(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) **1-0027949**
(51)[7] **C07K 16/18**; A61P 25/28
(13) **B**

(21) 1-2015-02638
(22) 20/12/2013
(86) PCT/US2013/076952 20/12/2013
(87) WO2014/100600 26/06/2014
(30) 61/745,410 21/12/2012 US
(45) 25/04/2021 397
(43) 25/09/2015 330A
(73) 1. BIOGEN MA INC. (US)
250 Binney Street, Cambridge, Massachusetts 02142, United States of America
2. BIOGEN INTERNATIONAL NEUROSCIENCE GMBH (CH)
Neuhofstrasse 30, 6340 Baar, Switzerland
(72) WEINREB, Paul, H. (US); CHEN, Feng (CN); GARBER, Ellen, A. (US); GRIMM, Jan (DE); MONTRASIO, Fabio (CH).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG TAU VÀ POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP CHỨA TRÌNH TỰ NUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu với tau của người cũng như các đoạn, các dẫn xuất và các biến thể của chúng cũng như các phương pháp liên quan đến chúng. Thử nghiệm, kit, và nền rắn có liên quan đến các kháng thể đặc hiệu với tau cũng được bộc lộ. Kháng thể, (các) chuỗi globulin miễn dịch, cũng như các đoạn liên kết, các chất dẫn xuất và các biến thể của chúng có thể được sử dụng trong dược phẩm và chế phẩm dùng để chẩn đoán lần lượt cho liệu pháp điều trị miễn dịch được hướng đích đến tau và chẩn đoán. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit được phân lập chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nhìn chung, sáng chế liên quan đến phân tử mới liên kết đặc hiệu với tau, cụ thể là các kháng thể của người cũng như các đoạn, các dẫn xuất và các biến thể của chúng có chức năng nhận biết protein tau, kể cả tau được phosphoryl hóa do nguyên nhân bệnh lý và các dạng kết tụ của tau. Hơn thế nữa, sáng chế còn liên quan đến dược phẩm và chế phẩm dùng để chẩn đoán chứa các phân tử liên kết, các kháng thể như vậy và các chất có tác dụng của chúng, có giá trị cả dưới dạng công cụ chẩn đoán để nhận diện tau và các loại tau độc hại trong huyết tương và CSF và đồng thời trong chiến lược chủng ngừa thụ động để điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh do tau như bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease - AD), phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/hội chứng Parkinson–sa sút trí tuệ (amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism–dementia complex - ALS-PDC), bệnh sa sút trí tuệ có hạt ưa bạc (argyrophilic grain dementia - AGD), bệnh mạch máu do dạng tinh bột kiểu Anh, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột, bệnh thoái hóa vỏ não-đáy não (corticobasal degeneration - CBD), bệnh Creutzfeldt-Jakob (Creutzfeldt-Jakob disease - CJD), bệnh sa sút trí tuệ do chấn động não, bệnh vôi hóa đám rối sợi thần kinh phân tán, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương có hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17 (frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 - FTDP-17), bệnh thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh viêm cơ thể vùi, bệnh teo đa hệ, bệnh loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh Niemann-Pick kiểu C (Niemann-Pick disease type C - NP-C), bệnh tế bào thần kinh vận động có đám rối sợi thần kinh không phải kiểu đảo Guam, bệnh Pick (Pick's disease - PiD), hội chứng Parkinson sau bệnh viêm não, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột và protein prion, chứng tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, chứng liệt trên nhân tiến triển (progressive supranuclear palsy - PSP), bệnh viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, bệnh sa sút trí tuệ chỉ do đám rối, bệnh sa sút trí tuệ do có nhiều ổ nhồi máu não và bệnh đột quỵ do thiếu máu cục bộ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự tích tụ, cải biến và kết tụ protein là các khía cạnh bệnh lý của nhiều bệnh thoái hóa thần kinh khác nhau. Tau được kết tụ và được cải biến do nguyên nhân bệnh lý chứa các chất đồng phân cấu hình riêng tau được phosphoryl hóa quá mức là dấu chứng bất biến của các bệnh do tau và có tương quan với mức độ trầm trọng của bệnh.

Tau là protein liên quan đến vi cấu trúc hình ống được biểu hiện trong hệ thần kinh trung ương với chức năng chính là làm ổn định vi cấu trúc hình ống. Có sáu dạng đồng chức năng chính của tau được biểu hiện chủ yếu trong não người lớn, các dạng này thu được từ một gen duy nhất bằng cách tách intron luân phiên. Trong các tình trạng bệnh, protein tau trở nên được phosphoryl hóa quá mức, dẫn đến sự mất liên kết tubulin và làm mất ổn định vi cấu trúc hình ống, sau đó sự kết tụ và sự lắng đọng của tau trong đám rối sợi thần kinh gây bệnh. Các rối loạn liên quan đến tau - được gọi chung là các bệnh thoái hóa thần kinh do tau - là một phần của nhóm bao gồm các rối loạn do gấp cuộn sai protein bao gồm các bệnh Alzheimer (AD), chứng liệt trên nhân tiến triển, bệnh Pick, bệnh thoái hóa vỏ não-đáy não, FTDP-17, ngoài các bệnh khác. Đã có thông báo hơn 40 đột biến ở gen tau liên quan đến bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương di truyền cho thấy rằng các đột biến gen tau là đủ để gây ra bệnh thoái hóa thần kinh (Cairns *et al.*, *Am. J. Pathol.* 171 (2007), 227-40). Các nghiên cứu trên chuột chuyển gen và môi trường nuôi cấy tế bào cho thấy rằng trong bệnh AD, bệnh do tau có thể do rất nhiều chu trình bệnh mà trong đó Aβ nằm trước tau gây ra (Götz *et al., Science* 293 (2001), 1491–1495). Tuy nhiên, phát hiện khác chỉ ra mô hình quá trình kép trong đó cả hai loạt chu trình hoạt động một cách độc lập với nhau (van de Nes *et al.*, *Acta Neuropathol.* 111 (2006), 126-138). Liệu pháp miễn dịch hướng đích đến peptit dạng tinh bột beta trong bệnh AD đã tạo ra được các kết quả khả quan ở các mô hình động vật và tạo ra hứa hẹn trong các thử nghiệm lâm sàng. Dữ liệu khám nghiệm tử thi gần đây hơn từ một số ít đối tượng cho thấy rằng việc thải trừ các mảng dạng tinh bột beta ở các bệnh nhân mắc bệnh AD đã tiến triển có thể không đủ để dừng sự suy giảm nhận thức, điều này nhấn mạnh đến nhu cầu về chiến lược điều trị bệnh bổ sung đối với bệnh AD (Homes *et al.*, *Lancet* 372 (2008), 216-223; Boche *et al.*, *Acta Neuropathol.* 120 (2010), 13-20). Theo sau thành công của liệu pháp gây miễn dịch trên cơ sở Abeta ở mô hình động vật chuyển gen, khái niệm về liệu pháp

miễn dịch chủ động được mở rộng sang protein tau. Tuy nhiên, đã phát hiện ra rằng việc chủng ngừa chủ động cho chuột hoang bằng cách sử dụng protein tau kích thích quá trình hình thành đám rối sợi thần kinh, tình trạng tổn thương sợi trục và thâm nhiễm tế bào đơn nhân trong hệ thần kinh trung ương, đi kèm với các khiếm khuyết thần kinh (Rosenmann *et al.*, *Arch Neurol.* 63 (2006), 1459-1467). Các nghiên cứu tiếp theo trên dòng chuột chuyển gen bằng cách áp dụng phương pháp chủng ngừa chủ động bằng các peptit tau được phosphoryl hóa đã cho thấy lượng kết tụ tau trong não giảm và quá trình tiến triển chậm lại của tình trạng suy giảm khả năng hành vi (Sigurdsson, *J. Alzheimers. Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel *et al.*, *Exp. Neurol.* 224 (2010), 472-485). Các phát hiện này làm nổi bật lợi ích tiềm tàng, nhưng cũng làm nổi bật nguy cơ to lớn liên quan đến các phương pháp của liệu pháp miễn dịch chủ động hướng đích đến tau. Nhu cầu về chiến lược điều trị bệnh mới giải quyết các protein tau gây bệnh theo liệu pháp hiệu nghiệm và an toàn là cấp thiết.

Sự gây miễn dịch thụ động bằng các kháng thể của người thu được từ đối tượng là người khỏe mạnh mà được tối ưu hóa theo kiểu tiến hóa và ái lực được làm cho trưởng thành bằng hệ miễn dịch của người sẽ tạo ra phương pháp điều trị bệnh mới đầy hứa hẹn với khả năng cao về độ an toàn và độ hiệu nghiệm tuyệt hảo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế sử dụng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với tau của đối tượng là người khỏe mạnh để phân lập các kháng thể đặc hiệu đơn dòng của người kháng tau tự nhiên. Cụ thể là, các thử nghiệm đã được thực hiện theo sáng chế thành công trong việc phân lập các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với tau từ nhóm đối tượng là người khỏe mạnh không có dấu hiệu của bệnh thoái hóa thần kinh do tau.

Vì vậy, sáng chế đề xuất các kháng thể của người, các đoạn liên kết với kháng nguyên và các phân tử liên kết với kháng nguyên tương tự mà có khả năng nhận biết tau một cách đặc hiệu. Cụm từ "nhận biết tau một cách đặc hiệu", "kháng thể đặc hiệu với/đối với tau" và "kháng thể kháng tau" có nghĩa cụ thể, chung, và tổng thể là các kháng thể đối với dạng nguyên thể của tau, hoặc các dạng đồng chức năng của tau đã kết tụ hoặc đã được cải biến về mặt bệnh lý. Được đề xuất trong bản mô tả này là các kháng thể của người có tính chọn lọc đối với dạng kết tụ và dạng được phosphoryl hóa do nguyên nhân bệnh lý có chiều dài đầy đủ.

Theo một phương án nhất định của sáng chế, kháng thể của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó thể hiện các đặc tính liên kết miễn dịch học của kháng thể đặc trưng bởi các vùng biến đổi V_H và/hoặc V_L như được thể hiện trên hình 7.

Đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể là đoạn Fv chuỗi đơn, đoạn F(ab'), đoạn F(ab), và đoạn $F(ab')_2$, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên bất kỳ khác. Theo một phương án nhất định, nêu dưới đây, kháng thể hoặc đoạn của nó là kháng thể kiểu tương đương IgG của người. Theo cách khác, kháng thể này là kháng thể của thể khảm người-chuột hoặc kháng thể được làm tương thích với chuột, kháng thể sau này là đặc biệt hữu ích đối với các phương pháp chẩn đoán và các nghiên cứu ở động vật.

Hơn thế nữa, sáng chế còn liên quan đến chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn hoạt tính của nó, hoặc các chất chủ vận và các phân tử cùng nguồn gốc, hoặc theo cách khác, các chất đối kháng của chất này và liệu pháp miễn dịch và phương pháp chẩn đoán miễn dịch bằng cách sử dụng các chế phẩm này để phòng, chẩn đoán hoặc điều trị bệnh do tau, trong đó chế phẩm này được cho bệnh nhân có nhu cầu dùng với lượng hữu hiệu.

Tất nhiên, sáng chế lần lượt mở rộng sang bạch huyết bào B nhớ bất tử của người và tế bào B, tế bào này tạo ra kháng thể có các đặc tính riêng biệt và duy nhất như được định nghĩa dưới đây.

Sáng chế còn liên quan đến polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, vùng biến đổi này bao gồm ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR) của V_H và/hoặc V_L của vùng biến đổi như được thể hiện trên hình 7.

Do vậy, sáng chế còn bao gồm các vectơ bao gồm các polynucleotit đã nêu và các tế bào chủ được biến nạp với chúng cũng như việc sử dụng chúng để tạo ra kháng thể và các phân tử liên kết tương đương mà đặc hiệu với tau. Các phương tiện và phương pháp tạo ra tái tổ hợp các kháng thể và các chất có tác dụng của chúng cũng như các phương pháp sàng lọc để phát hiện các phân tử liên kết cạnh tranh, ví dụ, các kháng thể,đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tuy nhiên, như được mô tả trong bản mô tả này, cụ thể là, liên quan đến các ứng dụng điều trị bệnh trên người, kháng thể theo sáng chế là kháng thể của người theo nghĩa là việc áp dụng kháng thể này hầu như không gây ra đáp ứng miễn dịch hướng đến kháng thể như vậy, mà theo cách

khác, quan sát được đối với kháng thể của thể khảm và thậm chí là kháng thể được làm tương thích với người.

Hơn thế nữa, được bộc lộ trong bản mô tả này là chế phẩm và phương pháp mà có thể được dùng để nhận diện tau trong các mẫu. Có thể sử dụng các kháng thể kháng tau được bộc lộ để sàng lọc máu, CSF và nước tiểu của người để phát hiện ra sự có mặt của tau trong các mẫu này, ví dụ, bằng cách áp dụng thử nghiệm trên cơ sở ELISA hoặc thử nghiệm được làm thích ứng bề mặt. Các phương pháp và chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này có thể giúp ích cho các bệnh thoái hóa thần kinh do tau như chẩn đoán bệnh Alzheimer và có thể được sử dụng để theo dõi sự tiến triển của bệnh và mức độ hiệu nghiệm của việc điều trị bệnh.

Vì vậy, một mục đích cụ thể của sáng chế là đề xuất phương pháp điều trị, chẩn đoán hoặc phòng bệnh thoái hóa thần kinh do tau như bệnh Alzheimer, phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/hội chứng Parkinson–sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ có hạt ưa bạc, bệnh mạch máu do dạng tinh bột kiểu Anh, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột, bệnh thoái hóa vỏ não-đáy não, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh sa sút trí tuệ do chấn động não, bệnh vôi hóa đám rối sợi thần kinh phân tán, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương có hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh viêm cơ thể vùi, bệnh teo đa hệ, bệnh loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh Niemann-Pick kiểu C, bệnh tế bào thần kinh vận động có đám rối sợi thần kinh không phải kiểu đảo Guam, bệnh Pick, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột và protein prion, chứng tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, chứng liệt trên nhân tiến triển, bệnh viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, bệnh sa sút trí tuệ chỉ do đám rối, bệnh sa sút trí tuệ do có nhiều ổ nhồi máu não và bệnh đột quỵ do thiếu máu cục bộ. Các phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng này dùng mức hữu hiệu của kháng thể của người hoặc dẫn xuất kháng thể trong đó kháng thể này hướng đích đến tau.

Theo các phương án khác nữa của nó, sáng chế sẽ trở nên thấy rõ nhờ bản mô tả này và phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Trình tự axit amin và trình tự nucleotit chứa vùng biến đổi, tức là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lamđa của các kháng thể của người NI-105.4E4 (A), NI-105.24B2 (B) và NI-105.4A3 (C). Vùng khung (FR) và vùng xác định tính bổ trợ (CDR) được thể hiện với các CDR được gạch chân. Nhờ chiến lược tách dòng, trình tự axit amin ở đầu tận cùng N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ về tiềm năng có thể chứa các phần thay đổi do đoạn mồi gây ra trong FR1, tuy nhiên điều này hầu như không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của kháng thể. Để tạo ra kháng thể liên ứng của người, trình tự nucleotit và trình tự axit amin của dòng gốc được so sánh với và được điều chỉnh theo các trình tự của vùng biến đổi của dòng mầm thích hợp của người trong cơ sở dữ liệu; ví dụ, xem Vbase (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) được thuê lưu giữ tại MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Vương Quốc Anh). Các axit amin này, về tiềm năng, các axit amin này được xem là đi chệch khỏi trình tự của dòng mầm liên ứng do đoạn mồi PCR và vì vậy mà đã được thay thế trong trình tự axit amin, được thể hiện bằng nét đậm.

Hình 2. NI-105.4E4 liên kết với đám rối sợi thần kinh (neurofibrillary tangles - NFT), các sợi thần kinh loạn dưỡng và sợi mạng lưới thần kinh trong não của người mắc bệnh AD và chuột biểu hiện TauP301L của người. Việc nhuộm NI-105.4E4 nhận diện NFT và sợi mạng lưới thần kinh trong não AD (A), mà không có mức độ liên kết đáng kể nào với tau trong não của đối tượng đối chứng khỏe mạnh (B). Ở chuột chuyển gen TauP301L (E-I), NI-105.4E4 liên kết mạnh mẽ với NFT giống với tau gây bệnh (E, F và H), sợi mạng lưới thần kinh (E và G) và các sợi thần kinh loạn dưỡng (E và H). Hơn thế nữa, NI-105.4E4 cũng nhận diện các khối kết tụ tau trong giai đoạn tiền rối (I). NI-105.4E4 liên kết với NFT, các sợi thần kinh loạn dưỡng và sợi mạng lưới thần kinh ở chuột chuyển gen biểu hiện APP của người có đột biến kiểu Thụy Điển và đột biến kiểu Bắc Cực và TauP301L; mũi tên đánh dấu mảng dạng tinh bột beta, được bao quanh bởi các sợi thần kinh loạn dưỡng được nhận biết bởi NI-105.4E4 (J). Kháng thể thứ cấp chỉ không tạo ra tín hiệu cả ở người mắc bệnh AD (C) và đối chứng khỏe mạnh (D).

Hình 3. Thử nghiệm về khả năng phản ứng miễn dịch đối với mảng dạng tinh bột ở mô (tissue amyloid plaque immunoreactivity - TAPIR). Đám rối sợi thần kinh được

nhuộm bằng kháng thể kháng phospho-tau AT100 hoặc huyết thanh phân lập được từ các đối tượng cao tuổi khỏe mạnh.

Hình 4. Hình vẽ dạng sơ đồ của các epitop NI-105.4E4 và NI-105.4A3 và các epitop của các kháng thể tau đơn dòng của chuột thường được sử dụng có bán trên thị trường được thể hiện. Kháng thể của người NI-105.4E4 hướng đích epitop duy nhất mà chứa hai polypeptit mạch thẳng, một trong số chúng nằm trong miền liên kết của vi cấu trúc hình ống (R4) của tau mà được che kín trong tau liên quan đến vi cấu trúc hình ống sinh lý. Tau-12 (Covance, California, USA), HT7, AT8, AT180 (Thermo Scientific, Mỹ); PHF1 (Lewis *et al., Science* 293(2001),1487-1491).

Hình 5. Các lượng IgG của người trong huyết tương của các con chuột sau khi dùng trong màng bụng 30mg/kg kháng thể kháng tau NI-105.4E4 hoặc NI-105.4A3 của người.

Hình 6. Các lượng IgG của người trong dung dịch đồng nhất của não của chuột sau khi dùng trong màng bụng 30mg/kg kháng thể kháng tau NI-105.4E4 hoặc NI-105.4A3 của người.

Hình 7. Trình tự axit amin của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng tau của người (A) NI-105.17C1, (B) NI-105.6C5, (C) NI-105.29G10, (D) NI-105.6L9, (E) NI-105.40E8, (F) NI-105.48E5, (G) NI-105.6E3, (H) NI-105.22E1, (I) NI-105.26B12, (J) NI-105.12E12, (K) NI-105.60E7, (L) NI-105.14E2, (M) NI-105.39E2, (N) NI-105.19C6, và (O) NI-105.9C4. Các vùng xác định tính bổ trợ (CDR) được gạch chân.

Hình 8: (A) Mức độ liên kết của ch17C1, ch17C1(N31Q) mIgG2a và ch17C1(N31Q) mIgG1 Agly với Tau tái tổ hợp trong thử nghiệm ELISA. (B) So sánh mức liên kết với tau tái tổ hợp ch17C1(N31Q) mIgG2a và ch17C1(N31Q, I48V) mIgG2a trong thử nghiệm ELISA.

Hình 9. So sánh mức độ liên kết với tau tái tổ hợp NI-105.40E8 hIgG1 và NI-105.40E8(R104W) hIgG1 trong thử nghiệm ELISA.

Hình 10. Mức độ liên kết kháng thể kháng tau NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6C5 và NI-105.17C1(I48V) của người với tau được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý trong não của người mắc bệnh AD và trong não của mô hình chuột chuyển gen mắc bệnh do tau. Các hình ảnh làm ví dụ của kháng thể kháng tau của người liên kết với các khối kết tụ tau gây bệnh trong não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer (AD) và

trong não của chuột chuyển gen mắc bệnh do tau (Tg). Các mẫu mô đối chứng thu được từ đối tượng khỏe mạnh về sức khỏe tâm thần (Ctr) hoặc não của chuột hoang (Wt).

Hình 11. Mức độ thâm nhập não của các kháng thể kháng tau của người NI-105.6C5 hoặc NI-105.6E3 ở chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra. Ký tự "tg" biểu thị các phần cắt làm ví dụ từ các con chuột chuyển gen hoặc được điều trị hoặc không được điều trị, và "wt" biểu thị con chuột không chuyển gen không được điều trị. Tỷ lệ: 50µm.

Hình 12. Tác dụng của việc điều trị lâu dài các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra bằng ch4E4(N30Q) và ch17C1(N31Q). Tổng các lượng tau của người (A), tau pS199 của người (B), tau pT231 của người (C) và tau pT181 của người (D) trong phần hòa tan và không hòa tan của các chiết phẩm protein não được định lượng bằng ELISA thương mại.

Hình 13. Tau của người hòa tan và không hòa tan ở các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) được phát hiện theo phương pháp thấm tách Tây.

Hình 14. Nồng độ dược chất trung bình trong huyết tương của các con chuột được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) 24 giờ sau khi dùng trong màng bụng liều lượng cuối cùng. Các nồng độ dược chất trung bình trong huyết tương của ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) lần lượt là 145µg/ml và 200µg/ml.

Hình 15. Trí nhớ làm việc theo không gian ở các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) được đánh giá bằng mê lộ Y thử nghiệm kép.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Các bệnh thoái hóa thần kinh do tau là nhóm đa dạng bao gồm các rối loạn thoái hóa thần kinh mà có chung thương tổn bệnh thông thường bao gồm các khối kết tụ nội bào của các sợi bất thường mà chủ yếu bao gồm tau được phosphoryl hóa quá mức do nguyên nhân bệnh lý trong các tế bào thần kinh và/hoặc các tế bào đệm. Các dấu hiệu lâm sàng của các bệnh do tau là không tương đồng và đặc trưng bởi chứng sa sút trí tuệ và/hoặc các hội chứng vận động. Sự tích tụ tiến triển của các thể vùi tau dạng sợi

có thể gây ra sự thoái hóa tế bào thần kinh và sự thoái hóa tế bào đệm liên quan đến các khối lắng đọng khác dưới dạng, ví dụ, tinh bột beta trong bệnh Alzheimer hoặc dưới dạng thực thể gây bệnh duy nhất như được minh họa bằng các đột biến ở gen tau mà liên quan đến các dạng tổng quan của bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương và hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17). Vì tính không tương đồng của các biểu hiện lâm sàng của chúng, có thể đưa ra một danh mục không đầy đủ theo khả năng xảy ra của các bệnh do tau gây ra bệnh, kể cả bệnh Alzheimer, bệnh phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/hội chứng Parkinson–sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ có hạt ưa bạc, bệnh mạch máu do dạng tinh bột kiểu Anh, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột, bệnh thoái hóa vỏ não-đáy não, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh sa sút trí tuệ do chấn động não, bệnh vôi hóa đám rối sợi thần kinh phân tán, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương có hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh viêm cơ thể vùi, bệnh teo đa hệ, chứng loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh Niemann-Pick kiểu C, bệnh tế bào thần kinh vận động có đám rối sợi thần kinh không phải kiểu đảo Guam, bệnh Pick, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột và protein prion, chứng thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, bệnh liệt trên nhân tiến triển, bệnh viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, bệnh sa sút trí tuệ chỉ do đám rối dưới dạng, bệnh sa sút trí tuệ do có nhiều ổ nhồi máu não và bệnh đột quỵ do thiếu máu cục bộ; tổng quan, xem tài liệu: Lee *et al.*, *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001), 1121-1159 mà trong đó bảng 1 liệt kê các thành viên độc đáo của các bệnh do tau hoặc tài liệu: Sergeant *et al.*, *Bioch. Biophy. Acta* 1739 (2005), 179–97, với danh mục trên hình 2 trong tài liệu đó.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ "tau", được dùng thay thế cho nhau để chỉ một cách cụ thể dạng monome nguyên thể của tau. Thuật ngữ "tau" cũng được sử dụng để nhận diện chung các đồng phân cấu hình riêng khác của tau, ví dụ, các oligome hoặc các khối kết tụ của tau. Thuật ngữ "tau" cũng được sử dụng để chỉ chung tất cả các loại và các dạng của tau. Do sự tách intron luân phiên, 6 dạng đồng chức năng của tau có mặt trong não người. Các trình tự protein đối với các dạng đồng chức năng này là:

Dạng đồng chức năng của Tau của thai nhi gồm 352aa

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEE
AGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRG
AAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRS
RTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTE
NLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFK
DRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS
GDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL (SEQ ID NO: 1)

Dạng đồng chức năng của tau-B gồm 381aa

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESP
LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS
KSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKT
PPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPS
SAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSK
CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETH
KLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLAT
LADEVSASLAKQGL (SEQ ID NO: 2)

Dạng đồng chức năng của tau-C gồm 410aa

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESP
LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGT
TAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIAT
PRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPG
SRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGS
TENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD
FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV
VSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL (SEQ ID NO:3)

Dạng đồng chức năng của tau-D gồm 383aa

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGI
GDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAP
PGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPS
LPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKH

QPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSK
CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETH
KLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLAT
LADEVSASLAKQGL (SEQ ID NO: 4)

Dạng đồng chức năng của tau-E gồm 412aa

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESP
LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVS
KSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKT
PPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPS
SAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK
CGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYK
SPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL (SEQ ID
NO: 5)

Dạng đồng chức năng của tau-F gồm 441aa

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESP
LQTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGT
TAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIAT
PRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPG
SRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGS
TENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDL
SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGN
KKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVD
SPQLATLADEVSASLAKQGL (SEQ ID NO: 6)

Trình tự axit amin tau "kiểu dại" được thể hiện bằng dạng đồng chức năng của tau-F gồm 441aa (SEQ ID NO: 6) còn được gọi là "hTau40", "TauF", "Tau-4" hay "tau có chiều dài đầy đủ". Trình tự axit amin của tau có thể được truy tìm từ tài liệu chuyên ngành và các cơ sở dữ liệu thích hợp; xem tài liệu: Goedert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 4051-4055, Goedert *et al.*, *EMBO J.* 8(1989), 393-399, Goedert *et al.*, *EMBO J.* 9 (1990), 4225-4230 và GenBank UniProtKB/swissprot: locus TAU_HUMAN, các số hiệu lưu giữ P10636-2 (Tau của thai nhi) và P10636-4 đến P10636-8 (các dạng đồng chức năng B đến F).

