích bằng màu được xác định ở 450nm hoặc 650nm. Các mức tau dương tính AT8 được chuẩn hóa so với mức protein tổng số trong từng mẫu. Các giá trị được chuẩn hóa đối với từng mẫu được chuẩn hóa tiếp so với mức tau dương tính AT8 trong các mẫu đối chứng (không được điều trị bằng kháng thể). Tỷ lệ phần trăm ức chế sự lan truyền thể kết tụ tau trong từng mẫu được xác định bằng cách lấy 100 trừ đi các giá trị chuẩn hóa tiếp và giá trị tỷ lệ phần trăm ức chế cho từng mẫu được đưa vào chương trình phần mềm Prism 6 (GraphPad) áp dụng phương pháp khớp đường cong hồi quy phi tuyến tính và đáp ứng liều sigma để tạo ra các giá trị EC₅₀. Kết quả được nêu trong bảng 6.

Bảng 6. Các giá trị EC₅₀ đại diện cho khả năng ức chế thể kết tụ tau.

	Kháng thể kháng tau được thiết kế di truyền làm ví dụ theo ví dụ 1	Cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người
EC ₅₀ (đại diện cho khả năng ức chế sự lan truyền thể kết tụ tau dương tính AT8 (ng/mL))	16	476

Kết quả được nêu trong bảng 6 cho thấy rằng kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 thể hiện khả năng ức chế sự lan truyền thể kết tụ tau được cảm ứng cải thiện khoảng 30 lần.

Vô hiệu sự lan truyền thể kết tụ tau in vivo

Đã biết rằng các chế phẩm thân não đồng thể từ chuột nhắt P301S khoảng 5 tháng tuổi, khi tiêm vào hồi hải mã của chuột nhắt P301S 10 tuần tuổi bình thường, gây ra sự kết tụ tau tự nhiên không kết tụ, chứng tỏ hiệu quả giống như lan truyền của sự kết tụ tau. Các chế phẩm đồng thể chứa mô thân não từ chuột nhắt P301S 4,5 đến 5 tháng tuổi được chuẩn bị chủ yếu theo cùng cách đã mô tả trên đây.

Các chuột cái P301S 10 tuần tuổi bình thường được tiêm vào bán cầu bên trái của hồi hải mã bằng 5µl chế phẩm não đồng thể và: 7,5µg kháng thể đơn dòng kháng tau

làm ví dụ theo ví dụ 1 (N=12); hoặc 7,5µg kháng thể đối chứng IgG4 người (N=11). Bốn tuần sau khi tiêm, các chuột nhất bị giết và các bán cầu não trái và phải được thu thập, gán trong parafin, và các phần cắt hàng loạt 6µm được đặt lên lam kính thủy tinh. Các lam kính chứa thóp trước (A-P = -2,30) được loại bỏ parafin, mô đã gắn được bù nước, và tiến hành thu hồi kháng nguyên bằng cách gia nhiệt lam kính đến 100°C trong 20 phút trong đệm xitrat. Các lam kính được làm mát trong dH₂O và ủ ở nhiệt độ trong phòng theo các bước sau: (a) 10 phút trong (0,03%) H₂O₂; (b) 30 phút trong dung dịch huyết thanh dê bình thường pha loãng 1:20; (c) 60 phút trong dung dịch kháng thể PG-5 pha loãng 1:8000 (pha loãng trong PBST)(kháng thể PG-5 thu mua được từ phòng thí nghiệm Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University; kháng thể PG-5 liên kết đặc hiệu với serin ở gốc 409 của tau khi được phosphoryl hóa, việc đánh số gốc dựa trên tau người làm ví dụ có SEQ ID NO.13); (d) 30 phút trong dung dịch kháng thể dê đã biotin hóa kháng IgG chuột nhất pha loãng 1:200 (được pha loãng trong PBST); (e) 30 phút trong dung dịch phức avidin-biotin; và (f) 5 phút trong 3,3'-diaminobenzidin. PBST được dùng để rửa giữa các bước tương ứng. Sau 5 phút ủ trong 3,3'-diaminobenzidin, các phần cắt được nhuộm tương phản bằng haematoxylin, sau đó bù nước và đặt lam kính. Tín hiệu nhuộm được xác định bằng máy quét Scanscope AT Slide Scanner (Aperio) ở độ phóng đại 20x. Khả năng phản ứng miễn dịch PG-5 được định lượng và biểu thị dưới dạng phần trăm bằng cách sử dụng thuật toán điểm ảnh dương của phần mềm Imagescope Software (v. 11.1.2.780, Aperio). Kết quả được nêu trong bảng 7.

Bảng 7. Khả năng phản ứng PG-5 trung bình theo % lần lượt ở hồi hải mã trái và phải.

	(Khả năng phản ứng PG-5 %)	
	Hồi hải mã trái	Hồi hải mã phải
mAb Tau làm ví dụ theo ví dụ 1	2,52 ± 0,49 SEM	0,63 ± 0,13 SEM
Kháng thể IgG4 đối chứng	6,38 ± 0,93 SEM	1,88 ± 0,31 SEM

Kết quả được thể hiện trong bảng 7 chứng tỏ rằng kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 làm giảm mức kết tụ tau ở cả hồi hải mã trái và phải so với kháng thể IgG4 đối chứng. Như được thể hiện, kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ lần lượt làm giảm sự kết tụ tau hồi hải mã trái nhiều hơn 60,5%, và giảm sự kết tụ tau hồi

hải mã phải nhiều hơn 66,5%, so với kháng thể IgG4 đối chứng. Các kết quả này chứng tỏ rằng kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ có hoạt tính vô hiệu sự lan truyền kết tụ tau.

Phân tích hiệu quả in vivo trong mô hình chuột Tg4510

Các chuột nhắt chuyển gen Tg4510 biểu hiện thể đột biến của tau người (4R0N, mà có leuxin thay cho prolin ở gốc 301 (P301L), Ramsden M., et al., J. Neuroscience., 25: 10637-10647 (2005) và Santacruz K., et al., Science (2005); việc đánh số gốc dựa trên tau người làm ví dụ có SEQ ID NO.13). Các chuột nhắt Tg4510 thể hiện mức biểu hiện tau người đột biến P301L cao ở các vùng hồi hải mã và tân vỏ não, chứng tỏ sự kết tụ tau tiến triển phụ thuộc độ tuổi.

Kháng thể kháng tau theo sáng chế có thể gây ra đáp ứng miễn dịch ở các chuột Tg4510. Do đó, để khảo sát tiềm năng trị liệu của các kháng thể đơn dòng kháng tau theo sáng chế về việc dùng lâu dài trong mô hình động vật gặm nhấm, kháng thể kháng tau thay thế của chuột được kết cấu để hướng đích cùng loại epitop cấu hình và thể hiện mức ái lực cải thiện tương tự so với kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1. Kháng thể kháng tau thay thế này có ái lực (EC_{50}) với các sợi tau AD tinh chế, đo bằng phương pháp ELISA mô tả trên đây (đối với kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1), là 13,1 pM.

Các chuột nhắt Tg4510 cái tám tuần tuổi được chia thành 3 nhóm riêng rẽ. Nhóm đầu tiên (N=15) được tiêm kháng thể đối chứng IgG1 của chuột (15mg/kg) hai lần một tuần trong 9 tuần. Nhóm thứ hai (N=15) được tiêm hai lần một tuần trong 9 tuần bằng kháng thể MC-1 tái tổ hợp (15mg/kg) được sản xuất từ cổ trướng của chuột được tiêm thể lai MC-1. Nhóm thứ ba (N=15) được tiêm kháng thể kháng tau thay thế của chuột (15mg/kg) hai lần một tuần trong 9 tuần. Sau khi sử dụng lần cuối, các chuột bị giết và não của chúng được thu thập. Các phần vỏ não và các phần cắt hồi hải mã được thu thập, gắn trong parafin, và các phần cắt hàng loạt 6µm được đặt lên lam kính thủy tinh để sử dụng trong hóa mô miễn dịch.