Một dấu hiệu nổi bật khác của protein tau là sự phosphoryl hóa, xảy ra ở khoảng 30 trong số 79 vị trí phosphoryl hóa serin (Ser) và threonin (Thr). Tau được phosphoryl hóa ở mức độ cao trong suốt quá trình phát triển của não. Mức độ phosphoryl hóa giảm ở tuổi trưởng thành. Một số vị trí phosphoryl hóa nằm trong các miền liên kết của vi cấu trúc hình ống của tau, và đã thấy được rằng sự tăng mức độ phosphoryl hóa tau điều biến một cách tiêu cực mức độ liên kết của vi cấu trúc hình ống. Ví dụ, Ser262 và Ser396, mà nằm trong hoặc tiếp giáp với các motif liên kết của vi cấu trúc hình ống, được phosphoryl hóa quá mức của các protein tau của các sợi xoắn ghép cặp (paired helical filament - PHF) bất thường, một thành phần chính của đám rối sợi thần kinh (NFT) trong não của bệnh nhân mắc bệnh AD. PHF là các khối kết tụ dạng sợi của protein tau mà được phosphoryl hóa quá mức một cách bất thường và có thể được nhuộm bằng các kháng thể kháng tau đặc hiệu và được phát hiện theo phương pháp soi kính hiển vi quang học. Điều này cũng đúng đối với loại gọi là các sợi tau thẳng. PHF tạo các dải xoắn bao gồm hai sợi xoắn quanh nhau với chu kỳ khoảng 80nm. Các dấu hiệu bệnh này thường được gọi là "bệnh do tau", "bệnh do tau gây ra" hay "bệnh liên quan đến tau". Để biết về phần mô tả một cách chi tiết hơn về các dấu hiệu bệnh thần kinh của các bệnh do tau, xem tài liệu: Lee *et al.*, *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001), 1121-1159 và Götz, *Brain. Res. Rev.* 35 (2001), 266-286, nội dung bộc lộ của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Protein tau sinh lý làm ổn định vi cấu trúc hình ống trong các tế bào thần kinh. Sự phosphoryl hóa gây bệnh dẫn đến sự khu trú tau bất thường và sự kết tụ, điều này gây ra tình trạng mất ổn định của vi cấu trúc hình ống và quá trình vận chuyển tế bào suy yếu. Tau được kết tụ gây độc thần kinh *in vitro* (Khlistunova *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 1205-1214). Tuy nhiên, các loại gây độc thần kinh chính xác vẫn chưa được biết rõ, và (các) cơ chế mà nhờ đó chúng dẫn đến sự chết tế bào thần kinh cũng chưa được biết. Các khối kết tụ của tau có thể được quan sát dưới dạng thành phần chính của đám rối sợi thần kinh (NFT) ở nhiều bệnh do tau, như bệnh Alzheimer (AD), bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương, chứng liệt trên nhân, bệnh Pick, bệnh do hạt ưa bạc (AGD), bệnh thoái hóa vỏ não-đáy não, FTDP-17, bệnh Parkinson, bệnh sa sút trí tuệ do chấn động não (Reviewed in Gendron and Petrucelli, *Mol. Neurodegener.* 4:13 (2009)). Ngoài các quan sát này, có bằng chứng nổi lên rằng sự chết tế bào thần kinh do tau gây ra có thể xảy ra thậm chí khi không tạo đám rối. Các loại phospho-tau hòa tan có mặt trong

CSF (Aluise *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1782 (2008), 549–558). Các khối kết tụ tau có thể truyền trạng thái gấp cuộn sai từ bên ngoài vào bên trong của tế bào và chuyển giữa các tế bào được cùng nuôi cấy (Frost *et al.*, *J. Biol. Chem.* 284 (2009), 12845-12852).

Ngoài vấn đề liên quan đến các bệnh thoái hóa thần kinh do tau, các thay đổi quan sát được về mức phosphoryl hóa tau trong và sau chứng thiếu máu cục bộ/tái tưới máu cho thấy tau đóng vai trò cốt yếu trong tổn thương tế bào thần kinh và sinh lý bệnh học lâm sàng của các rối loạn thần kinh-mạch máu như bệnh đột quỵ do thiếu máu cục bộ (Zheng *và các đồng tác giả*, J. Cell. Biochem. 109 (2010), 26-29).

Các kháng thể kháng tau của người được bộc lộ trong bản mô tả này liên kết đặc hiệu với tau và các epitop của nó và với các dạng chất đồng phân cấu hình riêng khác nhau của tau và các epitop của nó. Ví dụ, được bộc lộ trong bản mô tả này là các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với tau, tau có chiều dài đầy đủ, các dạng đồng chức năng của tau được cải biến do nguyên nhân bệnh lý và các khối kết tụ tau. Như được sử dụng trong bản mô tả này, việc đề cập đến kháng thể mà "liên kết đặc hiệu", "liên kết một cách chọn lọc", hoặc "ưu tiên liên kết" với tau chỉ kháng thể mà không liên kết các protein không có liên quan khác. Trong một ví dụ, kháng thể tau được bộc lộ trong bản mô tả này có thể liên kết với tau hoặc epitop của nó và không thể hiện mức độ liên kết cao hơn 1,5 lần mức nền với các protein khác. Kháng thể mà "liên kết đặc hiệu" hoặc "liên kết một cách chọn lọc" với chất đồng phân cấu hình riêng tau chỉ kháng thể mà không liên kết tất cả các dạng chất đồng phân cấu hình riêng của tau, tức là không liên kết ít nhất với một đồng phân cấu hình riêng tau khác. Ví dụ, được bộc lộ trong bản mô tả này là các kháng thể mà có thể ưu tiên liên kết với các dạng kết tụ của tau trong mô bệnh AD. Vì các kháng thể kháng tau của người theo sáng chế đã phân lập được từ nhóm đối tượng là người khỏe mạnh biểu hiện đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với tau, nên các kháng thể tau của sáng chế cũng có thể được gọi là "các kháng thể tự sinh của người" để nhấn mạnh rằng các kháng thể đó đã thực sự được biểu hiện bởi các đối tượng này và đã không phân lập được từ, ví dụ, globulin miễn dịch của người biểu hiện thư viện thể thực khuẩn, quá trình này cho đến nay làm ví dụ cho một phương pháp thông thường nhằm cố gắng tạo ra các kháng thể giống như kháng thể của người.

Cần phải lưu ý rằng thuật ngữ "một" thực thể chỉ một hoặc nhiều thực thể đó; ví dụ, "một kháng thể", được hiểu là một hoặc nhiều kháng thể. Như vậy, các thuật ngữ

"một", "một hoặc nhiều", và "ít nhất một"có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit" được dự định bao gồm "polypeptit" dạng số ít cũng như "các polypeptit" dạng số nhiều, và chỉ phân tử bao gồm các monome (các axit amin) được liên kết kiểu tuyến tính bằng các liên kết amit (còn được gọi là các liên kết peptit). Thuật ngữ "polypeptit" chỉ chuỗi hoặc các chuỗi bất kỳ có hai hoặc nhiều axit amin, và không đề cập đến chiều dài cụ thể của sản phẩm này. Vì vậy, các peptit, các đipeptit, các tripeptit, các oligopeptit, "protein", "chuỗi axit amin", hoặc thuật ngữ bất kỳ khác được sử dụng để chỉ một chuỗi hoặc các chuỗi có hai hoặc nhiều axit amin, đều nằm trong định nghĩa về "polypeptit", và thuật ngữ "polypeptit" có thể được sử dụng thay vì, hoặc thay thế cho nhau bằng thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ này.

Thuật ngữ "polypeptit" cũng được dự định để chỉ các sản phẩm của các cải biến sau biểu hiện của polypeptit, bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, quá trình glycosyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/phong bế đã biết, quá trình phân cắt bằng cách phân giải protein, hoặc quá trình cải biến bằng các axit amin không có trong tự nhiên. Polypeptit có thể thu được từ nguồn sinh học tự nhiên hoặc được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp, nhưng không nhất thiết phải được dịch mã từ trình tự của axit nucleic chỉ định. Nó có thể tạo ra theo phương pháp bất kỳ, kể cả theo phương pháp tổng hợp hóa học.

Polypeptit theo sáng chế có thể có kích thước khoảng 3 hoặc nhiều axit amin , 5 hoặc nhiều axit amin, 10 hoặc nhiều axit amin, 20 hoặc nhiều axit amin, 25 hoặc nhiều axit amin, 50 hoặc nhiều axit amin, 75 hoặc nhiều axit amin, 100 hoặc nhiều axit amin, 200 hoặc nhiều axit amin, 500 hoặc nhiều axit amin, 1.000 hoặc nhiều axit amin, hoặc 2.000 hoặc nhiều axit amin. Các polypeptit có thể có cấu trúc không gian ba chiều xác định, mặc dù chúng không nhất thiết phải có cấu trúc như vậy. Các polypeptit có cấu trúc không gian ba chiều xác định được gọi là dạng được gấp cuộn, và các polypeptit mà không có cấu trúc không gian ba chiều xác định, nhưng hơn thế, có thể có một số lớn các dạng chất đồng phân cấu hình riêng khác nhau, và được gọi là dạng không được gấp cuộn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ glycoprotein chỉ protein liên hợp với ít nhất một gốc hydratcacbon mà được gắn vào protein thông qua

chuỗi bên chứa oxy hoặc chuỗi bên chứa nitơ của gốc axit amin, ví dụ, gốc serin hoặc gốc asparagin.

Polypeptit "phân lập được" hoặc đoạn, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được dự định chỉ polypeptit mà không ở trong môi trường tự nhiên của nó. Không cần đến mức làm sạch cụ thể nào. Ví dụ, polypeptit phân lập được có thể được lấy ra khỏi môi trường tự nhiên hoặc nguyên thể của nó. Các polypeptit được tạo ra theo phương pháp tái tổ hợp và các protein được biểu hiện trong các tế bào chủ được xem là phân lập được đối với mục đích của sáng chế, và các polypeptit tái tổ hợp hoặc nguyên thể mà đã được tách ra, được phân đoạn, hoặc được làm sạch một phần hoặc được làm sạch đáng kể theo kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

Cũng bao hàm bởi thuật ngữ các polypeptit theo sáng chế là các đoạn, các chất dẫn xuất, các chất tương tự hoặc các biến thể của các polypeptit nêu trên, và dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các thuật ngữ "đoạn", "biến thể", "chất dẫn xuất" và "chất tương tự" khi đề cập đến các kháng thể hoặc các polypeptit của kháng thể theo sáng chế chứa các polypeptit bất kỳ mà giữ lại ít nhất một số tính tác nhân liên kết với kháng nguyên của phân tử, kháng thể, hoặc polypeptit liên kết với nguyên thể tương ứng. Các đoạn của các polypeptit theo sáng chế chứa các đoạn phân giải protein, cũng như các đoạn xóa bỏ, ngoài các đoạn kháng thể đặc hiệu được bàn luận ở chỗ bất kỳ trong bản mô tả này. Các biến thể của các kháng thể và polypeptit của kháng thể theo sáng chế chứa các đoạn như được mô tả trên đây, và đồng thời các polypeptit có các trình tự axit amin được thay đổi bởi các đoạn thay thế, việc xóa bỏ hoặc việc chèn axit amin. Các biến thể có thể có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên. Các biến thể không có trong tự nhiên có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các kỹ thuật tạo đột biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các polypeptit biến thể có thể bao gồm các đoạn thay thế, xóa bỏ hoặc thêm axit amin kiểu bảo toàn hoặc không bảo toàn. Các chất dẫn xuất của các phân tử liên kết đặc hiệu với tau, ví dụ, các kháng thể và polypeptit của kháng thể theo sáng chế, là các polypeptit mà đã được thay đổi để biểu hiện các dấu hiệu bổ sung không tìm thấy được trên polypeptit nguyên thể. Các ví dụ bao gồm các protein dung hợp. Các polypeptit biến thể trong bản mô tả này còn có thể được gọi là "các chất tương tự polypeptit". Như được sử dụng trong bản mô tả này, "chất dẫn xuất" của phân tử liên kết hoặc đoạn của nó, kháng thể, hoặc polypeptit của kháng thể chỉ polypeptit có một hoặc nhiều gốc được tạo chất dẫn xuất bằng cách hóa học bằng

phản ứng của nhóm chức bên. Cũng nằm trong thuật ngữ "các chất dẫn xuất" là các peptit mà chứa một hoặc nhiều chất dẫn xuất axit amin có trong tự nhiên của hai mươi axit amin tiêu chuẩn. Ví dụ, 4-hyđroxyprolin có thể thế đối với prolin; 5-hyđroxylysin có thể được dùng để thế cho lysin; 3-metylhistiđin có thể được dùng để thế cho histiđin; homoserin có thể được dùng để thế cho serin; và ornitin có thể được dùng để thế cho lysin.

Thuật ngữ "polynucleotit" được dự định bao gồm axit nucleic dạng số ít cũng như các axit nucleic dạng số nhiều, và chỉ một cấu trúc hoặc phân tử axit nucleic phân lập được, ví dụ, ARN thông tin (mRNA) hoặc ADN plasmit (pDNA). Polynucleotit có thể chứa liên kết phosphođieste thông thường hoặc một liên kết không thông thường (ví dụ, liên kết amit, như được tìm thấy trong các axit nucleic peptit (PNA)). Thuật ngữ "axit nucleic" chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic bất kỳ, ví dụ, đoạn ADN hoặc đoạn ARN, có mặt trong polynucleotit. Thuật ngữ axit nucleic hoặc polynucleotit "phân lập được" được dự định chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, mà đã được loại ra khỏi môi trường nguyên thể của nó. Ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa kháng thể chứa trong vectơ thì được xem là phân lập được đối với mục đích của sáng chế. Các ví dụ khác nữa về polynucleotit phân lập được bao gồm các polynucleotit tái tổ hợp được duy trì trong các tế bào chủ khác nguồn gốc hoặc các polynucleotit đã được làm sạch (một phần hoặc đáng kể) trong dung dịch. Các phân tử ARN phân lập được bao gồm các sản phẩm phiên mã ARN *in vivo* hoặc *in vitro* của các polynucleotit theo sáng chế. Các polynucleotit hoặc các axit nucleic phân lập được theo sáng chế còn bao gồm các phân tử như vậy được chế tạo theo phương pháp tổng hợp. Hơn thế nữa, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể là hoặc có thể chứa một yếu tố điều hòa như trình tự khởi đầu, vị trí liên kết ribosom, hoặc yếu tố kết thúc phiên mã.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vùng mã hóa" là một phần của axit nucleic mà chứa các codon được dịch mã thành các axit amin. Mặc dù "codon kết thúc" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin, nhưng nó có thể được xem là một phần của vùng mã hóa, nhưng các trình tự tiếp xúc bên sườn bất kỳ, ví dụ, trình tự khởi đầu, vị trí liên kết ribosom, yếu tố kết thúc phiên mã, intron, và các thứ tương tự, không phải là một phần của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều vùng mã hóa của sáng chế có thể có mặt trong một cấu trúc polynucleotit duy nhất, ví dụ, trên một vectơ duy nhất, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit riêng biệt, ví dụ, trên các vectơ

riêng biệt (khác nhau). Hơn thế nữa, vectơ bất kỳ có thể chứa một vùng mã hóa duy nhất, hoặc có thể bao gồm hai hoặc nhiều vùng mã hóa, ví dụ, vectơ duy nhất có thể mã hóa một cách riêng biệt vùng biến đổi của chuỗi nặng của globulin miễn dịch và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Hơn thế nữa, vectơ, polynucleotit, hoặc axit nucleic của sáng chế có thể mã hóa các vùng mã hóa khác nguồn gốc, hoặc được dung hợp hoặc không được dung hợp với axit nucleic mã hóa phân tử liên kết, kháng thể, hoặc đoạn, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó. Các vùng mã hóa khác nguồn gốc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các motif hoặc yếu tố chuyên dụng, như peptit tín hiệu tiết hoặc miền chức năng khác nguồn gốc.

Theo các phương án nhất định, polynucleotit hoặc axit nucleic là ADN. Trong trường hợp ADN, polynucleotit chứa axit nucleic mà mã hóa polypeptit một cách bình thường có thể chứa trình tự khởi đầu và/hoặc các yếu tố kiểm soát quá trình phiên mã hoặc dịch mã khác được liên hợp linh hoạt với một hoặc nhiều vùng mã hóa. Sự liên hợp linh hoạt là khi vùng mã hóa dùng cho sản phẩm gen, ví dụ, polypeptit, được liên hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách điều khiển đặt sự biểu hiện sản phẩm gen dưới sự ảnh hưởng hoặc liên hợp linh hoạt của (các) trình tự điều hòa. Hai đoạn ADN (như vùng mã hóa polypeptit và trình tự khởi đầu liên quan đến nó) là "được liên hợp linh hoạt" hoặc "được liên kết linh hoạt" nếu sự tạo ra chức năng trình tự khởi đầu dẫn đến sự phiên mã ARN thông tin mã hóa sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của liên kết giữa hai đoạn ADN không cản trở khả năng của các trình tự điều hòa sự biểu hiện để hướng đến sự biểu hiện của sản phẩm gen hoặc cản trở khả năng được phiên mã của khuôn ADN. Vì vậy, trình tự khởi đầu sẽ được liên hợp linh hoạt với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu trình tự khởi đầu có khả năng tác động vào quá trình phiên mã của axit nucleic đó. Trình tự khởi đầu này có thể là trình tự khởi đầu đặc hiệu với tế bào mà hướng đến quá trình phiên mã cơ bản của ADN chỉ trong các tế bào định trước. Các yếu tố kiểm soát quá trình phiên mã, ngoài trình tự khởi đầu, ví dụ, trình tự tăng cường, vùng vận hành, vùng ức chế, và tín hiệu chấm dứt quá trình phiên mã, có thể được liên hợp linh hoạt với polynucleotit để hướng đến sự phiên mã đặc hiệu với tế bào. Các trình tự khởi đầu thích hợp và các vùng kiểm soát quá trình phiên mã khác được bộc lộ trong bản mô tả này.

Rất nhiều vùng kiểm soát quá trình phiên mã đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết. Các vùng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các

vùng kiểm soát quá trình phiên mã mà hoạt động trong các tế bào của động vật có xương sống, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự khởi đầu và trình tự tăng cường thu được từ virut cự bào (trình tự khởi đầu tiền sớm, cùng với intron-A), virut khỉ 40 (trình tự khởi đầu sớm), và các retrovirut (như virut gây bệnh sacôm Rous). Các vùng kiểm soát quá trình phiên mã khác bao gồm các vùng thu được từ các gen động vật có xương sống như actin, protein sốc nhiệt, hormon tăng trưởng của bò và ß-globin của thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng kiểm soát sự biểu hiện gen trong các tế bào có nhân thực. Các vùng kiểm soát quá trình phiên mã thích hợp bổ sung chứa các trình tự tăng cường và các trình tự khởi đầu đặc hiệu với mô cũng như các trình tự khởi đầu có thể được tạo ra bởi lymphokin (ví dụ, các trình tự khởi đầu có thể được tạo ra bởi interferon hoặc interleukin).

Tương tự, rất nhiều yếu tố kiểm soát quá trình dịch mã đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết. Các vùng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vị trí liên kết ribosom, codon khởi đầu và codon kết thúc quá trình dịch mã, và các yếu tố thu được từ picornavirut (cụ thể là, điểm vào ribosom bên trong, hay IRES, còn được gọi là trình tự CITE).

Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, ví dụ, ở dạng ARN thông tin (mRNA).

Các vùng mã hóa axit nucleic và polynucleotit theo sáng chế có thể được liên quan đến các vùng mã hóa bổ sung mà mã hóa peptit tiết hoặc peptit tín hiệu, mà hướng đến quá trình tiết polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Theo giả thuyết tín hiệu, các protein do các tế bào của động vật có vú tiết có peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu tiết mà được phân cắt từ protein trưởng thành một khi quá trình xuất chuỗi protein tăng trưởng qua lưới nội bào chất thô đã được khởi đầu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rằng các polypeptit do các tế bào của động vật có xương sống tiết nói chung có peptit tín hiệu được dung hợp với đầu tận cùng N của polypeptit, mà được phân cắt từ polypeptit hoàn chỉnh hay "có chiều dài đầy đủ" để tạo ra dạng được tiết hay "trưởng thành" của polypeptit. Theo các phương án nhất định, peptit tín hiệu nguyên thể, ví dụ, peptit tín hiệu của chuỗi nặng hoặc của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch được sử dụng, hoặc chất dẫn xuất có nhóm chức của trình tự đó mà giữ lại khả năng hướng đến quá trình tiết polypeptit mà được liên hợp linh hoạt với nó. Theo cách khác, có thể sử dụng peptit tín hiệu của động vật

có vú khác nguồn gốc, hoặc chất dẫn xuất có nhóm chức của nó. Ví dụ, trình tự dẫn đầu kiểu dại có thể được thế bằng trình tự dẫn đầu của chất hoạt hóa plasminogen của mô (tissue plasminogen activator - TPA) của người hoặc ß-glucuroniđaza của chuột.

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ "rối loạn" và "bệnh" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

"Phân tử liên kết" như được sử dụng trong bản mô tả sáng chế chủ yếu liên quan đến các kháng thể, và các đoạn của chúng, nhưng còn có thể liên quan đến các phân tử không phải của kháng thể khác có chức năng liên kết với tau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hormon, thụ thể, phối tử, phân tử phức hợp tương hợp mô chính (major histocompatibility complex-MHC), các chaperon như protein sốc nhiệt (heat shock protein-HSP) cũng như các phân tử kết dính tế bào-tế bào như các thành viên của siêu họ cadherin, intergrin, lectin typ C và globulin miễn dịch (Ig). Vì vậy, để rõ ràng và không giới hạn phạm vi của sáng chế hầu hết các phương án nêu dưới đây được bàn luận liên quan đến các kháng thể và các phân tử giống với kháng thể mà là các phân tử liên kết theo một phương án nhất định dùng để phát triển chế phẩm dùng để điều trị bệnh và chẩn đoán bệnh.

Các thuật ngữ "kháng thể" và "globulin miễn dịch" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Kháng thể hoặc globulin miễn dịch là phân tử liên kết với tau mà chứa ít nhất miền biến đổi của chuỗi nặng, và thường chứa ít nhất các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các cấu trúc globulin miễn dịch cơ bản ở các hệ động vật có xương sống đã được hiểu tương đối rõ; ví dụ, xem tài liệu: Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed, 1988).

Như sẽ được bàn luận một cách chi tiết hơn dưới đây, thuật ngữ "globulin miễn dịch" bao gồm các nhóm rộng lớn khác nhau bao gồm các polypeptit mà có thể được phân biệt về mặt hóa sinh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng các chuỗi nặng được phân loại là gama, mu, alpha, đelta, hoặc epsilon, (γ, μ, α, δ, ε) với một số phân nhóm trong số chúng (ví dụ, γ1 đến γ4). Chính bản chất của chuỗi này mà xác định "nhóm" của kháng thể lần lượt là IgG, IgM, IgA IgG, hoặc IgE. Các phân nhóm globulin miễn dịch (các kiểu tương đương), ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, v.v. được xác định đặc điểm và biết rõ là tạo ra sự chuyên dụng hóa chức năng. Các phiên bản được cải biến của mỗi nhóm trong số các nhóm này và các

kiểu tương đương được người có hiểu biết trung bình dễ dàng nhận biết khi đọc bản mô tả này và, do vậy, thuộc phạm vi của sáng chế. Tất cả các nhóm globulin miễn dịch rõ ràng là thuộc phạm vi của sáng chế, phần bàn luận dưới đây, nhìn chung, sẽ hướng đến nhóm IgG của các phân tử globulin miễn dịch. Liên quan đến IgG, phân tử globulin miễn dịch tiêu chuẩn chứa hai polypeptit chuỗi nhẹ tương đồng có trọng lượng phân tử khoảng 23.000 dalton, và hai polypeptit chuỗi nặng tương đồng có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 53.000 đến 70.000. Bốn chuỗi này thường được nối bằng liên kết với đisulfualiên kết với đisulfua theo cấu hình "Y" trong đó các chuỗi nhẹ ôm lấy các chuỗi nặng bắt đầu trên phần miệng của "Y" và tiếp tục cho đến vùng biến đổi.

Các chuỗi nhẹ được phân loại là kapa hoặc lamđa (κ, λ). Mỗi nhóm chuỗi nặng có thể được liên kết với chuỗi nhẹ kapa hoặc chuỗi nhẹ lamđa. Nhìn chung, chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết cộng hóa trị với nhau, và các phần "đuôi" của hai chuỗi nặng được liên kết với nhau bằng các liên kết với đisulfua cộng hóa trị hoặc các liên kết không cộng hóa trị nếu các globulin miễn dịch được tạo ra bởi tế bào lai, các tế bào B hoặc các tế bào chủ được tạo ra theo kỹ thuật di truyền. Trong chuỗi nặng, trình tự axit amin chạy từ đầu tận cùng N ở các đầu cuối có chạc của cấu hình Y đến đầu tận cùng C ở đáy của mỗi chuỗi.

Cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được chia ra thành các vùng có tính tương đồng cấu trúc và tính tương đồng chức năng. Các thuật ngữ "ổn định" và "biến đổi" được sử dụng theo chức năng. Theo khía cạnh này, cần phải nhận thấy rằng các miền biến đổi của cả phần chuỗi nhẹ (V_L) và phần chuỗi nặng (V_H) xác định tính đặc hiệu và khả năng nhận biết kháng nguyên. Trái lại, các miền ổn định của chuỗi nhẹ (CL) và chuỗi nặng (CH1, CH2 hoặc CH3) tạo ra các tính chất sinh học quan trọng như khả năng tiết, khả năng di động qua nhau thai, liên kết với thụ thể Fc, liên kết với bổ thể và các tính chất tương tự. Theo quy ước, phương pháp đánh số của vùng hằng định tăng lên khi chúng xa dần tính từ vị trí liên kết với kháng nguyên hoặc đầu tận cùng amin của kháng thể. Phần có đầu tận cùng N là vùng biến đổi và trên phần có đầu tận cùng C là vùng hằng định; miền CH3 và miền CL thực sự lần lượt chứa đầu tận cùng carboxy của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Như nêu trên, vùng biến đổi cho phép kháng thể nhận biết một cách chọn lọc và liên kết đặc hiệu với các epitop trên kháng nguyên. Cho là, miền V_L và miền V_H, hoặc

phân nhóm của các vùng xác định tính bổ trợ (CDR), của kháng thể kết hợp để tạo ra vùng biến đổi mà định ranh giới vị trí liên kết với kháng nguyên không gian ba chiều. Cấu trúc bậc bốn này của kháng thể tạo ra vị trí liên kết với kháng nguyên có mặt trên đầu tận cùng của mỗi nhánh của Y. Cụ thể hơn, vị trí liên kết với kháng nguyên được định ranh giới bởi ba CDR trên mỗi chuỗi trong số chuỗi V_H và chuỗi V_L. Đoạn kháng thể hay globulin miễn dịch bất kỳ mà chứa đủ cấu trúc để liên kết đặc hiệu với tau trong bản mô tả này được biểu thị thay thế cho nhau là "đoạn liên kết" hoặc "đoạn đặc hiệu miễn dịch".