Phần còn lại của vùng vỏ não của não đã thu thập được đồng hóa bằng cách siêu âm theo xung trong thể tích đệm H lớn hơn 10 lần so với thể tích vỏ não, ly tâm ở 21.000g trong 20 phút ở 4°C và một phần phân ước của dịch nổi từ mỗi vỏ não được thu thập và mức protein tổng số được xác định bằng thử nghiệm protein BCA™ (Thermo

Scientific, p/n. PI-23227) theo quy trình của nhà sản xuất. Phần còn lại của dịch nổi được ly tâm ở 100.000g trong 1 giờ ở 4°C, dịch nổi được gạn ra, và phần kết viên không tan được tạo huyền phù lại trong đệm H (với thể tích bằng ½ thể tích của dịch nổi đã gạn ra). Phần kết viên được tạo huyền phù lại được xử lý siêu âm và mức kết tụ tau dương tính AT8 trong từng phần kết viên được xác định bằng ELISA sử dụng kháng thể bắt giữ AT8 và kháng thể phát hiện CP27 chủ yếu như được mô tả trên đây. Các mức tau kết tụ dương tính AT8 được chuẩn hóa so với mức protein tổng số.

Tương tự, phần còn lại của hồi hải mã của các não đã thu thập được đồng hóa bằng cách siêu âm theo xung trong thể tích đệm H lớn hơn 10 lần so với thể tích hồi hải mã, ly tâm ở 21.000g trong 20 phút ở 4°C và dịch nổi từ mỗi vỏ hồi hải mã được thu thập và mức protein tổng số được xác định. Mức kết tụ tau dương tính AT8 trong từng dịch nổi được xác định bằng ELISA sử dụng kháng thể bắt giữ AT8 và kháng thể phát hiện CP27 chủ yếu như được mô tả trên đây. Các mức tau kết tụ dương tính AT8 được chuẩn hóa so với mức protein tổng số. Kết quả được nêu trong bảng 8.

Bảng 8. Mức tau kết tụ dương tính AT8 trong dịch đồng thể vỏ não và hồi hải mã được xác định bằng ELISA.

	Mức tau kết tụ dương tính AT8 (µg/mg)	
	Vỏ não	Hồi hải mã
Kháng thể kháng tau thay thế của chuột	1416 ± 195 SEM	386 ± 71 SEM
Kháng thể mIgG1 đối chứng	1872 ± 198 SEM	591 ± 66 SEM
Kháng thể mIgG1 rMC-1	1703 ± 138 SEM	510 ± 62 SEM

Kết quả được nêu trong bảng 8 chứng tỏ rằng kháng thể kháng tau thay thế của chuột làm giảm mức tau kết tụ trong cả vỏ não và hồi hải mã lần lượt ở mức 24% và 35%, so với chuột được điều trị bằng mIgG1 đối chứng. Kết quả này cũng thể hiện rằng chuột nhất được điều trị bằng kháng thể chuột MC-1 tái tổ hợp không thể hiện sự giảm mức kết tụ tau cải thiện so với chuột được điều trị bằng mIgG1 đối chứng.

Mức kết tụ tau trong vỏ não và hồi hải mã của các phần cắt được gắn trong parafin từ não đã thu thập cũng các định được bằng phương pháp hóa mô miễn dịch sử dụng PG-5 chủ yếu như được mô tả trên đây. Dữ liệu được chuẩn hóa bằng cách chuyển đổi thành giá trị $\log_{10}$ và kết quả được tổng kết trong bảng 9.

Bảng 9. Giá trị $\log_{10}$ trung bình của khả năng phản ứng miễn dịch PG-5 theo % trong vỏ não và hồi hải mã.

	Thế kết tụ tau (giá trị $\log_{10}$ trung bình của khả năng phản ứng miễn dịch PG-5 theo %)	
	Vỏ não	Hồi hải mã
Kháng thể kháng tau thay thế của chuột	$0,74 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,07$
Kháng thể mIgG1 đối chứng	$0,90 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,05$
Kháng thể mIgG1 rMC-1	$0,83 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,06$

Kết quả được nêu trong bảng 9 chứng tỏ rằng kháng thể chuột kháng tau thay thế của chuột làm giảm mức kết tụ tau trong cả vỏ não (giảm 18%) và hồi hải mã (giảm 43%) so với kháng thể mIgG1 đối chứng trong khi đó kháng thể MC-1 tái tổ hợp của chuột không thể hiện sự giảm đáng kể mức kết tụ tau trong vỏ não hoặc hồi hải mã so với kháng thể mIgG1 đối chứng.