Trong các kháng thể có trong tự nhiên, một kháng thể chứa sáu vùng siêu biến, đôi khi được gọi là "vùng xác định tính bổ trợ" hay "CDR" có mặt trong mỗi miền liên kết với kháng nguyên, mà là ngắn, các trình tự không liền kề của các axit amin mà được bố trí một cách đặc hiệu để tạo ra miền liên kết với kháng nguyên khi mà kháng thể nhận cấu hình không gian ba chiều của nó trong môi trường nước. "CDR" được đặt bên sườn bởi bốn vùng "khung" được bảo toàn tương đối hay "FR" mà thể hiện ít tính biến đổi liên phân tử hơn. Các vùng khung chủ yếu nhận cấu hình riêng phiến β và các CDR tạo ra vòng mà nối, và trong một số trường hợp, tạo ra một phần của, cấu trúc phiến β. Vì vậy, các vùng khung hoạt động để tạo ra khung có tác dụng trợ giúp để bố trí các CDR theo định hướng chính xác bằng các tương tác không cộng hóa trị liên chuỗi. Miền liên kết với kháng nguyên được tạo ra bởi CDR xác định ranh giới bề mặt bổ trợ cho epitop trên kháng nguyên phản ứng miễn dịch. Bề mặt bổ trợ này thúc đẩy sự liên kết không cộng hóa trị của kháng thể với epitop cùng nguồn gốc của nó. Các axit amin lần lượt chứa các CDR và các vùng khung, có thể dễ dàng được nhận diện đối với vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nhất định bất kỳ bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, vì chúng đã được định nghĩa một cách chính xác; xem, "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); và Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196 (1987), 901-917, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Trong trường hợp có từ hai hoặc nhiều định nghĩa về thuật ngữ mà được sử dụng và/hoặc được chấp nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này, định nghĩa về thuật ngữ như được sử dụng trong bản mô tả này được dự định bao gồm tất cả các nghĩa như vậy trừ khi rõ ràng có quy định khác. Một ví dụ cụ thể là việc sử dụng thuật ngữ "vùng xác định tính

bổ trợ" ("CDR") để mô tả các vị trí kết hợp kháng nguyên không liền kề được tìm thấy trong vùng biến đổi của cả polypeptit chuỗi nặng và polypeptit chuỗi nhẹ. Vùng cụ thể này đã được mô tả trong tài liệu: Kabat *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*" (1983) và bởi Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196 (1987), 901-917, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ, trong đó các định nghĩa này bao gồm phần chồng lấn hoặc các tập con của các gốc axit amin nếu được so sánh với nhau. Tuy nhiên, việc áp dụng một trong số hai định nghĩa này để chỉ CDR của kháng thể hoặc các biến thể của nó được dự định nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được định nghĩa và được sử dụng trong bản mô tả này. Các gốc axit amin thích hợp mà bao gồm các CDR như được định nghĩa bởi mỗi tài liệu trong số các tài liệu tham khảo được trích dẫn trên đây được nêu dưới đây trong bảng 1 để so sánh. Số lượng gốc chính xác mà bao gồm CDR cụ thể sẽ thay đổi tùy thuộc vào trình tự và kích thước của CDR. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thường có thể xác định các gốc nào chứa vùng siêu biến cụ thể hoặc CDR của phân nhóm IgG của người của kháng thể nếu trình tự axit amin của vùng biến đổi là của kháng thể.

Bảng 1: Các định nghĩa về CDR[1]

	Kabat	**Chothia**
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

[1]Cách đánh số tất cả các định nghĩa về CDR trong bảng 1 là theo các quy ước đánh số theo Kabat và các đồng tác giả (xem dưới đây).

Kabat và các đồng tác giả cũng xác định hệ đánh số dùng cho các trình tự của miền biến đổi mà có thể áp dụng được cho kháng thể bất kỳ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể gán một cách linh hoạt hệ "phương pháp đánh số Kabat" này cho trình tự của miền biến đổi bất kỳ, mà không cần cậy dựa vào dữ liệu

thử nghiệm bất kỳ vượt ra ngoài chính trình tự này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "phương pháp đánh số Kabat" chỉ hệ đánh số theo tài liệu: Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "*Sequence of Proteins of Immunological Interest*" (1983). Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến phương pháp đánh số các vị trí của axit amin cụ thể trong kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó theo sáng chế là theo hệ đánh số Kabat, tuy nhiên, đây là về mặt lý thuyết và có thể không áp dụng như nhau đối với mọi kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, tùy thuộc vào vị trí của CDR thứ nhất, các CDR sau có thể được dịch chuyển theo một trong số hai chiều.

Các kháng thể hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các đoạn đặc hiệu miễn dịch, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa đặc hiệu, kháng thể của người, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể được làm tương thích với linh trưởng, kháng thể được làm tương thích với chuột hoặc kháng thể của thể khảm, kháng thể chuỗi đơn, các đoạn liên kết với epitop, ví dụ, Fab, Fab' và $F(ab')_2$, Fd, Fv, Fv chuỗi đơn (scFv), các kháng thể chuỗi đơn, Fv được liên kết với đisulfua (sdFv), các đoạn chứa miền V_L hoặc miền V_H, các đoạn được tạo ra bằng thư viện biểu hiện Fab, và các kháng thể kháng idiotyp (kháng Id) (kể cả, ví dụ, kháng thể kháng Id đối với các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này). Các phân tử ScFv là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 5,892,019. Globulin miễn dịch hoặc các phân tử kháng thể theo sáng chế có thể thuộc loại bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, và IgY), nhóm (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm phân tử globulin miễn dịch.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế không phải là kháng thể IgM hoặc chất dẫn xuất của nó có cấu trúc hóa trị năm. Cụ thể, trong các ứng dụng cụ thể của sáng chế, đặc biệt là để điều trị bệnh, kháng thể IgM kém hữu ích hơn kháng thể IgG và các kháng thể hóa trị hai khác hoặc các phân tử liên kết tương ứng vì kháng thể IgM do cấu trúc hóa trị năm của chúng và thiếu mức thành thục ái lực thường thể hiện tính phản ứng chéo không đặc hiệu và ái lực rất thấp.

Theo một phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế không phải là kháng thể đa dòng, tức là nó hầu như là một loại kháng thể nhất định mà không phải là một hỗn hợp thu được từ mẫu globulin miễn dịch huyết tương.

Các đoạn kháng thể, kể cả các kháng thể chuỗi đơn, có thể chứa (các) vùng biến đổi đơn độc hoặc kết hợp toàn bộ hoặc một phần của loại sau: vùng bản lề, các miền CH1, CH2, và CH3. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các đoạn liên kết với tau chứa một hỗn hợp bất kỳ của (các) vùng biến đổi với vùng bản lề, các miền CH1, CH2, và CH3. Các kháng thể hoặc các đoạn đặc hiệu miễn dịch của nó theo sáng chế có thể có nguồn gốc động vật bất kỳ kể cả chim và động vật có vú. Theo một phương án, các kháng thể là kháng thể của người, chuột, lừa, thỏ, dê, chuột lang, lạc đà, lạc đà không bướu, ngựa, hoặc kháng thể của gà. Theo một phương án khác, vùng biến đổi có thể thu được từ loài có xương sụn (ví dụ, từ cá mập).

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng của người phân lập được từ người. Tùy ý, vùng khung của kháng thể của người được so sánh và chấp nhận sử dụng theo các trình tự của vùng biến đổi dòng mầm thích hợp của người trong cơ sở dữ liệu; ví dụ, xem, Vbase(http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) được thuê lưu giữ tại MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Vương Quốc Anh). Ví dụ, các axit amin được xem là chệch khỏi trình tự của dòng mầm thực sự có thể là do các trình tự của đoạn mồi PCR được sáp nhập trong suốt quá trình tách dòng. So với các kháng thể giống như kháng thể của người được tạo ra bằng cách nhân tạo như các đoạn kháng thể chuỗi đơn (scFv) từ thư viện kháng thể được biểu hiện bằng thể thực khuẩn hoặc chuột khác loài, kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế đặc trưng bởi (i) việc thu được bằng cách sử dụng đáp ứng miễn dịch của người mà không phải là đáp ứng miễn dịch của đối tượng thay thế là động vật, tức là kháng thể đã được tạo ra đáp lại tau tự nhiên theo cấu hình riêng thích hợp của nó trong cơ thể người, (ii) đã bảo vệ cá thể hoặc ít nhất quan trọng đối với sự có mặt của tau, và (iii) vì kháng thể này thu được từ người, nên các nguy cơ về tính phản ứng chéo kháng lại các kháng nguyên bản thân được giảm đến mức tối thiểu. Vì vậy, theo sáng chế, các thuật ngữ "kháng thể đơn dòng của người", "tự kháng thể đơn dòng của người", "kháng thể của người" và các chất tương tự được sử dụng để chỉ phân tử liên kết với tau mà thu được từ người, tức là chất này đã phân lập được từ tế bào của người như tế bào B hoặc tế bào lai của nó hoặc ADN bổ trợ của nó đã được tách dòng một cách trực tiếp từ ARN thông tin của tế bào của người, ví dụ, tế bào B nhớ của người. Kháng thể của người vẫn là kháng thể "của người" ngay cả khi các đoạn thay thế axit amin được tạo ra trong kháng thể, ví dụ, để cải thiện các đặc tính liên kết.

Các kháng thể thu được từ các thư viện globulin miễn dịch của người hoặc từ các động vật chuyển gen đối với một hoặc nhiều globulin miễn dịch của người và không biểu hiện các globulin miễn dịch nội sinh, như được mô tả dưới đây và, ví dụ, trong patent Mỹ số 5,939,598 cấp cho Kucherlapati và các đồng tác giả, là các kháng thể giống như kháng thể của người được chỉ ra để phân biệt chúng với các kháng thể thực sự của người theo sáng chế.

Ví dụ, sự ghép cặp của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể giống như kháng thể của người như kháng thể tổng hợp và kháng thể bán tổng hợp thường phân lập được từ phần biểu hiện thể thực khuẩn không nhất thiết phản ánh sự ghép cặp nguyên thủy khi nó đã xảy ra trong tế bào B nguyên thủy của người. Do đó, đoạn Fab và đoạn scFv thu được từ các thư viện biểu hiện tái tổ hợp như thường được sử dụng trong giải pháp kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này có thể được xem là nhân tạo với tất cả các tác dụng có liên quan có thể đối với tính sinh miễn dịch và tính ổn định.

Trái lại, sáng chế đề xuất các kháng thể có ái lực thuần thục phân lập được từ đối tượng được chọn là người, kháng thể này đặc trưng bởi tính hữu ích để điều trị bệnh của chúng và tính dung nạp của chúng của người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với chuột" hay "globulin miễn dịch được làm tương thích với chuột" chỉ kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR từ kháng thể của người theo sáng chế; và vùng khung của người mà chứa các đoạn thay thế axit amin và/hoặc các đoạn loại bỏ axit amin và/hoặc các đoạn chèn axit amin dựa trên trình tự kháng thể của chuột. Globulin miễn dịch của người cung cấp các CDR được gọi là "thể gốc" hoặc "thể nhận" và kháng thể của chuột cung cấp các thay đổi của vùng khung được gọi là "thể cho". Các vùng hằng định không nhất thiết phải có mặt, nhưng nếu có mặt, chúng hầu như thường tương đồng với các vùng hằng định của kháng thể của chuột, tức là tương đồng ít nhất 85% đến 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%. Vì vậy, theo một số phương án, chuỗi nặng của globulin miễn dịch hoặc chuỗi nhẹ của người được làm tương thích với chuột có chiều dài đầy đủ chứa vùng hằng định của chuột, CDR của người, và hầu như khung của người mà có số lượng đoạn thay thế axit amin "được làm tương thích với chuột". Thông thường, "kháng thể được làm tương thích với chuột" là kháng thể chứa chuỗi nhẹ biến đổi được làm tương thích với chuột và/hoặc chuỗi nặng biến đổi được làm tương thích với chuột. Ví dụ, kháng thể được làm tương thích với chuột sẽ không bao

gồm kháng thể của thể khảm tiêu biểu, ví dụ, bởi vì toàn bộ vùng biến đổi của kháng thể của thể khảm là không phải kháng thể của chuột. Kháng thể được cải biến mà đã được "được làm tương thích với chuột" theo quy trình "làm tương thích với chuột" liên kết với cùng một kháng nguyên với kháng thể gốc mà tạo ra các CDR và thường có tính sinh miễn dịch kém hơn ở chuột, so với kháng thể gốc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần chuỗi nặng" bao gồm các trình tự axit amin thu được từ chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Polypeptit chứa phần chuỗi nặng chứa ít nhất một trong số: miền CH1, miền bản lề (ví dụ, vùng bản lề trên, giữa, và/hoặc dưới), miền CH2, miền CH3, hoặc biến thể hoặc đoạn của nó. Ví dụ, polypeptit liên kết để sử dụng trong sáng chế có thể chứa chuỗi polypeptit chứa miền CH1; chuỗi polypeptit chứa miền CH1, ít nhất một phần của miền bản lề, và miền CH2; chuỗi polypeptit chứa miền CH1 và miền CH3; chuỗi polypeptit chứa miền CH1, ít nhất một phần của miền bản lề, và miền CH3, hoặc chuỗi polypeptit chứa miền CH1, ít nhất một phần của miền bản lề, miền CH2, và miền CH3. Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế chứa chuỗi polypeptit chứa miền CH3. Hơn thế nữa, polypeptit liên kết để sử dụng trong sáng chế có thể thiếu ít nhất một phần của miền CH2 (ví dụ, tất cả hoặc một phần của miền CH2). Như nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng các miền này (ví dụ, các phần chuỗi nặng) có thể được cải biến sao cho chúng thay đổi về trình tự axit amin từ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên.

Trong các kháng thể nhất định, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng được bộc lộ trong bản mô tả này, các phần chuỗi nặng của một chuỗi polypeptit của multime là tương đồng với phần chuỗi nặng trên chuỗi polypeptit thứ hai của multime này. Theo cách khác, các monome chứa phần chuỗi nặng theo sáng chế là không tương đồng. Ví dụ, mỗi monome có thể chứa một vị trí liên kết đích khác biệt, tạo ra, ví dụ, kháng thể đặc hiệu hay kháng thể kép.

Theo một phương án khác, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng được bộc lộ trong bản mô tả này cấu thành bởi chuỗi polypeptit đơn như scFv và sẽ được biểu hiện trong nội bào (kháng thể nội bào) dùng để điều trị và chẩn đoán bệnh *in vivo* tiềm năng.

Các phần chuỗi nặng của polypeptit liên kết để dùng trong phương pháp chẩn đoán và phương pháp điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này có thể thu được từ

các phân tử globulin miễn dịch khác nhau. Ví dụ, phần chuỗi nặng của polypeptit có thể chứa miền CH1 thu được từ phân tử IgG1 và vùng bản lề thu được từ phân tử IgG3. Trong một ví dụ khác, phần chuỗi nặng có thể chứa vùng bản lề thu được một phần một phần, từ phân tử IgG1 và, một phần, từ phân tử IgG3. Trong một ví dụ khác, phần chuỗi nặng có thể chứa bản lề thể khảm thu được một phần, từ phân tử IgG1 và, một phần, từ phân tử IgG4.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần chuỗi nhẹ" bao gồm các trình tự axit amin thu được từ chuỗi nhẹ globulin miễn dịch. Theo một phương án, phần chuỗi nhẹ chứa ít nhất một trong số miền V_L hoặc miền CL.

Kích thước tối thiểu của epitop peptit hoặc epitop polypeptit của kháng thể được cho là bốn đến năm axit amin. Epitop peptit hoặc epitop polypeptit có thể chứa ít nhất bảy, ít nhất chín hoặc ít nhất 15 đến 30 axit amin. Vì CDR có thể nhận biết peptit kháng thể hoặc polypeptit của kháng thể theo dạng bậc ba của nó, các axit amin chứa epitop không nhất thiết phải là liền kề, và trong một số trường hợp, thậm chí có thể không ở trên cùng một chuỗi peptit. Theo sáng chế, epitop peptit hoặc epitop polypeptit được nhận biết bởi các kháng thể theo sáng chế chứa trình tự gồm ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, ít nhất 8, ít nhất 9, ít nhất 10, ít nhất 15, ít nhất 20, ít nhất 25, hoặc 5 đến 30, 10 đến 30 hoặc 15 đến 30 axit amin liền kề hoặc axit amin không liền kề của tau.

Cụm "liên kết đặc hiệu", hoặc "nhận biết đặc hiệu", được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, nói chung có nghĩa là phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể liên kết với epitop thông qua miền liên kết với kháng nguyên của nó, và có nghĩa là sự liên kết này tạo ra tính bổ trợ giữa miền liên kết với kháng nguyên và epitop. Theo định nghĩa này, kháng thể được cho là "liên kết đặc hiệu" với epitop khi nó liên kết với epitop đó, thông qua miền liên kết với kháng nguyên của nó một cách dễ dàng mà không phải là nó liên kết với epitop ngẫu nhiên không liên quan. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng kháng thể có thể liên kết đặc hiệu với, hoặc nhận biết đặc hiệu polypeptit phân lập được chứa, hoặc chứa, các gốc axit amin tương ứng với kiểu tuyến tính của epitop không liền kề. Thuật ngữ "tính đặc hiệu" được sử dụng trong bản mô tả này để định tính ái lực tương đối mà nhờ đó, một kháng thể nhất định liên kết với epitop nhất định. Ví dụ, kháng thể "A" có thể được xem là có tính đặc hiệu cao hơn với một epitop nhất định so với kháng thể "B," hoặc kháng thể

"A" có thể được cho là liên kết với epitop "C" với tính đặc hiệu cao hơn so với mức nó có đối với epitop "D" có liên quan.

Nếu có mặt, thuật ngữ "các đặc tính liên kết miễn dịch", hoặc các đặc tính liên kết khác của kháng thể với kháng nguyên, theo tất cả các dạng ngữ pháp của nó, được dùng để chỉ tính đặc hiệu, ái lực, tính phản ứng chéo, và các đặc tính liên kết khác của kháng thể.

Thuật ngữ "ưu tiên liên kết", có nghĩa là phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop một cách dễ dàng mà không phải là nó liên kết với epitop có liên quan, giống với, tương đồng với, hoặc tương tự. Vì vậy, kháng thể mà "ưu tiên liên kết" với một epitop nhất định thì chắc chắn hơn là sẽ liên kết với epitop đó so với một epitop có liên quan, ngay cả khi kháng thể như vậy có thể phản ứng chéo với epitop có liên quan này.

Để làm ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế, phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể có thể được xem là ưu tiên liên kết với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất này với hằng số phân rã (K_D) mà nhỏ hơn K_D của kháng thể này đối với epitop thứ hai. Trong một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế khác, kháng thể có thể được xem là ưu tiên liên kết với kháng nguyên thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực mà ít nhất nhỏ hơn một bậc độ lớn so với K_D của kháng thể này đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế khác, kháng thể có thể được xem là ưu tiên liên kết với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực mà ít nhất nhỏ hơn hai bậc độ lớn so với K_D của kháng thể này đối với epitop thứ hai.

Theo một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế khác, phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể có thể được xem là ưu tiên liên kết với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với tỷ lệ phân ly (k(off)) mà nhỏ hơn k(off) của kháng thể này đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế khác, kháng thể có thể được xem là ưu tiên liên kết với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực mà ít nhất nhỏ hơn một bậc độ lớn so với k(off) của kháng thể này đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế khác, kháng thể có thể được xem là ưu tiên liên kết với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với ái lực mà ít nhất nhỏ hơn hai bậc độ lớn so với k(off) của kháng thể này đối với epitop thứ hai.

Phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được cho là liên kết với tau hoặc đoạn hoặc biến thể của nó với tỷ lệ phân ly (k(off)) là nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-2} giây^{-1} (0,05/giây), 10^{-2} giây^{-1}, 5×10^{-3} giây^{-1} hoặc 10^{-3} giây^{-1}. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được cho là liên kết với tau hoặc đoạn hoặc biến thể của nó bằng tỷ lệ phân ly (k(off)) nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-4} giây^{-1}, 10^{-4} giây^{-1}, 5×10^{-5} giây^{-1}, hoặc 10^{-5} giây^{-1}, 5×10^{-6} giây^{-1}, 10^{-6} giây^{-1}, 5×10^{-7} giây^{-1} hoặc 10^{-7} giây^{-1}.

Phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được cho là liên kết với tau hoặc đoạn hoặc biến thể của nó với tỷ lệ kết hợp (k(on)) là lớn hơn hoặc bằng 10^3 M^{-1} giây^{-1}, 5×10^3 M^{-1} giây^{-1}, 10^4 M^{-1} giây^{-1} hoặc 5×10^4 M^{-1} giây^{-1}. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được cho là liên kết với tau hoặc đoạn hoặc biến thể của nó với tỷ lệ kết hợp (k(on)) lớn hơn hoặc bằng 10^5 M^{-1} giây^{-1}, 5×10^5 M^{-1} giây^{-1}, 10^6 M^{-1} giây^{-1}, 5×10^6 M^{-1} giây^{-1} hoặc 10^7 M^{-1} giây^{-1}.

Phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể được cho là ức chế một cách cạnh tranh sự liên kết của kháng thể tham chiếu với một epitop nhất định nếu nó ưu tiên liên kết với epitop đó đến mức độ mà nó ngăn chặn, đến một mức độ nào đó, sự liên kết của kháng thể tham chiếu với epitop này. Có thể xác định sự ức chế cạnh tranh theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, thử nghiệm ELISA cạnh tranh. Kháng thể có thể được cho là ức chế một cách cạnh tranh sự liên kết của kháng thể tham chiếu với một epitop nhất định ít nhất là 90%, ít nhất 80%, ít nhất 70%, ít nhất 60%, hoặc ít nhất 50%. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng sự liên kết của kháng thể với epitop của nó cũng có thể được ức chế một cách cạnh tranh bằng phân tử liên kết mà không phải là kháng thể. Ví dụ, sự liên kết đặc hiệu của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này với tau, ví dụ, hTau40, có thể được ức chế một cách cạnh tranh bằng vi cấu trúc hình ống.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ái lực" chỉ số đo độ bền của mức độ liên kết của epitop riêng biệt với CDR của phân tử liên kết, ví dụ, phân tử globulin miễn dịch; ví dụ, xem tài liệu: Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., (1988) pp. 27-28. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ái lực" chỉ tổng độ ổn định của phức hợp giữa quần thể của các globulin miễn dịch và kháng nguyên, tức là độ bền kết hợp chức năng

của hỗn hợp globulin miễn dịch với kháng nguyên; ví dụ, xem tài liệu của: Harlow pp. 29-34. Ái lực liên quan đến cả ái lực của các phân tử globulin miễn dịch riêng biệt trong quần thể này với các epitop đặc hiệu, và còn liên quan đến các hóa trị của các globulin miễn dịch và kháng nguyên. Ví dụ, sự tương tác giữa kháng thể hóa trị hai đơn dòng và kháng nguyên với cấu trúc epitop lặp lại ở mức độ cao, như polyme, sẽ là tương tác có ái lực cao. Ái lực hoặc ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên có thể xác định được bằng thử nghiệm có áp dụng phương pháp thích hợp bất kỳ; ví dụ, xem tài liệu: Berzofsky *et al.*, "*Antibody-Antigen Interactions*" trong *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, *Janis Immunology*, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), và các phương pháp được mô tả trong đó. Các kỹ thuật chung dùng để đo ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên bao gồm ELISA, RIA, và phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt. Ái lực đo được của một tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể có thể thay đổi nếu đo được trong các điều kiện khác nhau, ví dụ, nồng độ muối, độ pH. Vì vậy, tốt hơn nếu các số đo của ái lực và các thông số liên kết với kháng nguyên khác, ví dụ, K_D, IC_{50}, được tạo ra bằng các dung dịch được chuẩn hóa chứa kháng thể và kháng nguyên, và dung dịch đệm được chuẩn hóa.

Các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế cũng có thể được mô tả hoặc được chỉ ra theo tính phản ứng chéo của chúng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tính phản ứng chéo" chỉ khả năng của kháng thể, đặc hiệu với một kháng nguyên, trong phản ứng với kháng nguyên thứ hai; số đo về tính liên quan giữa hai kháng nguyên khác nhau. Vì vậy, kháng thể có tính phản ứng chéo nếu nó liên kết với epitop không phải là epitop mà đã kích thích sự tạo ra nó. Epitop có tính phản ứng chéo nói chung chứa nhiều đặc điểm trong số các đặc điểm cấu trúc bổ trợ tương tự với epitop kích thích, và trong một số trường hợp, thực sự có thể khớp tốt hơn so với epitop gốc.

Ví dụ, các kháng thể nhất định có mức độ phản ứng chéo nào đó, vì chúng liên kết các epitop có liên quan, nhưng không giống hệt, ví dụ, các epitop có mực độ tương đồng ít nhất 95%, ít nhất 90%, ít nhất 85%, ít nhất 80%, ít nhất 75%, ít nhất 70%, ít nhất 65%, ít nhất 60%, ít nhất 55%, và ít nhất 50% (như tính được bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong bản mô tả này) với

epitop tham chiếu. Kháng thể có thể được cho là có ít hoặc không có tính phản ứng chéo nếu nó không liên kết với các epitop có mức độ tương đồng nhỏ hơn 95%, nhỏ hơn 90%, nhỏ hơn 85%, nhỏ hơn 80%, nhỏ hơn 75%, nhỏ hơn 70%, nhỏ hơn 65%, nhỏ hơn 60%, nhỏ hơn 55%, và nhỏ hơn 50% (như tính được bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong bản mô tả này) với epitop tham chiếu. Kháng thể có thể được xem là "đặc hiệu ở mức cao" đối với epitop nhất định, nếu nó không liên kết với thể tương tự, thể tương đồng khác loài, hoặc thể tương đồng bất kỳ khác của epitop đó.

Các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế cũng có thể được mô tả hoặc được chỉ ra về mặt ái lực liên kết của chúng với tau. Theo một phương án, ái lực liên kết bao gồm các ái lực có hằng số phân rã hay Kd nhỏ hơn 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, hoặc 10^{-15} M.