Các đặc tính lý hóa của kháng thể đơn dòng kháng tau được thiết kế di truyền

Kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 thể hiện độ hòa tan tốt, độ ổn định hóa học, và độ ổn định vật lý.

Độ hòa tan:

Độ hòa tan đủ cao là cần thiết để phân liều thuận tiện. Chẳng hạn, liều 1 mg/kg được dùng bằng cách tiêm 1,0 mL vào bệnh nhân nặng 100 kg sẽ cần độ hòa tan 100mg/mL. Ngoài ra, cũng cần giữ cho kháng thể ở trạng thái monome mà không có kết tụ phân tử lượng cao (high molecular weight - HMW) ở nồng độ cao. Độ hòa tan của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 được phân tích bằng cách cô đặc 15mg kháng thể làm ví dụ bằng bộ lọc giới hạn phân tử lượng 10 K (Amicon U.C. filters, Millipore, catalog # UFC903024) đến thể tích nhỏ hơn 100 μ L. Nồng độ cuối của mẫu

được xác định bằng độ hấp thụ UV ở A280 sử dụng thiết bị Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Sau các quy trình chủ yếu như đã mô tả trên đây, kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 thể hiện độ hòa tan lớn hơn: 140 mg/ml (ở độ pH=6 trong đệm xitrat 10 mM); 177 mg/ml (ở độ pH=6 trong xitrat 10 mM với NaCl 150 mM); và 170 mg/ml (ở độ pH=7,4 trong đệm PBS). Ngoài ra, HMW chỉ xuất hiện ở mức thấp (từ ~3 to ~5,4%) ở nồng độ cao và không quan sát thấy sự phân tách pha.

Độ ổn định hóa học và vật lý:

Độ ổn định hóa học tạo thuận lợi cho sự phát triển các dạng bào chế được có đủ thời hạn bảo quản. Độ ổn định hóa học của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 được đánh giá bằng cách bào chế kháng thể kháng tau làm ví dụ ở nồng độ 1mg/ml trong xitrat 10mM và được đệm đến độ pH = 4, 5, 6, hoặc 7. Các mẫu bào chế được ủ trong bốn tuần ở 4°C, 25°C, hoặc 40°C trong nghiên cứu sự thoái biến nhanh. Các thay đổi quyết định profin của kháng thể, các thay thế hóa học thể hiện ra, được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp điện di mao quản hội tụ đẳng điện (capillary isoelectric focusing - cIEF) theo quy trình chuẩn.

Sau các quy trình chủ yếu như đã mô tả trên đây, kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 thể hiện kết quả về độ ổn định hóa học được trình bày trong bảng 10.

Bảng 10. Tổng kết thay đổi tính theo % đỉnh chính trong vòng bốn tuần, so với mẫu được ủ ở 4°C, xác định bằng phương pháp cIEF và % thể kết tụ HMW xác định bằng SEC.

Độ pH	Thay đổi tính theo % đỉnh chính sau 4 tuần (so với 4°C) 25°C	Thay đổi tính theo % thể kết tụ HMW (so với 4°C) 25°C	Thay đổi tính theo % thể kết tụ HMW (so với 4°C) 40°C
4	-8,43	-0,1	49,8
5	-4,13	0,1	1,1
6	-3,95	-0,2	0,3
7	-3,69	-0,2	0,9

Kết quả được thể hiện trong bảng 10 chứng tỏ rằng sau 4 tuần bảo quản ở 40°C, kháng thể kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 có tỷ lệ phần trăm đỉnh chính giảm chỉ 1,1 điểm phần trăm khi được bào chế ở độ pH=5, và giảm chỉ 0,3 điểm phần trăm khi được bào chế ở độ pH=6 (độ pH thường dùng trong bào chế kháng thể). Ngoài ra, phép phân tích phổ khối chẳng tỏ rằng chỉ quan sát thấy độ thoái biến tối thiểu sau 4 tuần bảo quản ở 40°C (khử amit ~1,5% LCDR1 với dưới 5% thoái biến trong tất cả các trình tự CDR), điều này cho thấy rằng kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 có đủ độ ổn định hóa học để tạo thuận lợi cho việc bào chế các chế phẩm dạng dung dịch với đủ thời hạn bảo quản.