Như nêu trên, các cấu trúc siêu phân tử và cấu hình riêng không gian ba chiều của các vùng hằng định của các nhóm globulin miễn dịch khác nhau là đã biết rõ. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miền V_H" chứa miền biến đổi có đầu tận cùng amin của chuỗi nặng của globulin miễn dịch và thuật ngữ "miền CH1" bao gồm miền của vùng hằng định thứ nhất (có phần lớn đầu tận cùng amin) của chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Miền CH1 liền kề với miền V_H và là đầu tận cùng amin đối với vùng bản lề của chuỗi nặng của phân tử globulin miễn dịch.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miền CH2" bao gồm phần của phân tử chuỗi nặng mà kéo dài, ví dụ, từ gốc 244 đến gốc 360 của kháng thể bằng cách sử dụng các sơ đồ đánh số thông thường (gốc 244 đến 360, hệ đánh số Kabat; và các gốc 231 đến 340, hệ đánh số EU; xem tài liệu của Kabat EA và các đồng tác giả nêu trên). Miền CH2 là duy nhất vì nó không ghép cặp chặt chẽ với miền khác. Hơn thế, hai chuỗi hydratcacbon phân nhánh được liên kết với N được đặt xen giữa hai miền CH2 của phân tử IgG nguyên thể nguyên vẹn. Cũng đã có thông tin rõ rằng miền CH3 kéo dài từ miền CH2 đến đầu tận cùng C của phân tử IgG và chứa khoảng 108 gốc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng bản lề" bao gồm phần của phân tử chuỗi nặng mà nối miền CH1 với miền CH2. Vùng bản lề này có khoảng 25 gốc và linh hoạt, vì thế mà, cho phép hai vùng liên kết với kháng nguyên có đầu tận cùng N di chuyển một cách độc lập. Vùng bản lề có thể được chia nhỏ thành ba miền riêng biệt: miền bản lề trên, miền bản lề giữa và miền bản lề dưới; xem tài liệu: Roux *et al.*, *J. Immunol.* 161 (1998), 4083.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "liên kết với đisulfua" bao gồm liên kết cộng hóa trị được tạo ra giữa hai nguyên tử lưu huỳnh. Axit amin xystein chứa nhóm thiol mà có thể tạo cầu đisulfua hoặc liên kết với đisulfua với nhóm thiol thứ hai. Trong hầu hết các phân tử IgG có trong tự nhiên, các vùng CH1 và CL được liên kết bằng một liên kết đisulfua và hai chuỗi nặng được liên kết bằng hai liên kết đisulfua ở các vị trí tương ứng với 239 và 242 bằng cách sử dụng hệ đánh số Kabat (vị trí 226 hoặc 229, hệ đánh số EU).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "được liên kết", "được dung hợp" hoặc "sự dung hợp" được sử dụng thay thế cho nhau. Các thuật ngữ này biểu thị sự nối với nhau của hai hoặc nhiều phần tử hoặc thành phần, với phương tiện bất kỳ kể cả phương tiện tiếp hợp hóa học hoặc phương tiện tái tổ hợp. "Dung hợp trong khung" biểu thị sự nối của hai hoặc nhiều khung đọc thải trừ polynucleotit (Open Reading Frame - ORF) để tạo ORF liên tục dài hơn, theo cách mà duy trì được khung đọc dịch mã chính xác của ORF gốc. Vì vậy, protein dung hợp tái tổ hợp là protein duy nhất chứa hai hoặc nhiều đoạn mà tương ứng với các polypeptit được mã hóa bởi ORF gốc (về bản chất, các đoạn này không nối một cách bình thường như vậy). Mặc dù khung đọc được tạo ra liên tục như vậy khắp các đoạn được dung hợp, các đoạn có thể được tách về mặt vật lý hoặc về mặt không gian bằng, ví dụ, trình tự liên kết trong khung. Ví dụ, các polynucleotit mã hóa các CDR của vùng biến đổi của globulin miễn dịch có thể được dung hợp, trong khung, nhưng được tách bằng polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng khung globulin miễn dịch hoặc các vùng CDR bổ sung, miễn là các CDR "được dung hợp" được cùng dịch mã như là một phần của polypeptit liên tục.

Thuật ngữ "biểu hiện" như được sử dụng trong bản mô tả này để biểu thị quá trình mà nhờ đó gen tạo ra một chất hóa sinh, ví dụ, ARN hoặc polypeptit. Quy trình này bao gồm sự biểu hiện bất kỳ của sự có mặt của gen chức năng trong tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp làm bất hoạt gen cũng như cả phương

pháp biểu hiện nhất thời và phương pháp biểu hiện ổn định. Quá trình này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quá trình phiên mã gen thành ARN thông tin (messenger RNA - mRNA), ARN vận chuyển (transfer RNA-tRNA), ARN kẹp tóc nhỏ (small hairpin RNA - shRNA), ARN can thiệp kích thước nhỏ (small interfering RNA - siRNA) hoặc sản phẩm ARN bất kỳ khác, và quá trình dịch mã ARN thông tin này thành (các) polypeptit. Nếu sản phẩm mong muốn cuối cùng là chất hóa sinh, sự biểu hiện bao gồm việc tạo ra chất hóa sinh đó và các tiền chất bất kỳ. Sự biểu hiện của gen tạo ra "sản phẩm gen". Như được sử dụng trong bản mô tả này, sản phẩm gen có thể là axit nucleic, ví dụ, ARN thông tin được tạo ra bằng quá trình phiên mã gen, hoặc polypeptit mà được dịch mã từ sản phẩm phiên mã. Các sản phẩm gen được mô tả trong bản mô tả này còn bao gồm các axit nucleic có các cải biến sau phiên mã, ví dụ, sự polyađenyl hóa, hoặc các polypeptit có các cải biến sau dịch mã, ví dụ, sự metyl hóa, glycosyl hóa, bổ sung lipit, liên quan đến các cấu trúc siêu phân tử protein khác, phân cắt bằng cách phân giải protein và các phương pháp tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mẫu" chỉ chất sinh học bất kỳ thu được từ đối tượng hoặc bệnh nhân. Theo một khía cạnh, mẫu có thể là máu, dịch não-tủy ("cerebrospinal fluid - CSF"), hoặc nước tiểu. Theo các khía cạnh khác, mẫu có thể là máu toàn phần, huyết tương, các tế bào B được làm giàu từ các mẫu máu, và các tế bào được nuôi cấy (ví dụ, các tế bào B từ đối tượng). Mẫu có thể còn bao gồm mẫu sinh thiết hoặc mẫu mô kể cả mô dây thần kinh. Theo các khía cạnh khác nữa, mẫu có thể là các tế bào nguyên vẹn và/hoặc sản phẩm phân giải các tế bào này. Có thể thu gom các mẫu máu bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Theo một khía cạnh, phần kết viên có thể được tạo huyền phù lại bằng cách trộn xoáy ở 4°C trong 200µl dung dịch đệm (Tris 20mM, độ pH = 7,5, 0,5% Nonidet, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0,1M NaCl, chất ức chế proteaza Sigma IX, và chất ức chế phosphataza Sigma IX 1 và 2). Huyền phù này có thể được giữ trên nước đá trong 20 phút trong khi vẫn trộn xoáy ngắt quãng. Sau khi quay ở tốc độ 15.000 x g (150.000m/g^2) trong thời gian 5 phút ở 4°C, các phần phân ước của dịch nổi trên bề mặt có thể được bảo quản ở -70°C.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" chỉ cả biện pháp điều trị bệnh và điều trị phòng bệnh hay điều trị dự phòng, trong đó mục đích là phòng hoặc làm chậm (làm giảm) rối loạn hoặc sự thay đổi sinh lý

không mong muốn, như sự phát triển của hội chứng Parkinson. Các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc làm giảm các triệu chứng, việc làm giảm mức độ của bệnh, tình trạng được làm ổn định (tức là, không nặng thêm) của bệnh, tình trạng trì hoãn hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh, làm giảm hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và sự thuyên giảm (dù là một phần hay toàn bộ), dù là có thể phát hiện được hay không thể phát hiện được. "Việc điều trị" còn có thể có nghĩa là kéo dài thời gian sống so với thời gian sống được dự định nếu không được điều trị. Các đối tượng cần đến việc điều trị bao gồm người đã có tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn cũng như người dễ mắc tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn hoặc người mà dấu hiệu biểu hiện của tình trạng bệnh hoặc rối loạn ở họ cần được phòng.

Thuật ngữ "đối tượng" hoặc "cá thể" hoặc "động vật" hoặc "bệnh nhân" hoặc "động vật có vú" nghĩa là đối tượng bất kỳ, cụ thể đối tượng là động vật có vú, ví dụ, người bệnh, mà phương pháp chẩn đoán, tiên lượng, phòng, hoặc liệu pháp là cần thiết đối với họ.

II. Kháng thể

Nhìn chung, sáng chế liên quan đến các kháng thể kháng tau của người và các đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế thể hiện các đặc tính liên kết miễn dịch học và/hoặc các tính chất sinh học như được tóm lược đối với các kháng thể được minh họa trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Theo sáng chế, các kháng thể đơn dòng của người đặc hiệu với tau thì được tách dòng từ nhóm đối tượng là người khỏe mạnh.

Trong tiến trình của các thử nghiệm được thực hiện theo sáng chế các nỗ lực ban đầu bị thất bại, không tách dòng được các kháng thể tau đặc hiệu nhưng hầu như luôn luôn tạo ra các dòng dương tính giả. Để ngăn chặn vấn đề này, các kháng thể trong môi trường có điều kiện nuôi cấy trước của sản phẩm nuôi cấy tế bào B nhớ của người được sàng lọc song song về khả năng liên kết với protein tau tái tổ hợp, PHFTau chiết được từ não của người mắc bệnh AD, chiết phẩm của não từ đối chứng khỏe mạnh và anbumin huyết thanh bò (BSA). Chỉ các môi trường nuôi cấy tế bào B mà dương tính đối với tau tái tổ hợp và/hoặc PHFTau nhưng không phải là chiết phẩm từ não của đối chứng hoặc BSA được đưa vào quy trình tách dòng của kháng thể.

Các nỗ lực ban đầu nhằm phân lập các kháng thể đặc hiệu được tập trung vào nhóm đối tượng là người khỏe mạnh có hoạt tính liên kết huyết tương cao với tau, chứng tỏ lượng lớn huyết tương kháng thể tau lưu thông. Điều bất ngờ là, các nỗ lực này đã không tạo ra được các tế bào B nhớ của người đặc hiệu với tau và các kháng thể được mô tả trong sáng chế phân lập được từ nhóm đối tượng là người khỏe mạnh mà không được chọn trước về tính phản ứng huyết tương cao với tau hoặc có tính phản ứng huyết tương thấp với tau.

Nhờ biện pháp này, có thể phân lập được một vài kháng thể. Các kháng thể đã được chọn được phân tích thêm để xác định nhóm và phân nhóm chuỗi nhẹ. Các thông tin từ kháng thể thích hợp đã được chọn từ sản phẩm nuôi cấy tế bào B nhớ sau đó, được phiên mã bằng RT-PCR, được tách dòng và được kết hợp vào các vectơ biểu hiện dùng để tạo ra tái tổ hợp; xem phần Ví dụ thực hiện sáng chế kèm theo. Sự biểu hiện tái tổ hợp của các kháng thể của người trong tế bào HEK293 hoặc tế bào CHO và việc xác định đặc điểm tiếp theo đối với tính đặc hiệu liên kết của chúng với tau có chiều dài đầy đủ, các dạng được cải biến do nguyên nhân bệnh lý của chúng ở phương pháp thấm tách Tây và khả năng liên kết riêng biệt của chúng với tau được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý đã xác nhận rằng lần đầu tiên, các kháng thể của người đã được tách dòng mà đặc hiệu ở mức cao đối với tau và nhận biết riêng biệt các dạng được cải biến do nguyên nhân bệnh lý của protein tau.

Vì vậy, nhìn chung, sáng chế liên quan đến kháng thể kháng tau đơn dòng của người có trong tự nhiên phân lập được và các đoạn liên kết, chất dẫn xuất và biến thể của nó. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với tau có chiều dài đầy đủ tái tổ hợp và/hoặc dạng được kết tụ và/hoặc được phosphoryl hóa do nguyên nhân bệnh lý (PHFTau) phân lập được từ não của người mắc bệnh AD trong các điều kiện làm biến tính trong phương pháp thấm tách Western.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng tau, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc các chất dẫn xuất của chúng, trong đó kháng thể liên kết đặc hiệu với cùng một epitop của tau với kháng thể tham chiếu được chọn từ nhóm bao gồm NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6 hoặc NI-105.9C4.

Các kháng thể kháng tau của người bổ sung được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2012/0087861, nội dung của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Theo một phương án, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này liên kết đặc hiệu với tau trên epitop chứa các gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: các gốc tương ứng với các gốc 125 đến 131, 397 đến 441, 226 đến 244, 217 đến 227, 37 đến 55, 387 đến 406, 421 đến 427, 427 đến 439, 1 đến 158, 197 đến 207, 57 đến 67, 355 đến 441, 313 đến 319, 309 đến 319, và 221 đến 231 của hTau40 (SEQ ID NO: 6). Theo một phương án khác nữa, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này liên kết đặc hiệu với tau trên epitop chứa các gốc axit amin tương ứng với các gốc 37 đến 55 và 387 đến 406 của hTau40 (SEQ ID NO: 6). Theo một phương án nhất định, tau là hTau40 (SEQ ID NO: 6).

Theo một phương án, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này liên kết với tau trên epitop chứa miền liên kết của vi cấu trúc hình ống của tau. Theo một phương án nhất định, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này liên kết với tau trên epitop chứa các gốc axit amin từ vùng R4 của tau như được thể hiện trên hình 4. Theo một phương án, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này cạnh tranh với vi cấu trúc hình ống để liên kết đặc hiệu với tau. Theo một phương án khác, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có ái lực liên kết giảm với tau liên quan đến vi cấu trúc hình ống so với ái lực liên kết của các kháng thể này với tau không liên quan đến vi cấu trúc hình ống. Theo một phương án khác nữa, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này không liên kết, hoặc hầu như không liên kết với tau liên quan đến vi cấu trúc hình ống. Theo các phương án nhất định, protein tau có thể là protein tau nguyên thể hoặc protein tau tái tổ hợp. Theo một phương án nhất định, tau là hTau40.

Theo một phương án, kháng thể kháng tau của người theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với tau được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý và hầu như không liên kết với tau ở dạng sinh lý trên mô não. Hơn thế nữa, kháng thể kháng tau của người theo sáng chế có thể được xác định đặc điểm thêm bằng khả năng của nó trong việc nhận biết tau ở giai đoạn tiền rối, trong đám rối sợi thần kinh (NFT), sợi mạng lưới thần kinh và/hoặc các sợi thần kinh loạn dưỡng trong não. Vì vậy, sáng chế đề xuất một tập hợp gồm các kháng thể tau của người có tính đặc hiệu liên kết, vì vậy các kháng thể này là đặc biệt hữu ích cho mục đích chẩn đoán và mục đích điều trị.

Ngoài ra, hoặc theo cách khác, kháng thể kháng tau theo sáng chế ưu tiên nhận biết tau được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý mà không phải là các dạng sinh lý, cụ thể là, khi được phân tích theo ví dụ 4 và ví dụ 18. Hơn thế nữa, hoặc theo cách khác, kháng thể kháng tau theo sáng chế liên kết với các thể đột biến tau gây ra bệnh của người, cụ thể là, các loại được mô tả trong ví dụ 4. Về vấn đề này, tính đặc hiệu liên kết có thể nằm trong khoảng có nồng độ hữu hiệu một nửa mức tối đa (EC50) nằm trong khoảng từ 100pM đến 100nM, hoặc EC50 nằm trong khoảng từ 100pM đến 10nM đối với tau kiểu dại.

Vì vậy, kháng thể kháng tau theo sáng chế ưu tiên liên kết với các dạng được cải biến gây ra bệnh bởi tau trong não, ví dụ, các khối kết tụ gây ra bệnh bởi tau như được minh họa bằng sự nhuộm hóa mô miễn dịch được mô tả trong ví dụ 4 và ví dụ 18. Theo một phương án khác, kháng thể kháng tau theo sáng chế ưu tiên liên kết với cả tau tái tổ hợp và các dạng được cải biến do nguyên nhân bệnh lý bởi tau như được minh họa trong ví dụ 2 bằng phương pháp thẩm tách Western.

Sáng chế còn liên quan đến kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc các chất dẫn xuất của nó, trong đó kháng thể này chứa miền liên kết với kháng nguyên tương đồng với miền liên kết với kháng nguyên của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm NI-105.17C1, NI-105.17C1(N31Q), NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, và NI-105.9C4.

Sáng chế còn minh họa bằng ví dụ một vài phân tử liên kết như vậy, ví dụ, các kháng thể và các đoạn liên kết của chúng, các phần tử này có thể được xác định đặc điểm bằng cách chứa trong vùng biến đổi của chúng, ví dụ, miền liên kết ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của vùng biến đổi V_H và/hoặc vùng biến đổi V_L chứa một trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được thể hiện trên hình 7. Các trình tự nucleotit tương ứng mã hóa các vùng biến đổi được nhận diện nêu trên được thể hiện trong bảng 4 dưới đây. Một nhóm làm ví dụ gồm các CDR của các trình tự của axit amin nêu trên của vùng V_H và/hoặc vùng V_L như được thể hiện trên hình 7. Tuy nhiên, như được bàn luận trong phần dưới đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ là ngoài ra hoặc theo cách khác, có thể sử dụng các CDR, các vùng này

khác biệt về trình tự axit amin của chúng với các trình tự được thể hiện trên hình 7 là một, hai, ba hoặc thậm chí là nhiều axit amin trong trường hợp CDR2 và CDR3.

Bảng 2: Các trình tự axit amin của vùng V_H, vùng V_H CDR1, vùng V_H CDR2, vùng V_H CDR2, vùng V_L, vùng V_L CDR2, vùng V_L CDR2, và vùng V_L CDR3 của các kháng thể đặc hiệu với tau.

Kháng thể		V_H/V_L	CDR1	CDR2	CDR3
NI-105.17C1	V_H	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81
	V_L	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84
NI-105.6C5	V_H	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 87
	V_L	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90
NI-105.29G10	V_H	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 93
	V_L	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 96
NI-105.6L9	V_H	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99
	V_L	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 102
NI-105.40E8	V_H	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 103	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 105
	V_L	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108
NI-105.48E5	V_H	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 111
	V_L	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 114
NI-105.6E3	V_H	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 117
	V_L	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 120
NI-105.22E1	V_H	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123
	V_L	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 126
NI-105.26B12	V_H	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 129
	V_L	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 132
NI-105.12E12	V_H	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 135
	V_L	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 138
NI-105.60E7	V_H	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 141
	V_L	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 144
NI-105.14E2	V_H	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 147
	V_L	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 150
NI-105.39E2	V_H	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 153
	V_L	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 156
NI-105.19C6	V_H	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 158	SEQ ID NO: 159
	V_L	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 162
NI-105.9C4	V_H	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 164	SEQ ID NO: 165

Kháng thể		V_H/V_L	CDR1	CDR2	CDR3
	V_L	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 166	SEQ ID NO: 167	SEQ ID NO: 168
NI-105.17C1 (N31Q)	V_H	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81
	V_L	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 224	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất một CDR gồm, hoặc cấu thành bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79 đến 168 và 224.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu CDR gồm, hoặc cấu thành bởi trình tự của axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79 đến 168 và 224.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, và VL CDR3 lần lượt chứa các trình tự của axit amin nêu trong SEQ ID NO: 79 đến 84, 85 đến 90, 91 đến 96, 97 đến 102, 103 đến 108, 109 đến 114, 115 đến 120, 121 đến 126, 127 đến 132, 133 đến 138, 139 đến 144, 145 đến 150, 151 đến 156, 157 đến 162, hoặc 163 đến 168. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, và VL CDR3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 79, 80, 81, 224, 83, và 84.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa một, hai, hoặc ba VH CDR chứa hoặc cấu thành bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79 đến 81, 85 đến 87, 91 đến 93, 97 đến 99, 103 đến 105, 109 đến 111, 115 đến 117, 121 đến 123, 127 đến 129, 133 đến 135, 139 đến 141, 145 đến 147, 151 đến 153, 157 đến 159, và 163 đến 165.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa VH CDR1, VH CDR2, và VH CDR3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 79 đến 81, 85 đến 87, 91 đến 93, 97 đến 99, 103 đến 105, 109 đến 111, 115 đến 117, 121 đến 123, 127 đến 129, 133 đến 135, 139 đến 141, 145 đến 147, 151 đến 153, 157 đến 159, hoặc 163 đến 165.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa một, hai, hoặc ba VL CDR chứa, hoặc cấu thành bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82 đến 84, 88 đến 90, 94 đến 96, 100 đến 102, 106 đến 108, 112

đến 114, 118 đến 120, 124 đến 126, 130 đến 132, 136 đến 138, 142 đến 144, 148 đến 150, 154 đến 156, 160 đến 162, 166 đến 168, và 224.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa VL CDR1, VL CDR2, và VL CDR3 lần lượt chứa các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 82 đến 84, 88 đến 90, 94 đến 96, 100 đến 102, 106 đến 108, 112 đến 114, 118 đến 120, 124 đến 126, 130 đến 132, 136 đến 138, 142 đến 144, 148 đến 150, 154 đến 156, 160 đến 162, hoặc 166 đến 168. Theo một phương án, VL CDR1, VL CDR2, và VL CDR3 lần lượt chứa các trình tự của axit amin nêu trong SEQ ID NO: 83, 84, và 224.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; hoặc VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165. Theo một phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 hoặc 224; VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; hoặc VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168. Theo một phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; hoặc VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165, và còn chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; hoặc VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:

80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165. Theo một phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168. Theo một phương án khác, kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165, và còn chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 224, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 85, VH CDR2 có trình

tự nêu trong SEQ ID NO: 86, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 87, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 88, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 89, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 90.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 91, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 92, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 93, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 94, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 95, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 96.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 97, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 98, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 99, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 100, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 101, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 102.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 103, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 104, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 105, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 106, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 107, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 108.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 109, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 110, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 111, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 112, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 113, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 114.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 115, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 116, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 117, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong

SEQ ID NO: 118, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 119, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 120.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 121, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 122, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 123, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 124, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 125, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 126.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 127, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 128, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 129, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 130, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 131, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 132.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 133, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 134, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 135, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 136, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 137, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 138.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 139, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 140, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 141, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 142, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 144.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 145, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 146, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 147, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 148, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 149, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 150.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 151, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 152, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 153, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 154, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 155, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 156.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 157, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 158, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 159, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 160, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 161, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 162.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa VH CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 163, VH CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 164, và VH CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 165, và còn có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa VL CDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 166, VL CDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 167, và VL CDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 168.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là một kháng thể bất kỳ của các kháng thể chứa trình tự axit amin của vùng V_H và/hoặc vùng V_L như được thể hiện trên hình 7 và bảng 3. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế đặc trưng bởi sự bảo toàn kiểu ghép cặp cùng nguồn gốc của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như có mặt trong tế bào B của người.

Bảng 3: Các trình tự axit amin của vùng V_H và vùng V_L của các kháng thể đặc hiệu với tau. BG (before germlining) – trước khi tách dòng

Kháng thể	Các trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)	
NI-105.17C1	BG V_H	SEQ. ID. NO:44
	V_H	SEQ. ID. NO:45
	V_L	SEQ. ID. NO:46
	N31QV_L	SEQ. ID. NO: 221

Kháng thể	Các trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)	
	N31Q, I48VV_L	SEQ. ID. NO: 222
NI-105.6C5	BG V_H	SEQ. ID. NO:47
	V_H	SEQ. ID. NO:48
	V_L	SEQ. ID. NO:49
NI-105.29G10	V_H	SEQ. ID. NO: 50
	V_L	SEQ. ID. NO: 51
NI-105.6L9	V_H	SEQ. ID. NO: 52
	V_L	SEQ. ID. NO: 53
NI-105.40E8	V_H	SEQ. ID. NO: 54
	R104W V_H	SEQ. ID. NO: 220
	V_L	SEQ. ID. NO: 55
NI-105.48E5	V_H	SEQ. ID. NO: 56
	V_L	SEQ. ID. NO: 57
NI-105.6E3	V_H	SEQ. ID. NO: 58
	V_L	SEQ. ID. NO: 59
NI-105.22E1	V_H	SEQ. ID. NO: 60
	V_L	SEQ. ID. NO: 61
NI-105.26B12	V_H	SEQ. ID. NO: 62
	BG V_L	SEQ. ID. NO: 63
	V_L	SEQ. ID. NO: 64
NI-105.12E12	V_H	SEQ. ID. NO: 65
	V_L	SEQ. ID. NO: 66
NI-105.60E7	V_H	SEQ. ID. NO: 67
	V_L	SEQ. ID. NO: 68
NI-105.14E2	V_H	SEQ. ID. NO: 69
	V_L	SEQ. ID. NO:70
NI-105.39E2	V_H	SEQ. ID. NO:71
	V_L	SEQ. ID. NO:72
NI-105.19C6	V_H	SEQ. ID. NO:73
	V_L	SEQ. ID. NO:74
NI-105.9C4	BG V_H	SEQ. ID. NO:75
	V_H	SEQ. ID. NO:76

Kháng thể	Các trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)	
	BG V_L	SEQ. ID. NO:77
	V_L	SEQ. ID. NO:78

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) gồm, hoặc chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76, và 220. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) chứa hoặc cấu thành bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221, và 222. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) chứa hoặc cấu thành bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76, và 220, và còn chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) chứa hoặc cấu thành bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221, và 222. Theo một phương án nhất định, kháng thể chứa VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 221; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 222; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 48 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 50 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 52 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 54 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 220 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 56 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 60 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 62 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 66; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ

ID NO: 67 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 69 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 70; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 71 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 72; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 73 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 74; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 76 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 62 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63; hoặc VH có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 75 và VL có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77.

Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế là kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, chất dẫn xuất hoặc biến thể của nó, phần này cạnh tranh để liên kết với tau, như, ví dụ, hTau40, với ít nhất một trong số các kháng thể có vùng V_H và/hoặc vùng V_L như được thể hiện trên hình 7 và bảng 3. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế cạnh tranh để liên kết đặc hiệu với hTau40 với NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, hoặc NI-105.9C4. Các kháng thể đó cũng có thể là kháng thể của người, cụ thể là, dùng để điều trị bệnh. Theo cách khác, kháng thể này là kháng thể của chuột, kháng thể được làm tương thích với chuột và kháng thể của thể khảm của chuột-người, kháng thể này là đặc biệt hữu ích cho các phương pháp chẩn đoán và các nghiên cứu ở động vật.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng các sản phẩm nuôi cấy của tế bào B đơn dòng hoặc tế bào B ít dòng (oligoclonal) mà được nuôi cấy và dịch nổi trên bề mặt của sản phẩm nuôi cấy, mà chứa các kháng thể được tạo ra bằng các tế bào B đã nêu được sàng lọc để phát hiện sự có mặt và ái lực của các kháng thể kháng tau trong đó. Quy trình sàng lọc bao gồm các bước của thử nghiệm khả năng phản ứng miễn dịch đối với mảng dạng tinh bột ở mô (TAPIR) nhạy cảm như được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2004/095031, nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ; sàng lọc trên các khu vực não để phát hiện khả năng liên kết với PHFTau; sàng lọc để phát hiện khả năng liên kết của peptit thu được từ tau có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 với các nhóm phosphat trên các axit

amin Ser-202 và Thr-205; trên axit amin Thr-231; và/hoặc trên các axit amin Ser-396 và Ser-404 của trình tự đã nêu; sàng lọc để phát hiện khả năng liên kết của tau tái tổ hợp của người có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 và phân lập kháng thể mà nhờ đó, khả năng liên kết được phát hiện hoặc tế bào tạo ra kháng thể này.

Như nêu trên, nhờ việc tạo ra nó khi có đáp ứng miễn dịch của người, kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế sẽ nhận biết các epitop mà có liên quan đến bệnh cụ thể và có thể không tiếp cận được hoặc có tính sinh miễn dịch kém hơn trong trường hợp các quá trình gây miễn dịch, ví dụ, để tạo ra các kháng thể đơn dòng của chuột và sàng lọc *in vitro* thư viện biểu hiện thể thực khuẩn. Do vậy, thật là thận trọng khi quy định rằng epitop của kháng thể kháng tau của người theo sáng chế là duy nhất và không tồn tại một kháng thể nào khác mà có khả năng liên kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế. Do đó, nhìn chung, sáng chế còn mở rộng sang cả các kháng thể kháng tau và các phân tử liên kết với tau mà cạnh tranh với kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế để liên kết đặc hiệu với tau. Cụ thể hơn, sáng chế liên quan đến kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc các chất dẫn xuất của nó, trong đó kháng thể liên kết đặc hiệu với cùng một epitop của tau với kháng thể tham chiếu được chọn từ nhóm bao gồm NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, và NI-105.9C4.

Cạnh tranh giữa các kháng thể xác định được theo thử nghiệm mà trong đó globulin miễn dịch đang được thử nghiệm ức chế đặc hiệu sự liên kết của kháng thể tham chiếu với một kháng nguyên chung, như tau. Nhiều loại thử nghiệm liên kết cạnh tranh khác nhau thì đã biết, ví dụ: thử nghiệm miễn dịch bằng phóng xạ (RIA) pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp, thử nghiệm miễn dịch bằng enzym (EIA) pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp, thử nghiệm cạnh tranh kẹp giữa hai kháng thể; xem tài liệu: Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA biotin-avidin pha rắn trực tiếp; xem tài liệu: Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 và Cheung *et al.*, *Virology* 176 (1990), 546-552; thử nghiệm được đánh dấu pha rắn trực tiếp, thử nghiệm kẹp giữa hai kháng thể được đánh dấu pha rắn trực tiếp; xem tài liệu: Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA có chất đánh dấu pha rắn trực tiếp bằng cách sử dụng chất đánh dấu I^{125}; xem tài liệu:

Morel *et al.*, *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 và Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Thông thường, thử nghiệm như vậy bao gồm việc sử dụng tau đã được tinh chế hoặc các khối kết tụ của nó đã liên kết với bề mặt rắn hoặc các tế bào mang một trong số các thành phần này, globulin miễn dịch thử nghiệm không được đánh dấu và globulin miễn dịch tham chiếu được đánh dấu, tức là kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế. Mức độ ức chế cạnh tranh được đo bằng cách xác định lượng chất đánh dấu liên kết với bề mặt rắn hoặc các tế bào với sự có mặt của globulin miễn dịch thử nghiệm. Thông thường, globulin miễn dịch thử nghiệm có mặt nhiều quá mức. Theo một phương án, thử nghiệm liên kết cạnh tranh được thực hiện trong các điều kiện như được mô tả đối với thử nghiệm ELISA trong phần các Ví dụ kèm theo. Các kháng thể được nhận diện bằng thử nghiệm cạnh tranh (các kháng thể cạnh tranh) bao gồm các kháng thể liên kết với cùng một epitop với kháng thể tham chiếu và các kháng thể liên kết với epitop liền kề đủ gần với epitop được liên kết bởi kháng thể tham chiếu để cho sự cản trở không gian xảy ra. Thông thường, nếu kháng thể cạnh tranh có mặt nhiều quá mức, nó sẽ ức chế đặc hiệu sự liên kết của kháng thể tham chiếu với một kháng nguyên chung với mức ít nhất là 50% hoặc 75%. Vì vậy, sáng chế còn liên quan đến kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc các chất dẫn xuất của nó, trong đó kháng thể này ức chế một cách cạnh tranh kháng thể tham chiếu được chọn từ nhóm bao gồm NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, hoặc NI-105.9C4 để không liên kết với tau.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, hầu như chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch, trong đó ít nhất một trong số các V_H-CDR của vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc ít nhất hai trong số các V_H-CDR của vùng biến đổi của chuỗi nặng có mức độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nặng tham chiếu V_H-CDR1, V_H-CDR2 hoặc V_H-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo cách khác, vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 của V_H có mức độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nặng tham chiếu V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Vì

vậy, theo phương án này, vùng biến đổi của chuỗi nặng theo sáng chế có các trình tự polypeptit V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 liên quan đến các nhóm được thể hiện trên hình 7. Trong khi hình 7 thể hiện V_H-CDR xác định được bằng hệ Kabat, các định nghĩa khác về CDR, ví dụ, V_H-CDR xác định được bằng hệ Chothia, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, và có thể được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận diện một cách dễ dàng bằng cách sử dụng dữ liệu được thể hiện trên hình 7. Theo một phương án, trình tự axit amin của VH CDR1 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; trình tự axit amin của VH CDR2 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; và trình tự axit amin của VH CDR3 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch mà trong đó các vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 được thể hiện trên hình 7. Theo một phương án, trình tự axit amin của VH CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; trình tự axit amin của VH CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; và trình tự axit amin của VH CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch mà trong đó các vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 được thể hiện trên hình 7, trừ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, hoặc mười đoạn thay thế axit amin trong một V_H-CDR bất kỳ. Theo các phương án nhất định, các đoạn thay thế axit amin là theo kiểu bảo toàn. Theo một phương án, trình tự axit amin của VH CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; trình tự axit amin của VH CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc

164; và trình tự axit amin của VH CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch, trong đó ít nhất một trong số các V_L-CDR của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc ít nhất hai trong số các V_L-CDR của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có mức độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ tham chiếu V_L-CDR1, V_L-CDR2 hoặc V_L-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo cách khác, các V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 của V_L có mức độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ tham chiếu V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Vì vậy, theo phương án này, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của sáng chế có các trình tự polypeptit V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 liên quan đến các polypeptit được thể hiện trên hình 7. Trong khi hình 7 thể hiện V_L-CDR xác định được bằng hệ Kabat, các định nghĩa khác về CDR, ví dụ, V_L-CDR xác định được bằng hệ Chothia, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo một phương án, trình tự axit amin của VL CDR1 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; trình tự axit amin của VL CDR2 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và trình tự axit amin của VL CDR3 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch mà trong đó các vùng V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 được thể hiện trên hình 7. Theo một phương án, trình tự axit amin của VL CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; trình tự axit amin của VL CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và trình tự axit amin của VL CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch mà trong đó các vùng V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 được thể hiện trên hình 7, trừ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, hoặc mười đoạn thay thế axit amin trong một V_L-CDR bất kỳ. Theo các phương án nhất định, các đoạn thay thế axit amin là theo kiểu bảo toàn. Theo một phương án, trình tự axit amin của VL CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; trình tự axit amin của VL CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và trình tự axit amin của VL CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch mà tương đồng với vùng biến đổi của chuỗi nặng tham chiếu được thể hiện trên hình 7 và bảng 3. Theo một phương án, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng tham chiếu chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76, hoặc 220.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch có trình tự polypeptit mà tương đồng với trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng tham chiếu (V_H) được thể hiện trên hình 7 và bảng 3, trừ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, hoặc mười đoạn thay thế axit amin. Theo các phương án nhất định, các đoạn thay thế axit amin là theo kiểu bảo toàn. Theo một phương án, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng tham chiếu của các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76, hoặc 220.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) tham chiếu từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Vì vậy, theo phương án này, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của sáng chế có trình tự polypeptit liên quan đến các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thể

hiện trên hình 7 và bảng 3. Theo một phương án, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) tham chiếu chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221, hoặc 222.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch mà tương đồng với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tham chiếu được thể hiện trên hình 7 và bảng 3. Theo một phương án, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tham chiếu chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221, hoặc 222.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch có trình tự polypeptit mà tương đồng với trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) tham chiếu được thể hiện trên hình 7 và bảng 3, trừ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, hoặc mười đoạn thay thế axit amin. Theo các phương án nhất định, các đoạn thay thế axit amin là theo kiểu bảo toàn. Theo một phương án, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tham chiếu của các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221, hoặc 222.

Globulin miễn dịch hoặc ADN bổ trợ mã hóa của nó có thể được cải biến thêm. Vì vậy, theo một phương án khác nữa, phương pháp theo sáng chế chứa một bước bất kỳ trong số (các) bước tạo ra kháng thể của thể khảm, kháng thể được làm tương thích với chuột, kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể dung hợp, kháng thể được đánh dấu hoặc chất tương tự của một loại bất kỳ trong số các loại đó. Các phương pháp tương ứng thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết và được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Harlow and Lane "*Antibodies, A Laboratory Manual*", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Nếu thu được các chất dẫn xuất của các kháng thể này theo kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn, có thể áp dụng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt như được sử dụng trong hệ BIAcore để làm tăng tính hiệu quả của các kháng thể của thể thực khuẩn mà liên kết với cùng một epitop với kháng thể thuộc một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). Việc tạo ra các kháng thể của thể khảm được mô tả, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO89/09622. Các phương

pháp tạo ra các kháng thể được làm tương thích với người thì được mô tả trong, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP-A1 0 239 400 và công bố đơn quốc tế số WO90/07861. Một nguồn khác nữa của các kháng thể để sử dụng theo sáng chế là loại gọi là các kháng thể khác loài. Nguyên tắc tổng quát của việc tạo ra các kháng thể khác loài như các kháng thể giống như kháng thể của người ở chuột được mô tả trong, ví dụ, các công bố đơn quốc tế số WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 và WO 96/33735. Như được bàn luận trên đây, kháng thể theo sáng chế có thể tồn tại trong rất nhiều dạng ngoài các kháng thể hoàn chỉnh; kể cả, ví dụ, Fv, Fab và F(ab)2, cũng như dưới dạng chuỗi đơn; ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO88/09344.

Các kháng thể theo sáng chế hoặc (các) chuỗi globulin miễn dịch tương ứng của chúng có thể được cải biến thêm bằng cách áp dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng (các) đoạn xóa bỏ, (các) đoạn chèn, (các) đoạn thay thế, (các) đoạn thêm vào, và/hoặc (các) đoạn tái tổ hợp và/hoặc (các) đoạn cải biến axit amin bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc một mình hoặc ở dạng kết hợp. Các phương pháp đưa các cải biến này vào trình tự ADN nằm dưới trình tự axit amin của chuỗi globulin miễn dịch thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ; ví dụ, xem tài liệu: Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. và Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Các phương pháp cải biến kháng thể theo sáng chế chứa việc tạo chất dẫn xuất bằng hóa chất và/hoặc tạo chất dẫn xuất bằng enzym ở một hoặc nhiều axit amin cấu tử, kể cả các cải biến chuỗi bên, các cải biến khung chính, và các cải biến đầu tận cùng N và đầu tận cùng C kể cả axetyl hóa, hyđroxyl hóa, metyl hóa, amit hóa, và gắn kết gốc hydratcacbon hoặc gốc lipit, đồng yếu tố và các phương pháp tương tự. Tương tự, sáng chế liên quan đến việc tạo ra các protein thể khảm mà chứa kháng thể được mô tả hoặc một số đoạn của nó trên đầu tận cùng amin được dung hợp với phân tử khác nguồn gốc như phối tử kích thích miễn dịch ở đầu tận cùng carboxyl; ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO00/30680 để biết các chi tiết kỹ thuật tương ứng.

Ngoài ra, sáng chế liên quan đến các peptit kể cả các loại chứa phân tử liên kết như được mô tả trên đây, ví dụ, chứa vùng CDR3 của vùng biến đổi của một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được đề cập, cụ thể là, CDR3 của chuỗi nặng vì thường xuyên quan sát thấy rằng CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) là vùng có độ biến thiên lớn hơn

và mức tham gia nổi trội vào tương tác kháng nguyên-kháng thể. Có thể dễ dàng tổng hợp hoặc tạo ra các peptit như vậy bằng các phương tiện tái tổ hợp để tạo ra tác nhân liên kết hữu ích theo sáng chế. Các phương pháp như vậy là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các peptit có thể được tổng hợp, ví dụ, bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp peptit tự động, thiết bị này có bán trên thị trường. Cũng có thể tạo ra các peptit theo các kỹ thuật tái tổ hợp bằng cách sát nhập ADN biểu hiện peptit vào vectơ biểu hiện và biến nạp các tế bào bằng vectơ biểu hiện này để tạo ra peptit.

Vì vậy, sáng chế liên quan đến phân tử liên kết bất kỳ, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết của nó mà được định hướng về phía các kháng thể kháng tau của người theo sáng chế và thể hiện các tính chất đã được đề cập, tức là kháng thể này nhận biết đặc hiệu với tau. Các kháng thể và các phân tử liên kết như vậy có thể được thử nghiệm về tính đặc hiệu liên kết và ái lực của chúng theo phương pháp ELISA và phương pháp thẩm tách Western và phương pháp hóa mô miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ, xem, phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn thế nữa, các kết quả sơ bộ của các thử nghiệm tiếp theo được thực hiện theo sáng chế còn cho thấy rằng theo một phương án, kháng thể kháng tau của người theo sáng chế liên kết trước tiên với tau được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý giống với đám rối sợi thần kinh (NFT), sợi mạng lưới thần kinh có mặt trên các khu vực não người của các bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer (AD). Vì vậy, theo một phương án được ưu tiên cụ thể của sáng chế, kháng thể của người hoặc đoạn liên kết, chất dẫn xuất hoặc biến thể của nó nhận biết tau trên các khu vực não của người mắc bệnh AD.

Là một phương án thay thế cho các globulin miễn dịch thu được một cách trực tiếp từ sản phẩm nuôi cấy của tế bào B nhớ hoặc tế bào B bất tử, các tế bào bất tử này có thể được sử dụng làm nguồn của các ổ gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được sắp xếp lại dùng để biểu hiện và/hoặc thao tác gen tiếp theo. Các gen kháng thể được sắp xếp lại có thể được phiên mã ngược từ ARN thông tin thích hợp để tạo ra ADN bổ trợ. Nếu muốn, vùng hằng định chuỗi nặng có thể được dùng để thay đổi vùng hằng định chuỗi nặng của kiểu tương đương khác biệt hoặc được loại bỏ cùng nhau. Các vùng biến đổi có thể được liên kết để mã hóa vùng Fv chuỗi đơn. Nhiều vùng Fv có thể được liên kết để tạo ra khả năng liên kết với nhiều hơn một đích hoặc các dạng kết hợp của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thể khảm có thể được sử dụng. Một khi sẵn có vật liệu di truyền,

việc thiết kế các chất tương tự như được mô tả trên đây, các chất này giữ lại cả hai khả năng của chúng để liên kết với đích mong muốn thì dễ thực hiện. Các phương pháp để tách dòng các vùng biến đổi của kháng thể và việc tạo các kháng thể tái tổ hợp thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết và được mô tả, ví dụ, Gilliland *et al.*, *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke *et al.*, *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

Một khi thu được vật liệu di truyền thích hợp, và nếu muốn, được cải biến để mã hóa chất tương tự, các trình tự mã hóa, để đưa cả các trình tự có chức năng mã hóa, ở mức tối thiểu, các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có thể được chèn vào hệ biểu hiện nằm trên các vectơ mà có thể được chuyển nhiễm vào các tế bào chủ tái tổ hợp tiêu chuẩn. Có thể sử dụng rất nhiều tế bào chủ như vậy; để xử lý hữu hiệu, tuy nhiên, có thể xem xét các tế bào của động vật có vú. Các dòng tế bào của động vật có vú làm ví dụ hữu ích đối với mục đích này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào CHO, tế bào HEK 293, hoặc tế bào NSO.

Sau đó, thực hiện việc tạo ra kháng thể hoặc chất tương đồng bằng cách nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp được cải biến này trong các điều kiện nuôi cấy thích hợp đối với sự tăng trưởng của các tế bào chủ và sự biểu hiện của các trình tự mã hóa. Sau đó, thu hồi các kháng thể này bằng cách phân lập chúng ra khỏi sản phẩm nuôi cấy. Các hệ biểu hiện được thiết kế để bao gồm các peptit tín hiệu sao cho các kháng thể thu được được tiết vào môi trường này; tuy nhiên, cũng có thể tạo ra bằng cách nội bào.

Theo các điều nêu trên, sáng chế còn liên quan đến polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc phân tử liên kết tương đương của sáng chế. Theo một phương án, polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể được mô tả trên đây. Thông thường, vùng biến đổi đã nêu được mã hóa bởi polynucleotit chứa ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (CDR) của V_H và/hoặc V_L của vùng biến đổi của kháng thể này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng nhận thấy rằng miền biến đổi của kháng thể có miền biến đổi được mô tả trên đây có thể được sử dụng để thiết kế các polypeptit hoặc các kháng thể khác có tính đặc hiệu và chức năng sinh học mong muốn. Vì vậy, sáng chế còn bao gồm các polypeptit và các kháng thể chứa ít nhất một CDR của miền biến đổi được mô tả trên đây và thuận lợi nếu hầu như có cùng một số tính tác nhân liên kết hoặc các tính tác nhân liên kết tương tự với kháng

thể được mô tả trong các ví dụ kèm theo. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rằng ái lực liên kết có thể được nâng cao bằng cách tạo các đoạn thay thế axit amin trong các CDR hoặc trong vòng siêu biến (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917) mà chồng một phần lên các CDR như được định nghĩa bởi Kabat; ví dụ, xem tài liệu: Riechmann, *el al.*, *Nature* 332 (1988), 323-327. Vì vậy, sáng chế còn liên quan đến các kháng thể, trong đó một hoặc nhiều CDR được đề xuất chứa một hoặc nhiều, hoặc không nhiều hơn hai đoạn thay thế axit amin. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa trong một hoặc cả hai trong số các chuỗi globulin miễn dịch của nó hai hoặc tất cả ba CDR của các vùng biến đổi như được thể hiện trên hình 1.

Các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế, như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, có thể chứa vùng hằng định mà tạo ra một hoặc nhiều chức năng tác động. Ví dụ, việc liên kết thành phần C1 của bổ thể với vùng hằng định của kháng thể có thể hoạt hóa hệ bổ thể. Việc hoạt hóa bổ thể cũng quan trọng trong quá trình opsonin hóa và phân giải tác nhân gây bệnh tế bào. Quá trình hoạt hóa bổ thể cũng kích thích đáp ứng viêm và có thể cũng liên can đến chứng quá mẫn tự miễn. Hơn nữa, các kháng thể liên kết với các thụ thể trên các tế bào khác nhau thông qua vùng Fc, mà vị trí liên kết với thụ thể Fc trên vùng Fc kháng thể liên kết với thụ thể Fc (FcR) trên tế bào. Có một vài thụ thể Fc mà đặc hiệu với các nhóm khác nhau của kháng thể, kể cả IgG (thụ thể gama), IgE (thụ thể epsilon), IgA (thụ thể alpha) và IgM (thụ thể mu). Sự liên kết kháng thể với các thụ thể Fc trên các bề mặt tế bào tạo ra một vài đáp ứng sinh học quan trọng và đa dạng kể cả quá trình vây bọc và phá hủy các hạt được bao kháng thể, thanh thải các phức hợp miễn dịch, phân giải các tế bào đích được bao kháng thể bởi các tế bào giết (được gọi là độc tính tế bào do tế bào gây ra phụ thuộc với kháng thể, hay ADCC), giải phóng chất trung gian gây viêm, chuyển qua nhau thai và kiểm soát mức tạo ra globulin miễn dịch.

Do vậy, sáng chế theo các phương án nhất định của nó chứa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó, mà trong đó ít nhất một phần của một hoặc nhiều miền của vùng hằng định đã được xóa bỏ hoặc theo cách khác, được thay đổi để tạo ra các đặc tính hóa sinh mong muốn như các chức năng tác động giảm, khả năng dime hóa bằng cách không cộng hóa trị, khả năng định

vị ở vị trí có sự kết tụ và sự lắng đọng tau giảm, thời gian bán hủy trong huyết thanh giảm, hoặc thời gian bán hủy trong huyết thanh tăng so với kháng thể nguyên vẹn, không được thay đổi có hầu như cùng một khả năng sinh miễn dịch. Ví dụ, các kháng thể nhất định để dùng trong phương pháp chẩn đoán và phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này là các kháng thể được xóa bỏ miền mà chứa chuỗi polypeptit tương tự với chuỗi nặng của globulin miễn dịch, nhưng kháng thể này thiếu ít nhất một phần của một hoặc nhiều miền chuỗi nặng. Ví dụ, trong các kháng thể nhất định, một miền nguyên vẹn của vùng hằng định của kháng thể được cải biến sẽ được xóa bỏ, ví dụ, tất cả hoặc một phần của miền CH2 sẽ được xóa bỏ. Theo các phương án khác, các kháng thể nhất định để dùng trong phương pháp chẩn đoán và phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này có vùng hằng định, ví dụ, vùng hằng định chuỗi nặng của IgG, vùng này được thay đổi để loại bỏ hiện tượng glycosyl hóa, ở chỗ khác trong bản mô tả này được gọi là kháng thể không được glycosyl hóa hay kháng thể "agly". Có thể tạo ra các kháng thể "agly" này bằng enzym cũng như bằng tạo ra (các) vị trí glycosyl hóa liên ứng trong vùng hằng định. Trong khi không bị ràng ghép nối bởi lý thuyết, tin rằng các kháng thể "agly" có thể có biên dạng an toàn và biên dạng ổn định được cải thiện *in vivo*. Các phương pháp tạo ra các kháng thể không được glycosyl hóa, có chức năng tác động mong muốn được tìm thấy, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO2005/018572, nội dung của nó được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Trong các kháng thể nhất định, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng được mô tả trong bản mô tả này, phần Fc có thể được gây đột biến để làm giảm chức năng tác động bằng việc áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, việc xóa bỏ hoặc bất hoạt (thông qua các đột biến điểm hoặc các phương tiện khác) miền của vùng hằng định có thể làm giảm khả năng liên kết với thụ thể Fc của kháng thể được cải biến lưu thông nhờ đó làm tăng mức định vị tau. Trong các trường hợp khác, có thể là các cải biến vùng hằng định nhất quán với sáng chế làm giảm mức độ liên kết với bổ thể và vì vậy mà làm giảm thời gian bán hủy trong huyết thanh và mức độ kết hợp không đặc hiệu của độc tố tế bào được tiếp hợp. Có thể sử dụng các cải biến khác nữa của vùng hằng định để cải biến các liên kết với đisulfua hoặc các gốc oligosacarit mà cho phép có được mức định vị nâng cao do tính kháng nguyên đặc hiệu hoặc tính linh động kháng thể tăng.

Biên dạng sinh lý thu được, độ sinh khả dụng và các tác dụng hóa sinh khác của các cải biến, như mức định vị tau, mức phân bố sinh học và thời gian bán hủy trong huyết thanh, có thể dễ dàng đo được và định lượng được bằng cách áp dụng các kỹ thuật miễn dịch học biết rõ mà không cần phải thực hiện thử nghiệm quá mức.

Trong các kháng thể nhất định, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng được bộc lộ trong bản mô tả này, phần Fc có thể được gây đột biến hoặc được dùng để thay đổi đối với các trình tự protein thay thế để làm tăng mức hấp thu tế bào của các kháng thể, để làm ví dụ, bằng cách tăng cường sự nhập bào do thụ thể gây ra của các kháng thể thông qua các thụ thể Fcγ, LRP, hoặc thụ thể Thy1 hoặc theo 'SuperAntibody Technology', công nghệ này được cho là giúp các kháng thể có thể di chuyển qua lại vào các tế bào sống mà không làm hại chúng (*Expert Opin. Biol. Ther.* (2005), 237-241). Ví dụ, việc tạo ra các protein dung hợp của vùng liên kết kháng thể và các phối tử protein cùng nguồn gốc của các thụ thể bề mặt tế bào hoặc kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu có trình tự đặc hiệu liên kết với tau cũng như thụ thể bề mặt tế bào có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong các kháng thể nhất định, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng được mô tả trong bản mô tả này, phần Fc có thể được gây đột biến hoặc được dùng để thay đổi đối với các trình tự protein thay thế hoặc kháng thể có thể được cải biến bằng cách hóa học để làm tăng mức độ thâm nhập hàng rào máu não của nó.

Các dạng được cải biến của các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể được tạo ra từ tiền kháng thể nguyên vẹn hoặc kháng thể gốc bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật làm ví dụ được bàn chi tiết hơn trong bản mô tả này. Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể được tạo ra hoặc được tạo ra bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án nhất định, các phân tử kháng thể hoặc các đoạn của chúng "được tạo ra bằng tái tổ hợp", tức là được tạo ra bằng cách áp dụng công nghệ ADN tái tổ hợp. Các kỹ thuật làm ví dụ dùng để tạo các phân tử kháng thể hoặc các đoạn của chúng thì được bàn luận một cách chi tiết hơn ở chỗ khác bản mô tả này.

Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế còn chứa các chất dẫn xuất mà được cải biến, ví dụ, theo phương pháp gắn kết cộng hóa trị loại phân tử bất kỳ với kháng thể sao cho quá trình gắn kết cộng hóa trị không ngăn cản kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop cùng nguồn gốc của nó. Ví dụ, nhưng không giới hạn phạm vi của sáng chế, các dẫn xuất kháng thể bao gồm các kháng thể mà đã được cải biến, ví dụ, theo phương pháp glycosyl hóa, axetyl hóa, PEG hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, tạo chất dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/phong bế đã biết, phân cắt bằng cách phân giải protein, liên kết với phối tử tế bào hoặc protein khác, v.v.. Cải biến bất kỳ trong số nhiều cải biến hóa học có thể được thực hiện theo các kỹ thuật đã biết, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc phân cắt hóa học đặc hiệu, việc axetyl hóa, việc formyl hóa, cách tổng hợp bằng cách chuyển hóa tunicamycin, v.v.. Hơn thế nữa, chất dẫn xuất có thể chứa một hoặc nhiều axit amin không cổ điển.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế sẽ không tạo ra đáp ứng miễn dịch có hại ở động vật cần được điều trị, ví dụ, của người. Theo các phương án nhất định, các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng theo sáng chế thu được từ bệnh nhân, ví dụ, người bệnh, và tiếp theo, được sử dụng ở cùng một loài mà từ đó chúng thu được, ví dụ, người, giảm bớt hoặc giảm đến mức tối thiểu hiện tượng xảy ra các đáp ứng miễn dịch có hại.

Cũng có thể áp dụng phương pháp khử miễn dịch để làm giảm tính sinh miễn dịch của kháng thể. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phương pháp khử miễn dịch" bao gồm việc thay đổi kháng thể để cải biến epitop của tế bào T; ví dụ, xem, các đơn quốc tế số WO98/52976 và WO00/34317. Ví dụ, các trình tự V_H và V_L từ kháng thể bắt đầu được phân tích và epitop của tế bào T người "lập bản đồ" từ mỗi vùng V thể hiện vị trí của các epitop trong mối quan hệ với các vùng xác định tính bổ trợ (CDR) và các gốc chủ chốt khác trong trình tự này. Các epitop tế bào T riêng biệt từ bản đồ epitop tế bào T được phân tích để nhận diện các đoạn thay thế axit amin thay thế có nguy cơ thấp về khả năng thay đổi hoạt tính của kháng thể cuối cùng. Rất nhiều trình tự V_H và V_L thay thế được thiết kế bao gồm các dạng kết hợp của các đoạn thay thế axit amin và tiếp theo, các trình tự này được sát nhập vào rất nhiều polypeptit liên kết, ví dụ, các kháng thể đặc hiệu với tau hoặc các đoạn đặc hiệu miễn dịch của nó để

dùng trong phương pháp chẩn đoán và phương pháp điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này, sau đó, các thành phần này được thử nghiệm về chức năng. Thông thường, từ 12 đến 24 kháng thể biến thể được tạo ra và được thử nghiệm. Sau đó, các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn chỉnh chứa vùng C của người và vùng V được cải biến được tách dòng vào các vectơ biểu hiện và các plasmit tiếp theo được đưa vào các dòng tế bào để tạo ra kháng thể nguyên vẹn. Sau đó, các kháng thể được so sánh trong thử nghiệm hóa sinh và thử nghiệm sinh học thích hợp, và biến thể tối ưu được nhận diện.

Có thể tạo ra các kháng thể đơn dòng bằng cách áp dụng rất nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này kể cả cách áp dụng công nghệ tế bào lai, công nghệ tái tổ hợp, và công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn, hoặc dạng kết hợp của chúng. Ví dụ, có thể tạo ra các kháng thể đơn dòng bằng cách áp dụng các kỹ thuật tế bào lai kể cả các loại đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được hướng dẫn, ví dụ, trong tài liệu: Harlow *et al., Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981), các tài liệu tham khảo đã nêu được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn toàn bộ bản mô tả. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này không chỉ giới hạn ở các kháng thể được tạo ra thông qua công nghệ tế bào lai. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" chỉ kháng thể mà thu được từ một dòng duy nhất, kể cả dòng nhân thực, nhân sơ, hoặc dòng thể thực khuẩn bất kỳ, và không phải là phương pháp mà nhờ đó nó được tạo ra. Vì vậy, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" không chỉ giới hạn ở các kháng thể được tạo ra thông qua công nghệ tế bào lai. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế thu được từ tế bào B của người, tế bào này là bất tử nhờ quá trình biến nạp bằng virut Epstein-Barr, như được mô tả trong bản mô tả này.

Trong quy trình tế bào lai đã biết rõ (Kohler *et al.*, *Nature* 256 (1975), 495), các bạch huyết bào tồn tại tương đối ngắn ngủi hoặc là bất tử từ động vật có vú, ví dụ, các tế bào B thu được từ đối tượng là người như được mô tả trong bản mô tả này, được dung hợp với dòng tế bào khối u bất tử (ví dụ, dòng tế bào u tủy), vì vậy mà, tạo ra các tế bào lai hoặc "khối tế bào lai" mà vừa bất tử vừa có khả năng tạo ra kháng thể được mã hóa về mặt di truyền của tế bào B. Sản phẩm lai thu được được tách thành các chủng gen duy nhất bằng quá trình chọn, pha loãng và nuôi cấy lại với mỗi chủng

riêng biệt chứa các gen đặc hiệu với quá trình tạo ra một kháng thể duy nhất. Chúng tạo ra các kháng thể, các kháng thể này là tương đồng kháng lại một kháng nguyên mong muốn và, khi đề cập đến nguồn gốc di truyền thuần túy của chúng, được gọi là "đơn dòng".

Các khối tế bào lai được tạo ra như vậy được gieo và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà chứa một hoặc nhiều chất có tác dụng ức chế quá trình tăng trưởng hoặc thời gian sống của các tế bào u tủy gốc không được dung hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải thấy được rằng các chất phản ứng, các dòng tế bào và môi trường để tạo ra, chọn và nuôi cấy các tế bào lai có bán trên thị trường từ một số nguồn và các quy trình được chuẩn hóa đã được xác lập rõ ràng. Nhìn chung, môi trường nuôi cấy mà trong đó các khối tế bào lai đang tăng trưởng được thử nghiệm về khả năng tạo ra kháng thể đơn dòng kháng lại kháng nguyên mong muốn. Tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng đã được tạo ra bằng các khối tế bào lai xác định được bằng các thử nghiệm *in vitro* như thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch bằng phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) như được mô tả trong bản mô tả này. Sau khi nhận diện được các khối tế bào mà tạo ra được các kháng thể có tính đặc hiệu, ái lực và/hoặc hoạt tính mong muốn, các dòng có thể được tách dưới dòng bằng các quy trình pha loãng hạn chế và được nuôi cấy bằng các phương pháp tiêu chuẩn; ví dụ, xem tài liệu: Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp. 59-103 (1986). Cũng cần phải nhận thấy rằng các kháng thể đơn dòng do các dòng phụ tiết có thể được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy, huyết thanh hoặc dịch cổ trướng bằng các quy trình làm sạch thông thường như, ví dụ, sắc ký protein-A, sắc ký hyđroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách hoặc sắc ký ái lực.

Theo một phương án khác, có thể chọn các bạch huyết bào theo phương pháp vi thao tác và các gen biến đổi phân lập được. Ví dụ, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi có thể phân lập được ra khỏi động vật có vú miễn dịch một cách tự nhiên hoặc được gây miễn dịch, ví dụ, người, và được nuôi cấy trong 7 ngày *in vitro*. Có thể sàng lọc các sản phẩm nuôi cấy để phát hiện các IgG đặc hiệu mà đáp ứng tiêu chí sàng lọc. Các tế bào từ các lỗ dương tính có thể phân lập được. Có thể phân lập các tế bào B tạo ra Ig riêng biệt bằng FACS hoặc bằng cách nhận diện chúng trong thử nghiệm mảng tan máu do bổ thể gây ra. Các tế bào B tạo ra Ig có thể được vi thao tác vào ống và gen

V_H và V_L có thể được khuếch đại bằng cách sử dụng, ví dụ, RT-PCR. Các V_H và V_L có thể được tách dòng vào vectơ biểu hiện kháng thể và được chuyển nhiễm vào các tế bào (ví dụ, tế bào có nhân thực hoặc tế bào có nhân sơ) dùng để biểu hiện.

Theo cách khác, các dòng tế bào tạo ra kháng thể có thể được chọn và nuôi cấy bằng cách áp dụng các kỹ thuật biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật như vậy được mô tả trong rất nhiều tài liệu hướng dẫn dùng trong phòng thí nghiệm và các xuất bản phẩm chính. Theo khía cạnh này, các kỹ thuật thích hợp để sử dụng trong sáng chế như được mô tả dưới đây được mô tả trong *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.*, Editor, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn toàn bộ, kể cả các phần bổ sung.

Có thể tạo ra các đoạn kháng thể có chức năng nhận biết các epitop đặc hiệu theo các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, đoạn Fab và $F(ab')_2$ có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc theo phương pháp phân cắt bằng cách phân giải protein đối với các phân tử globulin miễn dịch, bằng cách sử dụng các enzym như papain (để tạo ra các đoạn Fab) hoặc pepsin (để tạo ra các đoạn $F(ab')_2$). Đoạn $F(ab')_2$ chứa vùng biến đổi, vùng hằng định của chuỗi nhẹ và miền CH1 của chuỗi nặng. Các đoạn như vậy là đủ để sử dụng, ví dụ, trong các quy trình chẩn đoán miễn dịch bao gồm việc liên hợp các phần đặc hiệu miễn dịch của các globulin miễn dịch để phát hiện các chất phản ứng như đồng vị phóng xạ.

Các kháng thể của người, như được mô tả trong bản mô tả này, là đặc biệt thích hợp cho tính hữu ích để điều trị bệnh ở đối tượng bị bệnh là người. Các kháng thể của người theo sáng chế phân lập được, ví dụ, ra khỏi đối tượng là người khỏe mạnh mà vì tuổi của mình có thể bị nghi ngờ là có nguy cơ phát triển một rối loạn bệnh gây ra do tau, ví dụ, bệnh Alzheimer, hoặc bệnh nhân có rối loạn nhưng với tiến trình bệnh ổn định khác thường. Tuy nhiên, mặc dù phải thận trọng khi dự định rằng lần lượt là đối tượng cao tuổi khỏe mạnh và đối tượng không có triệu chứng, thường phát triển các kháng thể kháng tau có tính bảo vệ hơn các đối tượng trẻ hơn, nhưng có thể sử dụng đối tượng nêu sau này cũng như nguồn để thu được kháng thể của người theo sáng chế. Điều này là đặc biệt đúng đối với các bệnh nhân trẻ hơn mà dễ bị phát triển một dạng di truyền của bệnh do tau gây ra nhưng vẫn là không có triệu chứng vì hệ miễn dịch của họ hoạt động có hiệu quả hơn hệ miễn dịch ở người trưởng thành già hơn.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất một CDR chuỗi nặng hoặc CDR chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất hai CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất ba CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất bốn CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất năm CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất sáu CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Các phân tử kháng thể làm ví dụ chứa ít nhất một CDR mà có thể nằm trong các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này.

Có thể tạo ra các kháng thể theo sáng chế theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để tổng hợp kháng thể, cụ thể là, theo kỹ thuật tổng hợp hóa học hoặc theo kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó theo sáng chế chứa vùng hằng định tổng hợp trong đó, một hoặc nhiều miền được xóa bỏ một phần hoặc toàn bộ ("kháng thể được xóa bỏ miền"). Theo các phương án nhất định, các kháng thể được cải biến tương hợp sẽ chứa cấu trúc được xóa bỏ miền hoặc biến thể trong đó toàn bộ miền CH2 đã bị loại bỏ (cấu trúc ΔCH2). Đối với các phương án khác, một peptit kết nối ngắn có thể được dùng để thế cho miền bị xóa bỏ để tạo ra tính linh hoạt và sự tự do di chuyển đối với vùng biến đổi. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng các cấu trúc như vậy là được đặc biệt ưu tiên do các tính chất điều hòa của miền CH2 đối với tốc độ dị hóa của kháng thể. Cấu trúc được xóa bỏ miền có thể thu được bằng cách sử dụng vectơ mã hóa miền ổn định của IgG_1 của người, ví dụ, xem, các Công bố đơn quốc tế số WO02/060955 và WO02/096948A2. Vectơ này được tạo ra để xóa bỏ miền CH2 và tạo ra vectơ tổng hợp biểu hiện vùng hằng định của IgG_1 được xóa bỏ miền.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế là các tiểu thể. Các tiểu thể này có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các phương pháp được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, xem, patent Mỹ số 5,837,821 hoặc công bố đơn quốc tế số WO 94/09817.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng của globulin miễn dịch có sự xóa bỏ hoặc sự thay thế một ít hoặc thậm chí là một axit amin duy nhất miễn là nó cho phép có sự kết hợp giữa các cấu trúc siêu phân tử monome. Ví dụ, đột biến của một axit amin duy nhất trong vùng được chọn của miền CH2 có thể là đủ để giảm đáng kể khả năng liên kết với Fc và nhờ đó, làm tăng mức định vị tau. Tương tự, việc đơn giản xóa bỏ phần đó của một hoặc nhiều miền của vùng hằng định có chức năng kiểm soát chức năng tác động (ví dụ, liên kết với bổ thể) sẽ được điều biến có thể là điều mong muốn. Các đoạn xóa bỏ một phần như vậy của các vùng hằng định có thể cải thiện các đặc tính được chọn của kháng thể (thời gian bán hủy trong huyết thanh) trong khi để các chức năng thích hợp khác liên quan đến miền đối tượng của vùng hằng định được nguyên vẹn. Hơn thế nữa, theo ngụ ý nêu trên, các vùng hằng định của các kháng thể được bộc lộ có thể là vùng tổng hợp nhờ tạo đột biến hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin có tác dụng tăng cường biên dạng của cấu trúc thu được. Theo khía cạnh này, hoạt tính do vị trí liên kết được bảo toàn tạo ra (ví dụ, liên kết Fc) có thể bị phá vỡ trong khi hầu như duy trì cấu hình và biên dạng sinh miễn dịch của kháng thể đã được cải biến. Các phương án khác nữa bao gồm việc thêm một hoặc nhiều axit amin vào vùng hằng định để tăng cường các đặc tính thích hợp như chức năng tác động hoặc trợ giúp cho sự gắn kết thêm độc tố tế bào hoặc hydratcacbon. Theo các phương án như vậy, nếu chèn hoặc sao chép các trình tự đặc hiệu thu được từ các miền của vùng hằng định đã được chọn có thể điều mong muốn.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể mà gồm, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi các biến thể (kể cả các chất dẫn xuất) của các phân tử kháng thể (ví dụ, vùng V_H và/hoặc vùng V_L) được mô tả trong bản mô tả này, các kháng thể này hoặc các đoạn của chúng liên kết đặc hiệu miễn dịch với tau. Có thể áp dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết để đưa các đột biến vào trong trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quá trình tạo đột biến hướng vị trí và quá trình tạo đột biến qua trung gian PCR mà tạo ra các đoạn thay thế axit amin. Theo một phương án, các biến thể (kể cả các chất dẫn xuất) mã hóa ít hơn 50 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 40 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 30 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 25 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 20 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 15 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 10 đoạn thay thế axit amin, ít

hơn 5 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 4 đoạn thay thế axit amin, ít hơn 3 đoạn thay thế axit amin, hoặc ít hơn 2 đoạn thay thế axit amin so với vùng V_H, V_H-CDR1, V_H-CDR2, V_H-CDR3, vùng V_L, V_L-CDR1, V_L-CDR2, hoặc V_L-CDR3 tham chiếu. "Đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn" là đoạn mà trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên có điện tích tương tự. Các họ bao gồm các gốc axit amin có chuỗi bên có điện tích tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các họ này bao gồm các axit amin có chuỗi bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histiđin), chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), chuỗi bên phân cực không điện tích (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), chuỗi bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan), chuỗi bên phân nhánh ở beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và chuỗi bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histiđin). Theo cách khác, các đột biến có thể được đưa vào một cách ngẫu nhiên dọc theo tất cả hoặc một phần của trình tự mã hóa, như bằng quá trình tạo đột biến đến mức bão hòa, và các đột biến thu được có thể được sàng lọc để phát hiện hoạt tính sinh học nhằm nhận diện các đột biến mà giữ lại hoạt tính (ví dụ, khả năng liên kết với tau).

Ví dụ, có thể đưa các đột biến vào chỉ trong các vùng khung hoặc chỉ trong vùng CDR của phân tử kháng thể. Các đột biến được đưa vào có thể là đột biến câm hoặc đột biến sai nghĩa trung tính, ví dụ, không có, hoặc có ít, ảnh hưởng ngoài khả năng của kháng thể trong việc liên kết với kháng nguyên, quả thực, một số các đột biến như vậy không thay đổi bất cứ trình tự axit amin nào. Các loại đột biến này có thể là hữu ích để tối ưu hóa việc sử dụng codon, hoặc cải thiện năng suất tạo ra kháng thể của tế bào lai. Các vùng mã hóa được tối ưu hóa codon mã hóa các kháng thể theo sáng chế được bộc lộ ở chỗ bất kỳ bản mô tả này. Theo cách khác, các đột biến sai nghĩa không trung tính có thể thay đổi khả năng của kháng thể trong việc liên kết với kháng nguyên. Vị trí của hầu hết các đột biến câm và các đột biến sai nghĩa trung tính chắc chắn nằm trong các vùng khung, trong khi vị trí của hầu hết các đột biến sai nghĩa không trung tính chắc chắn nằm trong CDR, mặc dù đây không phải là cần đến tuyệt đối. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thiết kế và thử nghiệm các phân tử đột biến có các tính chất mong muốn như không có sự thay đổi về hoạt tính liên kết với kháng nguyên hoặc sự thay đổi về hoạt tính liên kết (ví dụ, các cải thiện về hoạt tính liên kết với kháng nguyên hoặc sự thay đổi về tính đặc hiệu với kháng thể).

Sau quá trình tạo đột biến, protein đã được mã hóa thường có thể được biểu hiện và hoạt tính chức năng và/hoặc hoạt tính sinh học của protein đã được mã hóa, (ví dụ, khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với ít nhất một epitop của tau) có thể xác định được bằng cách áp dụng các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này hoặc theo các kỹ thuật cải biến thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tác nhân liên kết với tau, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể liên kết với tau theo sáng chế có thể được xác định đặc điểm bằng cách sử dụng các mô hình *in vivo* hoặc *in vitro* bất kỳ của bệnh thoái hóa thần kinh do tau. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng hiểu rằng tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) theo sáng chế có thể được xác định đặc điểm ở mô hình chuột dùng cho bệnh thoái hóa thần kinh do tau. Ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, một mô hình bất kỳ trong số ba mô hình động vật khác nhau dưới đây dùng cho bệnh do tau có thể được sử dụng để xác định đặc điểm và đánh giá các kháng thể tau (và các phân tử có tính đặc hiệu liên kết của chúng) theo sáng chế.

1. Chuột chuyển gen mắc bệnh do TauP301L gây ra (dòng 183): biểu hiện tau40 của người có đột biến P301L dưới trình tự khởi đầu Thy1.2 của chuột (việc tạo các động vật chuyển gen này được mô tả trong tài liệu: Götz et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 529-534 và trong công bố đơn quốc tế số WO 2003/017918, nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ)

2. Con chuột JNPL3 biểu hiện dạng đồng chức năng của tau 4R ngắn nhất của người có đột biến P301L dưới trình tự khởi đầu PrP của chuột (mua được từ Taconic, Hudson, NY, Mỹ).

3. Chuột P301STau (dòng PS19) biểu hiện tau của người có đột biến P301S dưới trình tự khởi đầu PrP của chuột (mua được từ Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, Mỹ).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng mô hình thử nghiệm của bệnh thoái hóa thần kinh do tau có thể được sử dụng nhằm mục đích phòng bệnh hoặc nó có thể được sử dụng nhằm mục đích điều trị bệnh. Nhằm mục đích phòng bệnh, việc cho các động vật dùng thuốc theo liều bắt đầu trước khi khởi phát các bệnh thoái hóa thần kinh do tau hoặc các triệu chứng của chúng. Chức năng phòng, tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) theo sáng chế được đánh giá về khả năng của nó trong việc phòng bệnh, làm giảm hoặc trì hoãn sự khởi phát của các bệnh

thoái hóa thần kinh do tau hoặc các triệu chứng của chúng. Chức năng điều trị bệnh, việc cho các động vật dùng thuốc theo liều bắt đầu sau khi khởi phát các bệnh thoái hóa thần kinh do tau hoặc triệu chứng của chúng. Chức năng điều trị bệnh, tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) theo sáng chế được đánh giá về khả năng của nó trong việc điều trị, làm giảm hoặc giảm bớt các bệnh thoái hóa thần kinh do tau hoặc triệu chứng của chúng. Các triệu chứng của các bệnh thoái hóa thần kinh do tau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự tích tụ của các khối lắng đọng bệnh do tau, đám rối sợi thần kinh (NFT), polypeptit tau được phosphoryl hóa quá mức, các phần tau không hòa tan trong tế bào thần kinh, não, tủy sống, dịch não-tủy hoặc huyết thanh của mục đích thử nghiệm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng kết quả phòng hoặc điều trị bệnh tích cực ở mô hình động vật bất kỳ của các bệnh thoái hóa thần kinh do tau thể hiện rằng tác nhân liên kết với tau cụ thể (ví dụ, kháng thể) có thể được sử dụng cho mục đích phòng bệnh hoặc mục đích điều trị bệnh ở đối tượng không phải là sinh vật của mô hình thử nghiệm, ví dụ, nó có thể được dùng để điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh do tau ở đối tượng là người cần đến liệu pháp này.

Theo một phương án, có thể cho mô hình chuột bệnh do tau và chuột kiểu dại đối chứng tương ứng dùng tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) theo sáng chế. Kháng thể được dùng có thể là kháng thể được làm cho giống kháng thể của chuột theo sáng chế hoặc thể khảm của người-chuột của kháng thể theo sáng chế. Tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) có thể được dùng bằng phương tiện bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách dùng dược chất trong màng bụng, vào trong sọ, trong cơ, qua đường tĩnh mạch, dưới da, đường miệng và sol khí. Có thể cho động vật thử nghiệm dùng một, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều liều tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) hoặc chế phẩm đối chứng, như PBS. Theo một phương án, các động vật thử nghiệm sẽ được dùng một hoặc hai liều tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể). Xem ví dụ 9 chẳng hạn. Theo một phương án khác, các động vật dùng trong thời gian dài tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) trong một vài tuần hoặc tháng. Ví dụ, xem, ví dụ 10. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng thiết kế chế độ liều dùng mà là thích hợp đối với mục đích thử nghiệm, ví dụ, chế độ liều dùng cho các nghiên cứu ngắn hạn, chế độ liều dùng cho các nghiên cứu dài hạn, chế độ liều dùng cho các nghiên cứu độc tính, chế độ liều dùng cho các

nghiên cứu phòng hoặc điều trị bệnh. Sự có mặt của tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) trong ngăn mô cụ thể của động vật thử nghiệm, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, huyết thanh, máu, dịch não-tủy, mô não, có thể được xác lập bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem ví dụ 9 và ví dụ 10 chẳng hạn. Theo một phương án, tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) theo sáng chế có khả năng thâm nhập hàng rào máu não. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng bằng cách điều chỉnh liều lượng tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) và tần suất liều dùng, có thể duy trì được nồng độ chất liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) mong muốn ở động vật thử nghiệm. Có thể đánh giá tác dụng bất kỳ của tác nhân liên kết với tau (ví dụ, kháng thể) theo sáng chế ở các mô hình bệnh do tau bằng cách so sánh lượng, các đặc tính hóa sinh hoặc tình trạng phân bố của tau ở động vật được điều trị hoặc động vật đối chứng. Trong một ví dụ, đám rối sợi thần kinh (NFT) được thử nghiệm bằng cách áp dụng kỹ thuật tẩm bạc của Gallyas hoặc bằng cách nhuộm miễn dịch bằng kháng thể đơn dòng AT100 và AT180 của chuột, kháng thể này nhận biết tau được phosphoryl hóa do nguyên nhân bệnh lý ở NFT. Số lượng hoặc tần số của các tế bào thần kinh dương tính với Gallyas và/hoặc các tế bào thần kinh được đánh dấu AT100, AT180 trong não và tủy sống ở chuột được điều trị bằng kháng thể và các con chuột đối chứng có thể được xác định để đánh giá hiệu quả của việc điều trị bằng kháng thể. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có khả năng làm giảm mức, lượng hoặc nồng độ của đám rối sợi thần kinh trong não hoặc tủy sống ở mô hình động vật. Kháng thể này có thể làm giảm mức, lượng hoặc nồng độ của đám rối sợi thần kinh ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% hoặc nhiều hơn. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế có khả năng làm giảm số lượng hoặc tần số của các tế bào thần kinh dương tính với Gallyas trong não hoặc tủy sống ở mô hình động vật, ví dụ, ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% hoặc nhiều hơn. Theo một phương án khác nữa, kháng thể theo sáng chế có khả năng làm giảm con số hoặc tần số của tế bào thần kinh dương tính với kháng thể AT100 hoặc AT180 trong não hoặc tủy sống ở mô hình động vật, ví dụ, ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% hoặc nhiều hơn. Cũng có thể đánh giá được tác dụng của kháng thể theo sáng chế bằng cách thử nghiệm tình trạng phân bố và các tính chất hóa sinh của tau sau khi dùng kháng thể. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có khả năng làm giảm lượng hoặc nồng độ của protein tau trong não hoặc tủy sống của mô

hình động vật, ví dụ, ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% hoặc nhiều hơn. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế có khả năng làm giảm lượng hoặc nồng độ của protein tau không hòa tan trong não hoặc tủy sống của mô hình động vật, ví dụ, ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% hoặc nhiều hơn. Các phần tau không hòa tan có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong ví dụ 10 hoặc trong tài liệu: Goedert M, Spillantinimg, Cairns NJ, Crowther RA. *Neuron* 8, 159 (1992). Lượng protein tau trong mẫu sinh học có thể được xác định theo phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, như được mô tả trong ví dụ 10. Theo một phương án khác nữa, kháng thể theo sáng chế có thể làm giảm lượng hoặc nồng độ của protein tau được phosphoryl hóa quá mức trong não hoặc tủy sống ở mô hình động vật, ví dụ, ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% hoặc nhiều hơn. Có thể phát hiện tau được phosphoryl hóa quá mức bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu với các dạng được phosphoryl hóa quá mức do nguyên nhân bệnh lý bởi tau, như AT100 hoặc AT180. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể thay đổi, ví dụ, làm giảm hoặc làm tăng, nồng độ tau trong máu, huyết thanh hoặc dịch não-tủy hoặc ở mô hình động vật, ví dụ, ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% hoặc nhiều hơn. Theo một phương án, mức giảm hoặc mức tăng tính theo % là tương đối so với mức, số lượng, tần suất, lượng hoặc nồng độ mà đã tồn tại trước khi điều trị, hoặc so với mức, số lượng, tần suất, lượng hoặc nồng độ tồn tại ở đối tượng không được điều trị/đối tượng được điều trị đối chứng.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể phòng hoặc trì hoãn sự khởi phát của ít nhất một triệu chứng của bệnh thoái hóa thần kinh do tau ở một đối tượng nhất định. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể làm giảm hoặc loại bỏ ít nhất một triệu chứng của bệnh thoái hóa thần kinh do tau ở một đối tượng nhất định. Triệu chứng này có thể là hiện tượng tạo ra các khối lắng đọng bệnh do tau, các khối lắng đọng tau được phosphoryl hóa quá mức, các khối lắng đọng tau không tan, đám sợi tơ thần kinh, các khối kết tụ phospho tau tiền rối, đám rối sợi thần kinh trong tế bào thần kinh hoặc đám rối sợi thần kinh ngoài tế bào thần kinh trong não hoặc tủy sống của một đối tượng nhất định. Ví dụ, xem tài liệu: Augustinack *et al.*, *Acta Neuropathol* 103:26-35 (2002). Triệu chứng này cũng có thể là sự có mặt, hoặc nồng độ hoặc lượng tăng cao, của tau trong huyết thanh, máu, nước tiểu hoặc dịch não-tủy, trong đó nồng độ hoặc lượng tăng cao là so với đối tượng khỏe mạnh. Triệu chứng này có thể là triệu

chứng thần kinh, ví dụ, ác cảm mùi vị có điều kiện được thay đổi, tình trạng điều kiện hóa chứng sợ theo bối cảnh được thay đổi, suy giảm trí nhớ, mất chức năng vận động. Theo một phương án, chứng suy giảm trí nhớ được đánh giá bằng cách sử dụng hành vi trong mê lộ chữ Y thử nghiệm kép (two-trial Y-maze). Theo một phương án nhất định, hành vi trong mê lộ chữ Y thử nghiệm kép được thực hiện hầu như được mô tả trong ví dụ 10. Theo một phương án, ít nhất một triệu chứng được làm giảm ít nhất 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50%, 70%, hoặc 90%. Theo một phương án khác, tỷ lệ hành vi trong mê lộ chữ Y thử nghiệm kép cao hơn một cách đáng kể ở đối tượng được điều trị bằng kháng thể so với ở đối tượng đối chứng. Theo một phương án nhất định, tỷ lệ hành vi trong mê lộ chữ Y thử nghiệm kép được tăng lên ít nhất 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90%. Theo một phương án khác, tỷ lệ hành vi trong mê lộ chữ Y thử nghiệm kép thì ít nhất cao hơn hai lần, ba lần, bốn lần, năm lần, mười lần, hoặc hai mươi lần. Sáng chế còn đề xuất phương pháp phòng hoặc trì hoãn sự khởi phát của ít nhất một triệu chứng của bệnh thoái hóa thần kinh do tau ở đối tượng cần đến phương pháp này, bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu để điều trị bệnh của kháng thể tau được mô tả trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm hoặc loại bỏ ít nhất một triệu chứng của bệnh thoái hóa thần kinh do tau ở đối tượng cần đến phương pháp này, bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu điều trị bệnh của kháng thể tau được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, đối tượng này là sinh vật thử nghiệm, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột chuyển gen. Theo một phương án, đối tượng là người.