Để so sánh, độ ổn định hóa học và vật lý của cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người (có tổ hợp vùng khung: chuỗi nặng 5-51, chuỗi nhẹ A27) được thực hiện rằng cách ủ kháng thể trong 2 tuần ở 40°C ở độ pH = 8. Cấu trúc kháng thể MC-1 được làm giống như của người thể hiện sự thoái biến hóa học đáng kể bao gồm khử amit 12% LCDR1, khử amit 5% và đồng phân hóa 10% HCDR3 và oxy hóa 3% vùng khung HC.

Ái lực liên kết, sau bốn tuần nghiên cứu thoái biến nhanh của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1, được đánh giá bằng cách bào chế kháng thể đơn dòng làm ví dụ ở nồng độ 1 mg/ml trong xitrat 10mM và được đệm đến độ pH = 4 hoặc 6. Các mẫu bào chế được ủ trong bốn tuần ở 4°C hoặc 40°C trong nghiên cứu thoái biến nhanh. Sau khi ủ, ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 với rTau (15 ng/ml) được phủ trên các đĩa 96 giếng được xác định bằng phương pháp ELISA trực tiếp theo quy trình ELISA chủ yếu như được mô tả trên đây. Kết quả của nghiên cứu ái lực liên kết mô tả trên đây, được thực hiện theo bộ đôi, được nêu trong bảng 11.

Bảng 11. So sánh EC₅₀ sau nghiên cứu thoái biến nhanh.

Độ pH bào chế	Nhiệt độ ủ (°C)	EC ₅₀ (pM) Nghiên cứu 1	EC ₅₀ (pM) Nghiên cứu 2
4	40	414	277
6	4	926	636
6	40	754	667

Bảng 11 thể hiện rằng ái lực liên kết của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1 với các nồng độ rTau thấp vẫn ở mức tương tự đối với các mẫu sau bốn tuần thoái biến nhanh, so với các mẫu đối chứng được ủ ở 4°C.

Trình tự

SEQ ID NO: 1 – LC của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYK
VDNRFSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2 – HC của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPG
SDSIKYEKNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRGNYVDDWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSLG

SEQ ID NO: 3 – LCDR1 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

RSSQSLVHSNQNTYLH

SEQ ID NO: 4 – LCDR2 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

YKVDNRFS

SEQ ID NO: 5 – LCDR3 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

SQSTLVPLT

SEQ ID NO: 6 – HCDR1 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

KSGSYTFSNYWIE

SEQ ID NO: 7 – HCDR2 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

EILPGSDSIKYEKNFKG

SEQ ID NO: 8 – HCDR3 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

ARRGNYVDD

SEQ ID NO: 9 – LCVR của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGQAPRLLIY
KVDNRFSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKV
EIK

SEQ ID NO: 10 – HCVR của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEIL
PGSDSIKYEKNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARRGNYVD
DWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 11 – Trình tự nuleotit mã hóa LC làm ví dụ (SEQ ID NO:1)

gaaattgtgtgacgcagtcctcaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctctgcagatctagtcagag
ccttgtagacagtaatacagaacacctaattacattggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatataaagt
tgacaaccgattttctggcatcccagacagggtcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactg
gagcctgaagattttgcagtggtactgttctcaaagtacactgggtccgctcacgttcggcggagggaaggtggagat
caaacggaccgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcggttaactcccaggag
agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
aaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgctcacaagagcttcaacaggggagagtg
c

SEQ ID NO: 12 – Trình tự nuleotit mã hóa HC làm ví dụ (SEQ ID NO: 2)

gaggtgcagctgggtgcagtcctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtcctgaagatctctgtaagggttctggctac
acattcagtaactactggatagagtgggtgcgccagatgccgggaaaggcctggagtggatgggggagattttacctgga
agtgatagtattaagtacgaaaagaattcaagggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgctacctgc
agtggagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagaagggggaactacgtggacgactggggcca
gggcaccctggtcaccgtctcctcagcttctaccaaggggcccatcggtcttcccgtagcgccctgctccaggagcacctcc

gagagcacagccgccctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgccct
gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctcc
agcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagt
ccaaatatggtcccccattgccaccctgccagcacctgagggcgccgggggaccatcagtcttctgttccccccaaaac
ccaaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgcgtgggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtc
cagttcaactgggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgta
ccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggctccaacaaag
gcctcccgctctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcgagcccgagagccacaggtgtacaccctgcccc
atcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctacccagcgacatcgccgtgg
agtgggaaagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgctggtgactccgacggctccttcttctct
acagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac
aaccactacacagaagagcctctccctgtctctgggt