III. Polynucleotit mã hóa kháng thể

Polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó có thể chứa polyribonucleotit hoặc polyđeoxribonucleotit bất kỳ, chất này có thể là ARN hoặc ADN không được cải biến hoặc ARN hoặc ADN được cải biến. Ví dụ, polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó có thể cấu thành bởi ADN dải đơn và dải kép, ADN là hỗn hợp của vùng dải đơn và vùng dải kép, ARN dải đơn và dải kép, và ARN là hỗn hợp của vùng dải đơn và vùng dải kép, các phân tử lai chứa ADN và ARN mà có thể là dải đơn hoặc, thông thường mà không phải là, dải kép hoặc hỗn hợp của vùng dải đơn và vùng dải kép. Hơn thế nữa, polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc

đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó có thể chứa các vùng dải bội ba bao gồm ARN hoặc ADN hoặc cả ARN và ADN. Polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó cũng có thể chứa một hoặc nhiều bazơ được cải biến hoặc khung chính ADN hoặc khung chính ARN được cải biến để ổn định hoặc vì các lý do khác. Các bazơ "được cải biến" bao gồm, ví dụ, các bazơ được trityl hóa và các bazơ khác thường như inosin. Rất nhiều cải biến có thể được tạo ra đối với ADN và ARN; vì vậy, "polynucleotit" bao gồm các dạng được cải biến bằng cách hóa học, bằng enzym hoặc bằng cách chuyển hóa.

Polynucleotit phân lập được mã hóa biến thể không tự nhiên của polypeptit thu được từ globulin miễn dịch (ví dụ, phần chuỗi nhẹ hoặc phần chuỗi nặng của globulin miễn dịch) có thể được tạo ra bằng cách đưa một hoặc nhiều đoạn thay thế, đoạn thêm hoặc đoạn xóa bỏ nucleotit vào trình tự nucleotit của globulin miễn dịch sao cho một hoặc nhiều đoạn thay thế, đoạn thêm hoặc đoạn loại bỏ axit amin được đưa vào protein đã được mã hóa. Có thể đưa các đột biến vào theo các kỹ thuật chuẩn, như tạo đột biến hướng vị trí và tạo đột biến qua trung gian PCR. Theo một phương án, đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn được tạo ra trên một hoặc nhiều gốc axit amin không thiết yếu.

Như biết rõ, có thể phân lập ARN từ các tế bào B gốc, các khối tế bào lai hoặc từ các tế bào khác được biến nạp theo các kỹ thuật tiêu chuẩn, như chiết guaniđini isothioxyanat và kết tủa sau đó ly tâm hoặc sắc ký. Nếu muốn, ARN thông tin có thể phân lập được từ ARN toàn phần theo các kỹ thuật chuẩn như sắc ký trên oligo dT xenluloza. Các kỹ thuật thích hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, các ADN bổ trợ mà mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể có thể được tạo ra, hoặc một cách đồng thời hoặc một cách riêng biệt, bằng cách sử dụng enzym phiên mã ngược và ADN polymeraza theo các phương pháp biết rõ. Có thể khởi đầu PCR bằng đoạn mồi của vùng hằng định liên ứng hoặc bằng các đoạn mồi đặc hiệu hơn trên cơ sở ADN chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đã được công bố và các trình tự axit amin. Như được bàn luận trên đây, PCR cũng có thể được áp dụng để phân lập các dòng ADN mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể. Trong trường hợp này, các thư viện có thể được sàng lọc bằng các đoạn mồi liên ứng hoặc các đoạn dò tương đồng lớn hơn, như đoạn dò vùng hằng định của người.

ADN, thường là ADN plasmit, có thể phân lập được từ các tế bào bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, được lập bản đồ giới hạn và được giải trình tự theo các kỹ thuật tiêu chuẩn biết rõ được nêu chi tiết, ví dụ, trong các tài liệu tham khảo trên liên quan đến các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Tất nhiên, có thể là ADN tổng hợp theo sáng chế ở thời điểm bất kỳ trong suốt quy trình phân lập hoặc phân tích tiếp theo.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch, trong đó ít nhất một trong số các CDR của vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc ít nhất hai trong số các V_H-CDR của vùng biến đổi của chuỗi nặng tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nặng tham chiếu V_H-CDR1, V_H-CDR2, hoặc V_H-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo cách khác, các vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2, hoặc V_H-CDR3 của V_H có mức độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nặng tham chiếu V_H-CDR1, V_H-CDR2, và V_H-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Vì vậy, theo phương án này, vùng biến đổi của chuỗi nặng theo sáng chế có các trình tự polypeptit V_H-CDR1, V_H-CDR2, hoặc V_H-CDR3 liên quan đến các trình tự polypeptit được thể hiện trên hình 7. Theo một phương án, trình tự axit amin của VH CDR1 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; trình tự axit amin của VH CDR2 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; và trình tự axit amin của VH CDR3 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch, mà trong đó các vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 được thể hiện trên hình 7, trừ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, hoặc mười đoạn thay thế axit amin trong một V_H-CDR bất kỳ. Theo các phương án nhất định, các đoạn thay thế axit amin là theo kiểu bảo toàn. Theo một phương án, trình tự

axit amin của VH CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; trình tự axit amin của VH CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; và trình tự axit amin của VH CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch, trong đó ít nhất một trong số các V_L-CDR của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc ít nhất hai trong số các V_L-CDR của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ tham chiếu V_L-CDR1, V_L-CDR2, hoặc V_L-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo cách khác, các vùng V_L-CDR1, V_L-CDR2, hoặc V_L-CDR3 của V_L có mức độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với các trình tự axit amin của chuỗi nhẹ tham chiếu V_L-CDR1, V_L-CDR2, và V_L-CDR3 từ các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Vì vậy, theo phương án này, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của sáng chế có các trình tự polypeptit V_L-CDR1, V_L-CDR2, hoặc V_L-CDR3 liên quan đến các trình tự polypeptit được thể hiện trên hình 7. Theo một phương án, trình tự axit amin của VL CDR1 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; trình tự axit amin của VL CDR2 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và trình tự axit amin của VL CDR3 tham chiếu là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch mà trong đó các vùng V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 được thể hiện trên hình 7, trừ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, hoặc mười đoạn thay thế axit amin trong một V_L-CDR bất kỳ. Theo các phương án nhất định, các đoạn thay thế axit amin là theo kiểu bảo toàn. Theo một phương án, trình tự axit amin của VL CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112,

118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; trình tự axit amin của VL CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và trình tự axit amin của VL CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch mà trong đó các vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2, và V_H-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_H-CDR1, V_H-CDR2, và V_H-CDR3 được thể hiện trên hình 7. Theo một phương án, trình tự axit amin của VH CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, hoặc 163; trình tự axit amin của VH CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, hoặc 164; và trình tự axit amin của VH CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, hoặc 165.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch mà trong đó các vùng V_L-CDR1, V_L-CDR2, và V_L-CDR3 có các trình tự polypeptit mà tương đồng với các nhóm V_L-CDR1, V_L-CDR2, và V_L-CDR3 được thể hiện trên hình 7. Theo một phương án, trình tự axit amin của VL CDR1 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, hoặc 224; trình tự axit amin của VL CDR2 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, hoặc 167; và trình tự axit amin của VL CDR3 là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, hoặc 168.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, "mức độ tương đồng trình tự" giữa hai polypeptit hoặc hai polynucleotit xác định được bằng cách so sánh trình tự axit amin hoặc trình tự của axit nucleic của một polypeptit hoặc polynucleotit với trình tự của polypeptit hoặc polynucleotit thứ hai. Nếu được bàn luận trong bản mô tả này, việc một polypeptit cụ thể bất kỳ tương đồng ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% với polypeptit khác hay không có thể xác định được bằng cách áp dụng các phương pháp và phần mềm/chương trình máy tính đã biết

trong lĩnh vực kỹ thuật này như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chương trình BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, phiên bản 8 dùng cho Unix, *Genetics* Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT áp dụng thuật toán về mức độ tương đồng cục bộ theo tài liệu: Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, để phát hiện ra đoạn tốt nhất có tính tương đồng giữa hai trình tự. Nếu sử dụng BESTFIT hoặc chương trình so sánh trình tự bất kỳ khác để xác định xem liệu một trình tự cụ thể có tương đồng, ví dụ, 95% với trình tự tham chiếu theo sáng chế hay không, tất nhiên, các thông số được ấn định sao cho tỷ lệ phần trăm của mức độ tương đồng được tính trên chiều dài đầy đủ của trình tự polypeptit tham chiếu và cho phép có khoảng trống về mức độ tương đồng lên đến 5% tổng số các axit amin trong trình tự tham chiếu.

Theo một phương án của sáng chế, polynucleotit chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic có trình tự polynucleotit của vùng V_H hoặc V_L của kháng thể kháng tau như được thể hiện trong bảng 4. Ở khía cạnh này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng nhận thấy rằng các polynucleotit mã hóa ít nhất miền biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng có thể mã hóa miền biến đổi của cả hai hoặc chỉ một chuỗi globulin miễn dịch.

Bảng 4: Các trình tự nucleotit của vùng V_H và V_L của các kháng thể đặc hiệu với tau. BG – trước khi tách dòng

Kháng thể	Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)	
NI-105.17C1	BG V_H	SEQ. ID. NO:169
	V_H	SEQ. ID. NO:170
	V_L	SEQ. ID. NO:171
NI-105.6C5	BG V_H	SEQ. ID. NO:172
	V_H	SEQ. ID. NO:173
	V_L	SEQ. ID. NO:174
NI-105.29G10	V_H	SEQ. ID. NO:175
	V_L	SEQ. ID. NO:176
NI-105.6L9	V_H	SEQ. ID. NO:177
	V_L	SEQ. ID. NO:178
NI-105.40E8	V_H	SEQ. ID. NO:179

Kháng thể	Trình tự nucleotit của vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL)	
	V_L	SEQ. ID. NO:180
NI-105.48E5	V_H	SEQ. ID. NO:181
	V_L	SEQ. ID. NO:182
NI-105.6E3	V_H	SEQ. ID. NO:183
	V_L	SEQ. ID. NO:184
NI-105.22E1	V_H	SEQ. ID. NO:185
	V_L	SEQ. ID. NO:186
NI-105.26B12	V_H	SEQ. ID. NO:187
	BG V_L	SEQ. ID. NO:188
	V_L	SEQ. ID. NO: 223
NI-105.12E12	V_H	SEQ. ID. NO:189
	V_L	SEQ. ID. NO:190
NI-105.60E7	V_H	SEQ. ID. NO:191
	V_L	SEQ. ID. NO:192
NI-105.14E2	V_H	SEQ. ID. NO:193
	V_L	SEQ. ID. NO:194
NI-105.39E2	V_H	SEQ. ID. NO:195
	V_L	SEQ. ID. NO:196
NI-105.19C6	V_H	SEQ. ID. NO:197
	V_L	SEQ. ID. NO:198
NI-105.9C4	BG V_H	SEQ. ID. NO:199
	V_H	SEQ. ID. NO: 200
	BG V_L	SEQ. ID. NO: 201
	V_L	SEQ. ID. NO: 202

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng của globulin miễn dịch tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc 95% với chuỗi nặng tham chiếu VH. Theo một phương án, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng tham chiếu chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76, hoặc 220.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của

globulin miễn dịch tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc 95% với chuỗi nhẹ tham chiếu VL. Theo một phương án, trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ tham chiếu chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221, hoặc 222.

Sáng chế còn bao gồm các đoạn của các polynucleotit theo sáng chế, như được ở chỗ khác bất kỳ. Hơn thế nữa, các polynucleotit mà mã hóa các polynucleotit dung hợp, đoạn Fab, và các chất dẫn xuất khác, như được mô tả trong bản mô tả này, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các polynucleotit có thể được tạo ra hoặc được sinh ra theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, nếu trình tự nucleotit của kháng thể là đã biết, polynucleotit mã hóa kháng thể có thể được lắp ráp từ các oligonucleotit tổng hợp được theo cách hóa học, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: Kutmeier *et al.*, *BioTechniques* 17 (1994), 242, nói một cách ngắn gọn, phương pháp này bao gồm việc tổng hợp các oligonucleotit chồng lên nhau chứa các phần của trình tự mã hóa kháng thể, ghép đôi và ghép nối các oligonucleotit đó, và sau đó, khuếch đại các oligonucleotit được đã được ghép nối này bằng PCR.

Theo cách khác, có thể tạo ra polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó từ axit nucleic từ nguồn thích hợp. Nếu không sẵn có dòng chứa axit nucleic mã hóa một kháng thể nhất định, nhưng trình tự của phân tử kháng thể là đã biết, axit nucleic mã hóa kháng thể có thể được tổng hợp theo cách hóa học hoặc thu được từ nguồn thích hợp (ví dụ, thư viện ADN bổ trợ của kháng thể, hoặc thư viện ADN bổ trợ được tạo ra từ nó, hoặc axit nucleic, tốt hơn là polyA$^+$ARN phân lập được từ nó, mô hoặc tế bào bất kỳ biểu hiện kháng thể đặc hiệu với tau, như các khối tế bào lai được chọn để biểu hiện kháng thể) theo phương pháp khuếch đại bằng PCR có sử dụng đoạn mồi tổng hợp lai được với đầu tận cùng 3' và đầu tận cùng 5' của trình tự hoặc bằng cách tách dòng có sử dụng đoạn dò oligonucleotit đặc hiệu với trình tự gen cụ thể để nhận diện, ví dụ, dòng ADN bổ trợ từ thư viện ADN bổ trợ mà mã hóa kháng thể. Sau đó, các axit nucleic đã được khuếch đại được tạo ra bằng PCR có thể được tách dòng vào các vectơ tách dòng sao chép được bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ biết rõ trong lĩnh vực này.

Một khi trình tự nucleotit và trình tự axit amin tương ứng của kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó được xác định, có

thể tạo ra trình tự nucleotit của nó bằng cách áp dụng các phương pháp biết rõ trong lĩnh vực này dùng để tạo ra trình tự nucleotit, ví dụ, các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, phương pháp tạo đột biến hướng vị trí, PCR, v.v. (ví dụ, xem, các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu: Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) và Ausubel *et al.*, Ed.,, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), cả hai tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn), để tạo ra các kháng thể có trình tự axit amin khác biệt, ví dụ, để tạo ra đoạn thay thế, đoạn xóa bỏ và/hoặc đoạn chèn axit amin.

IV. Biểu hiện polypeptit của kháng thể

Sau khi tạo ra vật liệu di truyền đã phân lập được để tạo ra các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế, các polynucleotit mã hóa các kháng thể thường được chèn vào vectơ biểu hiện để đưa vào các tế bào chủ mà có thể được sử dụng để tạo ra số lượng kháng thể mong muốn. Sự biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể, hoặc đoạn, chất dẫn xuất hoặc chất tương đồng của nó, ví dụ, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà liên kết với phân tử đích được mô tả trong bản mô tả này. Một khi đã thu được polynucleotit mã hóa phân tử kháng thể hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc phần của nó (tốt hơn, là chứa miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ), theo sáng chế, có thể tạo ra vectơ để tạo ra phân tử kháng thể bằng công nghệ ADN tái tổ hợp bằng cách áp dụng các kỹ thuật biết rõ trong lĩnh vực này. Vì vậy, các phương pháp tạo ra protein bằng cách biểu hiện polynucleotit chứa kháng thể mã hóa trình tự nucleotit được mô tả trong bản mô tả này. Có thể sử dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ để thiết kế các vectơ biểu hiện chứa các trình tự mã hóa kháng thể và các tín hiệu kiểm soát quá trình phiên mã và quá trình dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm, ví dụ, các kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, các kỹ thuật tổng hợp, và tái tổ hợp gen *in vivo*. Vì vậy, sáng chế đề xuất các vectơ sao chép được chứa trình tự nucleotit mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế, hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của nó, hoặc miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, được liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu. Các vectơ này có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa vùng hằng định của phân tử kháng thể (ví dụ, xem, các công bố đơn quốc tế số

WO 86/05807 và WO 89/01036; và patent Mỹ số 5,122,464) và miền biến đổi của kháng thể có thể được tách dòng vào vectơ như vậy để biểu hiện toàn bộ chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ "vectơ" hoặc "vectơ biểu hiện" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các vectơ dùng theo sáng chế làm chất dẫn để đưa và biểu hiện gen mong muốn vào trong tế bào chủ. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, có thể dễ dàng chọn các vectơ này từ nhóm bao gồm các plasmit, thể thực khuẩn, virut và retrovirut. Nhìn chung, các vectơ tương hợp với sáng chế sẽ chứa dấu chuẩn chọn lọc, các vị trí giới hạn thích hợp để tạo điều kiện thuận lợi để tách dòng gen mong muốn và khả năng xâm nhập và/hoặc sao chép trong tế bào có nhân thực hoặc tế bào có nhân sơ. Đối với mục đích của sáng chế, có thể sử dụng nhiều hệ vectơ biểu hiện khác nhau. Ví dụ, một nhóm vectơ sử dụng các yếu tố ADN mà thu được từ các virut động vật như virut gây u nhú ở bò, virut polioma, adenovirut, virut bệnh đậu bò, baculovirut, các retrovirut (RSV, MMTV hoặc MOMLV) hoặc virut SV40. Các phương pháp khác bao gồm việc sử dụng các hệ đa cistron có các vị trí liên kết ribosom bên trong. Hơn thế nữa, cũng có thể chọn các tế bào mà đã tích hợp ADN vào nhiễm sắc thể của chúng bằng cách đưa vào một hoặc nhiều dấu chuẩn mà cho phép chọn các tế bào chủ đã được chuyển nhiễm. Dấu chuẩn có thể tạo ra khả năng nguyên dưỡng cho vật chủ đột biến khuyết dưỡng, tính kháng với chất hủy diệt sinh học (ví dụ, chất kháng sinh) hoặc tính kháng với các kim loại nặng như đồng. Dấu chuẩn có thể chọn được có thể được liên kết một cách trực tiếp với các trình tự ADN sẽ được biểu hiện, hoặc được đưa vào cùng một tế bào bằng quá trình đồng biến nạp. Cũng có thể cần đến các yếu tố bổ sung cho phép tổng hợp tối ưu ARN thông tin. Các yếu tố này có thể bao gồm trình tự tín hiệu, các tín hiệu tách intron, cũng như các trình tự tăng cường, các trình tự khởi đầu quá trình phiên mã và các tín hiệu chấm dứt.

Theo các phương án nhất định, các gen của vùng biến đổi đã được tách dòng được chèn vào vectơ biểu hiện cùng các gen của vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (ví dụ, các gen của vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người) như được bàn luận trên đây. Theo một phương án, điều này được thực hiện bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện độc quyền của Biogen IDEC, Inc., được gọi là NEOSPLA, được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,159,730. Vectơ này chứa trình tự tăng cường/trình tự khởi đầu của virut cự bào, trình tự khởi đầu chính globin beta của chuột, điểm khởi

đầu sao chép của SV40, trình tự polyađenyl hóa hormon tăng trưởng của bò, neomyxin phosphotransferaza exon 1 và exon 2, gen đihyđrofolat ređuctaza và trình tự dẫn đầu. Vectơ này đã được phát hiện là có tạo ra sự biểu hiện ở mức rất cao của các kháng thể khi sát nhập các gen của vùng biến đổi và vùng hằng định, sự chuyển nhiễm vào tế bào CHO, sau đó quá trình chọn trong môi trường chứa G418 và khuếch đại bằng metotrexat. Tất nhiên, vectơ biểu hiện bất kỳ mà có khả năng tạo ra sự biểu hiện trong các tế bào có nhân thực có thể được sử dụng trong sáng chế. Các ví dụ về các vectơ thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các plasmit pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, và pZeoSV2 (mua được từ Invitrogen, San Diego, CA), và plasmit pCI (mua được từ Promega, Madison, WI). Nhìn chung, việc sàng lọc số lượng lớn các tế bào đã được biến nạp để phát hiện ra loại có chức năng biểu hiện ở mức cao một cách thích hợp của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch là việc thực hiện thử nghiệm thông thường mà có thể được thực hiện, ví dụ, bằng robot. Các hệ vectơ cũng được đưa ra trong các patent Mỹ số 5,736,137 và 5,658,570, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn toàn bộ. Hệ này tạo ra mức biểu hiện cao, ví dụ, > 30pg/tế bào/ngày. Các hệ vectơ làm ví dụ khác được bộc lộ, ví dụ, trong patent Mỹ số 6,413,777.

Theo các phương án khác, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng các cấu trúc đa cistron như các cấu trúc được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003-0157641 A1 và được đưa hoàn toàn vào đây. Trong hệ biểu hiện này, nhiều sản phẩm gen đáng được quan tâm như chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể có thể được tạo ra từ một cấu trúc đa cistron duy nhất. Có lợi, nếu các hệ này sử dụng điểm vào ribosom bên trong (IRES) để tạo ra số lượng kháng thể tương đối cao. Các trình tự IRES tương hợp được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,193,980, bản mô tả này cũng được đưa vào đây. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng có thể sử dụng hệ biểu hiện này để tạo ra một cách hữu hiệu rất nhiều đầy đủ các kháng thể được bộc lộ trong đơn này.

Một cách tổng quát hơn, một khi đã tạo ra được vectơ hoặc trình tự ADN mã hóa cấu trúc siêu phân tử dạng monome của kháng thể, có thể đưa vectơ biểu hiện vào tế bào chủ thích hợp. Có thể thực hiện việc đưa plasmit vào tế bào chủ với các kỹ thuật

khác nhau mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật chuyển nhiễm kể cả kỹ thuật chuyển nhiễm liposom bằng cách sử dụng, ví dụ, Fugene® hoặc lipofectamin, dung hợp thể nguyên sinh, kết tủa canxi phosphat, dung hợp tế bào bằng ADN có vỏ bọc, vi tiêm, và gây nhiễm bằng virut nguyên vẹn. Thông thường, việc đưa plasmit vào vật chủ được thực hiện nhờ phương pháp đồng kết tủa canxi phosphat tiêu chuẩn. Các tế bào chủ chứa cấu trúc biểu hiện được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp đối với việc tạo ra chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, và được thử nghiệm về khả năng tổng hợp protein của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Các kỹ thuật thử nghiệm làm ví dụ bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch bằng phóng xạ (RIA), hoặc phép phân tích sàng lọc tế bào được hoạt hóa bằng huỳnh quang (FACS), hóa mô miễn dịch và các phương pháp tương tự.

Vectơ biểu hiện được chuyển vào tế bào chủ theo các kỹ thuật thông thường và sau đó, các tế bào đã được chuyển nhiễm được nuôi cấy theo các kỹ thuật thông thường để tạo ra kháng thể để sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Vì vậy, sáng chế bao gồm các tế bào chủ chứa polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế, hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của nó, được liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu khác nguồn gốc. Theo các phương án nhất định đối với sự biểu hiện của các kháng thể chuỗi kép, vectơ mã hóa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được cùng biểu hiện trong tế bào chủ dùng để biểu hiện toàn bộ phân tử globulin miễn dịch, như được mô tả một cách chi tiết dưới đây.