SEQ ID NO: 13 – Trình tự axit amin của tau người có độ dài đầy đủ

MAEPRQEFVMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQT
PTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAE
EAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRG
AAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSR
RTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKSKIGSTE
NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSK
VTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKK
IETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSIDMVDSPQ
LATLADEV SASLAKQGL

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng mà liên kết với tau người chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR), trong đó trình tự axit amin của LCVR được nêu trong SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin của HCVR được nêu trong SEQ ID NO: 10.
2. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó trình tự axit amin của LC được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin của HC được nêu trong SEQ ID NO: 2.
3. Phân tử ADN chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.
4. Phân tử ADN theo điểm 3, trong đó trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 được nêu trong SEQ ID NO: 11 và trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 được nêu trong SEQ ID NO: 12.
5. Tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN theo điểm 3 hoặc 4, trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể đơn dòng chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.
6. Quy trình sản xuất kháng thể đơn dòng chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm 5 trong điều kiện sao cho kháng thể đơn dòng được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đơn dòng được biểu hiện này.
7. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo điểm 1 hoặc 2 và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ELI LILLY AND COMPANY

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG KHÁNG TAU, PHÂN TỬ ADN, TẾ BÀO ĐỘNG VẬT CÓ VÚ CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY, QUY TRÌNH SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> X20624

<150> US 62/121,116

<151> 2015-02-26

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LC của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 1

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Asp Asn Arg Phe Ser Gly Ile Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 <210> 2
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> HC của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

 <400> 2

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

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR1 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 3

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR2 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 4

Tyr Lys Val Asp Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCDR3 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 5

Ser Gln Ser Thr Leu Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR1 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 6

Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Glu
1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR2 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 7

Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Ile Lys Tyr Glu Lys Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCDR3 của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 8

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Val Asp Asp
1 5

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LCVR của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Asp Asn Arg Phe Ser Gly Ile Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> HCVR của kháng thể đơn dòng kháng tau làm ví dụ theo ví dụ 1

<400> 10

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Ile Lys Tyr Glu Lys Asn Phe

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

<210> 11
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit mã hóa LC làm ví dụ (SEQ ID NO:1)

<400> 11
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60

ctctcctgca gatctagtca gaggccttgta cacagtaatc agaacaccta ttacattgg
 120

taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct ataaagtga caaccgattt
 180

tctggcatcc cagacagggt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac tctcaccatc
 240

agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg tattactgtt ctcaaagtac actgggttccg
 300

ctcacgttcg gcggaggag caaggtggag atcaaacgga ccgtggctgc accatctgtc
 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg
 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa
 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc
 540

agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgccctcgaa
 600

gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgc
 657

<210> 12
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit mã hóa HC làm ví dụ (SEQ ID NO: 2)

<400> 12

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc
60

tcttgtaagg gttctggcta cacattcagt aactactgga tagagtgggt gcgccagatg
120

cccgggaaag gcctggagtg gatgggggag attttacctg gaagtgatag tattaagtac
180

gaaaagaatt tcaagggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac
240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcggac accgccatgt attactgtgc gagaaggggg
300

aactacgtgg acgactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttctaccaag
360

ggcccatcgg tcttcccgt agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc
420

ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc
480

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc
540

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac
600

gtagatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagagag ttgagtccaa atatgggtccc
660

ccatgcccac cctgcccagc acctgaggcc gccgggggac catcagtctt cctgttcccc
720

ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaacctg aggtcacgtg cgtgggtggtg
780

gacgtgagcc aggaagacct cgagggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg
840

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc
900

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc
960

aacaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga
1020

gagccacagg tgtacacct gcccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc
1080

ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggaaagcaat
1140

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc
1200

ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca
1260

tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct
1320

ctgggt
1326

<210> 13

<211> 441

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của tau người có độ dài đầy đủ

<400> 13

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

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

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

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

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser

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