Tế bào chủ có thể được cùng chuyển nhiễm bằng hai vectơ biểu hiện theo sáng chế, vectơ thứ nhất mã hóa polypeptit thu được từ chuỗi nặng và vectơ thứ hai mã hóa polypeptit thu được từ chuỗi nhẹ. Hai vectơ này có thể chứa các dấu chuẩn chọn được đồng nhất có tác dụng giúp đạt được mức biểu hiện ngang nhau của polypeptit chuỗi nặng và polypeptit chuỗi nhẹ. Theo cách khác, có thể sử dụng một vectơ duy nhất mà mã hóa cả polypeptit chuỗi nặng và polypeptit chuỗi nhẹ. Trong các tình huống này, có lợi nếu chuỗi nhẹ được đặt trước chuỗi nặng để tránh lượng dư của chuỗi nặng tự do độc hại; xem tài liệu: Proudfoot, *Nature* 322 (1986), 52; Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 2197. Các trình tự mã hóa của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể bao gồm ADN bổ trợ hoặc ADN hệ gen.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "các tế bào chủ" chỉ các tế bào mà chứa các vectơ này được thiết kế bằng cách áp dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và mã hóa ít nhất một gen khác nguồn gốc. Trong các phần mô tả về các quy trình để phân lập các kháng thể ra khỏi tế bào chủ tái tổ hợp, các thuật ngữ "tế bào" và "môi trường nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ nguồn của kháng thể trừ khi có quy định rõ ràng khác. Nói cách khác, việc thu hồi polypeptit từ "các tế bào" có nghĩa là từ các tế bào nguyên vẹn đã được ly tâm lắng xuống, hoặc từ môi trường nuôi cấy tế bào chứa cả môi trường và các tế bào đã được tạo huyền phù.

Có thể sử dụng rất nhiều hệ vectơ biểu hiện-vật chủ để biểu hiện các phân tử kháng thể dùng trong các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Hệ biểu hiện-vật chủ này là các chất dẫn mà nhờ đó các trình tự mã hóa đang được quan tâm có thể được tạo ra và tiếp theo, được làm sạch, nhưng cũng là các tế bào mà có thể, khi được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm bằng trình tự nucleotit mã hóa thích hợp, biểu hiện phân tử kháng thể theo sáng chế tại chỗ. Các hệ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các vi sinh vật như vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*, *B. subtilis*) được biến nạp bằng ADN thể thực khuẩn tái tổ hợp, vectơ biểu hiện ADN plasmit hoặc vectơ biểu hiện ADN cosmit chứa các trình tự mã hóa kháng thể; nấm men (ví dụ, *Saccharomyces*, *Pichia*) được biến nạp bằng vectơ biểu hiện nấm men tái tổ hợp chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào côn trùng được gây nhiễm bằng các vectơ biểu hiện virut tái tổ hợp (ví dụ, baculovirut) chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hệ tế bào thực vật được gây nhiễm bằng các vectơ biểu hiện virut tái tổ hợp (ví dụ, virut khảm xúp lơ, CaMV; virut khảm thuốc lá, TMV) hoặc được biến nạp bằng vectơ biểu hiện plasmit tái tổ hợp (ví dụ, plasmit Ti) chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hoặc các hệ tế bào của động vật có vú (ví dụ, các tế bào COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) chứa cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa các trình tự khởi đầu thu được từ hệ gen của các tế bào của động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu metalothionein) hoặc từ các virut động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu muộn của adenovirut; trình tự khởi đầu 7.5K của virut bệnh đậu bò). Theo một phương án, các tế bào vi khuẩn như *Escherichia coli*, và tốt hơn, là các tế bào có nhân thực, đặc biệt là đối với sự biểu hiện phân tử kháng thể tái tổ hợp nguyên vẹn, được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể tái tổ hợp. Ví dụ, các tế bào của động vật có vú như tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc (CHO), cùng với vectơ như yếu tố trình tự khởi đầu sớm-trung bình từ virut cự bào của người là hệ biểu hiện hữu

hiệu dùng cho kháng thể; ví dụ, xem, tài liệu: Foecking *et al.*, *Gene* 45 (1986), 101; Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8 (1990), 2.

Dòng tế bào chủ được dùng để biểu hiện protein thường thu được từ động vật có vú; người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy khả năng xác định các dòng tế bào chủ cụ thể mà phù hợp nhất đối với sản phẩm gen mong muốn sẽ được biểu hiện trong đó. Các dòng tế bào chủ làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, CHO (Chinese Hamster Ovary), DG44 và DUXB11 (các dòng Chinese Hamster Ovary, không có DHFR), HELA (canxinom từ cổ tử cung người), CVI (dòng thận khỉ), COS (chất dẫn xuất của CVI có kháng nguyên T SV40), VERY, BHK (thận của chuột túi má con), MDCK, WI38, R1610 (nguyên bào sợi của chuột túi má Trung Quốc) BALBC/3T3 (nguyên bào sợi của chuột), HAK (dòng thận của chuột túi má), SP2/O (u tủy của chuột), P3x63-Ag3,653 (u tủy của chuột), BFA-1c1BPT (các tế bào nội mô của bò), RAJI (bạch huyết bào của người) và 293 (thận của người). Theo một phương án nhất định, các dòng tế bào chủ là các tế bào CHO hoặc 293. Các dòng tế bào chủ thường có được từ các nguồn thương mại, American Tissue Culture Collection hoặc từ tài liệu chuyên ngành đã được xuất bản.

Ngoài ra, cũng có thể chọn chủng tế bào chủ có chức năng điều biến sự biểu hiện trình tự đã được chèn, hoặc cải biến và xử lý sản phẩm gen theo cách đặc hiệu mong muốn. Các cải biến (ví dụ, glycosyl hóa) và xử lý (ví dụ, phân cắt) các sản phẩm protein như vậy có thể là quan trọng đối với chức năng của protein. Các tế bào chủ khác nhau có các cơ chế đặc hiệu và đặc trưng đối với quy trình xử lý sau dịch mã và quy trình cải biến protein và sản phẩm gen. Các dòng tế bào hoặc các hệ vật chủ thích hợp có thể được chọn lựa để đảm bảo quy trình cải biến và xử lý chính xác của protein lạ được biểu hiện. Đối với mục đích này, các tế bào chủ có nhân thực mà sở hữu bộ máy tế bào dùng cho quy trình xử lý thích hợp sản phẩm phiên mã sơ cấp, glycosyl hóa, và phosphoryl hóa sản phẩm gen có thể được sử dụng.

Đối với việc tạo ra các protein tái tổ hợp lâu dài với hiệu suất cao, sự biểu hiện ổn định là được ưu tiên. Ví dụ, các dòng tế bào mà biểu hiện một cách ổn định phân tử kháng thể có thể được tạo ra. Thay vì sử dụng các vectơ biểu hiện mà chứa điểm khởi đầu sao chép virut, các tế bào chủ có thể được biến nạp bằng ADN được kiểm soát bằng các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện thích hợp (ví dụ, trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường, các trình tự, yếu tố kết thúc phiên mã, vị trí polyađenyl hóa, v.v.), và dấu chuẩn

có thể chọn. Sau khi đưa ADN lạ vào, có thể cho phép các tế bào đã được tạo ra sinh trưởng trong 1 đến 2 ngày trong môi trường được làm giàu, và sau đó, được chuyển vào môi trường chọn lọc. Dấu chuẩn có thể chọn trong plasmit tái tổ hợp tạo ra tính kháng với quá trình chọn và cho phép các tế bào tích hợp plasmit vào nhiễm sắc thể của chúng một cách ổn định và tăng trưởng để tạo ra ổ bệnh, ổ bệnh này lại có thể được tách dòng và nhân rộng thành các dòng tế bào. Có lợi nếu áp dụng phương pháp này để tạo ra các dòng tế bào mà biểu hiện một cách ổn định phân tử kháng thể.

Số lượng hệ chọn có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thymiđin kinaza của hệ virut herpes (Wigler *et al.*, *Cell* 11 (1977), 223), hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48(1992), 202), và ađenin phosphoribosyltransferaza (Lowy *et al.*, *Cell* 22 (1980), 817), các gen này có thể lần lượt được sử dụng trong tế bào tk, tế bào hgprt hoặc tế bào aprt. Ngoài ra, tính kháng chất chống chuyển hóa có thể được sử dụng làm cơ sở của việc chọn đối với các gen sau: dhfr, gen này tạo ra tính kháng với metotrexat (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 357; O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1527); gpt, gen này tạo ra tính kháng với axit mycophenolic (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 2072); neo, gen này tạo ra tính kháng với aminoglycosit G-418 (Goldspiel *et al., Clinical Pharmacy* 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 (1993), 573-596; Mulligan, *Science* 260 (1993), 926-932; và Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11(1993), 155-215; và hygro, gen này tạo ra tính kháng với hygromyxin (Santerre *et al.*, *Gene* 30 (1984), 147. Các phương pháp đã biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật công nghệ ADN tái tổ hợp mà có thể được sử dụng được mô tả trong tài liệu: Ausubel *et al.* (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley& Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); và ở các chương 12 và 13, Dracopoli *et al.* (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981), tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Có thể làm tăng mức biểu hiện phân tử kháng thể theo phương pháp khuếch đại vectơ, tổng quan, xem tài liệu: Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA*

Cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). Nếu dấu chuẩn trong hệ vectơ biểu hiện kháng thể khuếch đại được, hiện tượng tăng lượng chất ức chế có mặt trong môi trường nuôi cấy tế bào chủ sẽ làm tăng số lượng bản sao của dấu chuẩn gen. Vì vùng đã được khuếch đại là liên quan đến gen của kháng thể, nên mức tạo ra kháng thể cũng sẽ tăng lên; xem tài liệu: Crouse *et al., Mol. Cell. Biol.* 3 (1983), 257.

Quá trình tạo ra *in vitro* cho phép tăng quy mô để thu được số lượng lớn polypeptit mong muốn. Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào của động vật có vú trong điều kiện nuôi cấy mô là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm việc nuôi cấy trong huyền phù đồng nhất, ví dụ, trong thiết bị phản ứng trộn bằng không khí hoặc trong thiết bị phản ứng khuấy liên tục, hoặc môi trường nuôi cấy tế bào bị giữ lại hoặc bất động, ví dụ, trong sợi rỗng, vi nang, trên các vi hạt của agaroza hoặc ống nạp gốm. Nếu cần và/hoặc muốn, dung dịch chứa polypeptit có thể được làm sạch bằng các phương pháp sắc ký thông thường, ví dụ, lọc bằng gel, sắc ký trao đổi ion, sắc ký trên DEAE-xenluloza hoặc sắc ký ái lực (ái lực miễn dịch), ví dụ, sau khi tổng hợp sinh học ưu tiên đối với polypeptit vùng bản lề tổng hợp hoặc trước khi hoặc tiếp theo bước sắc ký HIC được mô tả trong bản mô tả này.

Gen mã hóa các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế cũng có thể được biểu hiện trong các tế bào không phải của động vật có vú như tế bào vi khuẩn hoặc côn trùng hoặc nấm men hoặc tế bào thực vật. Vi khuẩn mà dễ dàng hấp thụ các axit nucleic bao gồm các thành viên của enterobacteriaceae, như các chủng của *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; Bacillaceae, như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, và *Haemophilus influenzae*. Cần phải nhận thấy thêm rằng, nếu được biểu hiện ở vi khuẩn, các polypeptit khác nguồn gốc thường trở thành một phần của thể vùi. Các polypeptit khác nguồn gốc phải phân lập được, làm sạch và sau đó, được lắp ráp vào các phân tử chức năng. Nếu muốn có các dạng hóa trị bốn của kháng thể, các cấu trúc siêu phân tử sẽ tự lắp ráp vào các kháng thể hóa trị bốn; ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO02/096948.

Trong hệ vi khuẩn, một vài vectơ biểu hiện có thể được chọn theo cách có lợi tùy thuộc vào việc sử dụng được dự định đối với phân tử kháng thể đang được biểu hiện. Ví dụ, nếu cần tạo ra một số lượng lớn protein này, để tạo ra dược phẩm chứa phân tử kháng thể, các vectơ có chức năng hướng đến sự biểu hiện các mức sản phẩm protein

dung hợp cao mà dễ dàng được làm sạch có thể là thích hợp. Các vectơ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vectơ biểu hiện *E. coli* là pUR278 (Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2 (1983),1791), mà trong đó trình tự mã hóa kháng thể có thể được ghép nối một cách riêng biệt vào vectơ trong khung với vùng mã hóa lacZ sao cho tạo ra được protein dung hợp; các vectơ pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24 (1989), 5503-5509); và các chất tương tự. Các vectơ PGEX cũng có thể được sử dụng để biểu hiện các polypeptit lạ ở dạng protein dung hợp có glutathion S-transferaza (GST). Nhìn chung, các protein dung hợp này tan được và có thể được làm sạch một cách dễ dàng từ các tế bào đã được phân giải bằng quá trình hấp phụ và liên kết với cơ chất của các hạt glutathion-agaroza, sau đó giải hấp với sự có mặt của glutathion tự do. Các vectơ PGEX được thiết kế để có vị trí phân cắt trombin hoặc vị trí phân cắt proteaza của yếu tố Xa sao cho sản phẩm gen đích đã được tách dòng có thể được giải phóng ra khỏi gốc GST.

Ngoài sinh vật nhân sơ, còn có thể sử dụng vi sinh vật nhân thực. *Saccharomyces cerevisiae*, hay nấm men bánh mỳ thông thường, được sử dụng rộng rãi nhất trong số các vi sinh vật nhân thực mặc dù một số chủng khác thường sẵn có, ví dụ, *Pichia pastoris*. Đối với sự biểu hiện ở *Saccharomyces*, plasmit YRp7, ví dụ, (Stinchcomb *et al.*, *Nature* 282 (1979), 39; Kingsman *et al.*, *Gene* 7 (1979), 141; Tschemper *et al.*, *Gene* 10 (1980), 157) được sử dụng rộng rãi. Plasmit này chứa gen TRP1 mà tạo ra dấu chuẩn chọn đối với chủng đột biến của nấm men thiếu khả năng sinh trưởng trong tryptophan, ví dụ, số hiệu lưu giữ theo ATCC là 44076 hoặc PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85(1977), 12). Sau đó, sự có mặt của thương tổn trpl dưới dạng điểm đặc trưng của hệ gen của tế bào chủ nấm men tạo ra môi trường hữu hiệu để phát hiện hiện tượng biến nạp theo mức tăng trưởng khi không có tryptophan.

Trong hệ côn trùng, virut đa diện nhân *Autographa californica* (AcNPV) thường được sử dụng làm vectơ để biểu hiện gen lạ. Virut này sinh trưởng trong các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Trình tự mã hóa kháng thể có thể được tách dòng một cách riêng biệt vào các vùng không thiết yếu (ví dụ, gen polyhedrin) của virut và được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu AcNPV (ví dụ, trình tự khởi đầu polyhedrin).

Một khi phân tử kháng thể theo sáng chế đã được biểu hiện bằng cách tái tổ hợp, các kháng thể nguyên vẹn, các đime của chúng, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ riêng biệt, hoặc các dạng globulin miễn dịch khác theo sáng chế, có thể được làm sạch theo các

quy trình tiêu chuẩn của lĩnh vực kỹ thuật này, kể cả, ví dụ, sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, cụ thể là bằng ái lực đối với kháng nguyên đặc hiệu sau Protein A, và sắc ký cột định kích thước), ly tâm, tách theo mức độ tan khác nhau, ví dụ, kết tủa amoni sulfat, hoặc theo kỹ thuật tiêu chuẩn bất kỳ khác dùng để làm sạch protein; ví dụ, xem tài liệu: Scopes, "*Protein Purification*", Springer Verlag, N.Y. (1982). Theo cách khác, một phương pháp khác dùng để làm tăng ái lực của các kháng thể theo sáng chế được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2002-0123057 A1.

V. Protein dung hợp và thể tiếp hợp

Theo các phương án nhất định, polypeptit của kháng thể bao gồm trình tự axit amin hoặc một hoặc nhiều gốc thường không liên quan đến kháng thể. Các cải biến làm ví dụ được mô tả một cách chi tiết hơn dưới đây. Ví dụ, đoạn kháng thể Fv chuỗi đơn theo sáng chế có thể bao gồm trình tự liên kết linh hoạt, hoặc có thể được cải biến để bổ sung gốc chức năng (ví dụ, PEG, dược chất, độc tố, hoặc chất đánh dấu như chất huỳnh quang, chất phóng xạ, enzym, chất từ tính hạt nhân, kim loại nặng và các chất tương tự)

Polypeptit của kháng thể theo sáng chế có thể chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi protein dung hợp. Protein dung hợp là phân tử thể khảm mà chứa, ví dụ, miền liên kết với tau của globulin miễn dịch có ít nhất một vị trí liên kết đích, và ít nhất một phần khác nguồn gốc, tức là một phần mà nó không liên kết với một cách tự nhiên theo bản chất. Trình tự axit amin có thể tồn tại một cách bình thường trong các protein riêng biệt mà được kết hợp lại trong polypeptit dung hợp hoặc chúng có thể tồn tại một cách bình thường trong cùng một protein nhưng được đặt trong dạng sắp xếp mới trong polypeptit dung hợp. Có thể tạo ra protein dung hợp, ví dụ, theo phương pháp tổng hợp hóa học, hoặc bằng cách tạo ra và dịch mã polynucleotit mà trong đó các vùng peptit được mã hóa trong mối quan hệ mong muốn.

Thuật ngữ "khác nguồn gốc" như được áp dụng đối với polynucleotit hoặc polypeptit, có nghĩa là polynucleotit hoặc polypeptit là thu được từ một thực thể khác biệt với polynucleotit hoặc polypeptit của phần còn lại của thực thể mà nó đang được so sánh. Ví dụ, như được sử dụng trong bản mô tả này, "polypeptit khác nguồn gốc" sẽ được dung hợp với kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất tương đồng của nó là thu được từ polypeptit không phải của globulin miễn dịch

của cùng một loài, hoặc polypeptit của globulin miễn dịch hoặc polypeptit không phải của globulin miễn dịch của một loài khác.

Như được bàn luận một cách chi tiết hơn ở chỗ khác bản mô tả này, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế còn có thể được dung hợp bằng cách tái tổ hợp với polypeptit khác nguồn gốc trên đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C hoặc được tiếp hợp bằng cách hóa học (kể cả phương pháp tiếp hợp cộng hóa trị và tiếp hợp không cộng hóa trị) với polypeptit hoặc các chế phẩm khác. Ví dụ, các kháng thể có thể được dung hợp bằng cách tái tổ hợp hoặc được tiếp hợp với các phân tử hữu ích dưới dạng chất đánh dấu trong thử nghiệm phát hiện và các phân tử tác động như polypeptit khác nguồn gốc, dược chất, nuclit phóng xạ, hoặc độc tố; ví dụ, xem, các công bố đơn quốc tế số WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; patent Mỹ số 5,314,995; và đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 0 396 387.

Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể bao gồm các axit amin được nối với nhau bằng các liên kết peptit hoặc các liên kết peptit được cải biến, tức là nhóm đẳng cấu điện tử của peptit, và có thể chứa các axit amin không phải là 20 axit amin được mã hóa bởi gen. Các kháng thể có thể được cải biến bằng các quá trình tự nhiên, như quá trình xử lý sau dịch mã, hoặc theo các kỹ thuật cải biến hóa học biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cải biến này được mô tả một cách rõ ràng trong các tài liệu cơ bản và trong các chuyên khảo chi tiết hơn, cũng như trong tài liệu nghiên cứu chuyên ngành đồ sộ. Các cải biến có thể xảy ra ở chỗ bất kỳ trong kháng thể, kể cả khung chính peptit, chuỗi bên axit amin và đầu tận cùng amin hoặc đầu tận cùng carboxyl, hoặc trên các gốc như hydratcacbon. Cần phải nhận thấy rằng cùng một loại cải biến có thể có mặt ở cùng một mức độ hoặc các mức độ khác nhau ở một vài vị trí trong kháng thể nhất định. Ngoài ra, một kháng thể nhất định có thể chứa nhiều loại cải biến. Các kháng thể có có phân nhánh, ví dụ, do quá trình ubiquitin hóa, và chúng có thể là vòng, có hoặc không có phân nhánh. Kháng thể vòng, kháng thể phân nhánh và kháng thể vòng phân nhánh có thể được tạo ra từ các quá trình tự nhiên sau dịch mã hoặc có thể được tạo ra theo phương pháp tổng hợp. Các quá trình cải biến bao gồm quá trình axetyl hóa, axyl hóa, ADP-ribosyl hóa, amit hóa, gắn kết cộng hóa trị flavin, gắn kết cộng hóa trị gốc hem, gắn kết cộng hóa trị nucleotit hoặc chất dẫn xuất nucleotit, gắn

kết cộng hóa trị lipit hoặc chất dẫn xuất lipit, gắn kết cộng hóa trị phosphatiđylinositol, liên kết chéo, tạo vòng, tạo liên kết với đisulfua, demetyl hóa, tạo các liên kết chéo cộng hóa trị, tạo xystein, tạo pyroglutamat, formyl hóa, carboxyl hóa ở vị trí gama, glycosyl hóa, tạo mỏ neo GPI, hyđroxyl hóa, iot hóa, metyl hóa, myristoyl hóa, oxy hóa, PEG hóa, xử lý bằng cách phân giải protein, phosphoryl hóa, prenyl hóa, tạo chất triệt quang, selen hóa, sulfat hóa, bổ sung các axit amin vào protein qua trung gian ARN chuyển như quá trình arginin hóa và ubiquitin hóa; ví dụ, xem các tài liệu: *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 2nd. Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins,* B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983); Seifter *et al., Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 663(1992), 48-62).

Sáng chế còn đề xuất protein dung hợp chứa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó, và polypeptit khác nguồn gốc. Theo một phương án, protein dung hợp theo sáng chế chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi, polypeptit có trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng bất kỳ trong số các vùng V_H của kháng thể theo sáng chế hoặc trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng bất kỳ trong số các vùng V_L của kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn hoặc các biến thể của nó và trình tự polypeptit khác nguồn gốc. Theo một phương án khác, protein dung hợp để dùng trong phương pháp chẩn đoán và phương pháp điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này chứa, về cơ bản chứa hoặc cấu thành bởi polypeptit có trình tự axit amin của một, hai, ba V_H-CDR bất kỳ trong số các V_H-CDR của kháng thể, hoặc các đoạn, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của nó, hoặc trình tự axit amin của một, hai, ba V_L-CDR bất kỳ trong số các V_L-CDR của kháng thể, hoặc các đoạn, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của nó và trình tự polypeptit khác nguồn gốc. Theo một phương án, protein dung hợp bao gồm polypeptit có trình tự axit amin của V_H-CDR3 của kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn, chất dẫn xuất, hoặc biến thể của nó và trình tự polypeptit khác nguồn gốc, protein dung hợp này liên kết đặc hiệu với tau. Theo một phương án khác, protein dung hợp chứa polypeptit có trình tự axit amin của ít nhất một vùng V_H của kháng thể theo sáng chế và trình tự axit amin của ít nhất một vùng V_L của kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn, các dẫn xuất hoặc các biến thể của nó và trình tự polypeptit khác nguồn gốc. Theo một phương án, vùng V_H và V_L

của protein dung hợp tương ứng với một kháng thể nguồn duy nhất (hoặc đoạn scFv hoặc đoạn Fab) mà liên kết đặc hiệu với tau. Theo một phương án khác nữa, protein dung hợp để dùng trong phương pháp chẩn đoán và phương pháp điều trị bệnh được bộc lộ trong bản mô tả này chứa polypeptit có trình tự axit amin của từ một, hai, ba hoặc nhiều V_H CDR trong số các V_H CDR của kháng thể và trình tự axit amin của từ một, hai, ba hoặc nhiềuV_L CDR trong số các V_L CDR của kháng thể, hoặc các đoạn hoặc các biến thể của nó và trình tự polypeptit khác nguồn gốc. Theo một phương án, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều V_H-CDR trong số (các) V_H-CDR hoặc hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều V_L-CDR trong số (các) V_L-CDR tương ứng với một kháng thể nguồn duy nhất (hoặc đoạn scFv hoặc đoạn Fab) theo sáng chế. Các phân tử axit nucleic mã hóa các protein dung hợp này cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Các protein dung hợp làm ví dụ được thông báo trong tài liệu chuyên ngành bao gồm các dạng dung hợp của thụ thể tế bào T (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon *et al.*, *Nature* 337 (1989), 525-531; Traunecker *et al.*, *Nature* 339 (1989), 68-70; Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell Biol. USA* 9 (1990), 347-353; và Byrn *et al.*, *Nature* 344 (1990), 667-670); selectin L (thụ thể trở về chỗ cũ) (Watson *et al.*, *J. Cell. Biol.* 110 (1990), 2221-2229; và Watson *et al.*, *Nature* 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo *et al.*, *Cell* 61 (1990), 1303-1313); CD28 và B7 (Linsley *et al.*, *J. Exp. Med.* 173 (1991),721-730); CTLA-4 (Lisley *et al.*, *J. Exp. Med.* 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66 (1991), 1133-1144); thụ thể TNF (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer *et al.*, Eur. *J. Immunol.* 27 (1991), 2883-2886; và Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.* 174 (1991), 1483-1489 (1991); và thụ thể IgE a (Ridgway and Gorman, *J. Cell. Biol.* 115 (1991), *Abstract No.* 1448).

Như được bàn luận ở chỗ khác trong bản mô tả này, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể được dung hợp với các polypeptit khác nguồn gốc để làm tăng thời gian bán hủy *in vivo* của các polypeptit hoặc để sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, theo một phương án, PEG có thể được tiếp hợp với các kháng thể theo sáng chế để làm tăng thời gian bán hủy *in vivo* của chúng; ví dụ, xem các tài liệu: Leong *et al.*, *Cytokine* 16 (2001), 106-

119; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531; hoặc Weir *et al.*, *Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002), 512.

Hơn nữa, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể được dung hợp với trình tự dấu chuẩn, như peptit để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình làm sạch hoặc phát hiện chúng. Cụ thể là, các phương án, trình tự axit amin dấu chuẩn là peptit hexa-histiđin (HIS), như thẻ được bố trí trong vectơ pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), trong số các đối tượng khác, nhiều sản phẩm trong số các sản phẩm này có bán trên thị trường. Như được mô tả trong tài liệu: Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 821-824, ví dụ, hexa-histiđin tạo ra quy trình làm sạch protein dung hợp thuận tiện. Các thẻ peptit khác hữu ích để làm sạch bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thẻ "HA", thẻ này tương ứng với epitop thu được từ protein hemagglutinin của virut cúm (Wilson *et al.*, *Cell* 37 (1984), 767) và thẻ "FLAG".

Có thể tạo ra các protein dung hợp bằng cách áp dụng các phương pháp biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, xem, các patent Mỹ số 5,116,964 và 5,225,538. Vị trí chính xác mà ở đó việc dung hợp được thực hiện có thể được chọn bằng thực nghiệm để tối ưu hóa đặc tính tiết hoặc đặc tính liên kết của protein dung hợp. Sau đó, ADN mã hóa protein dung hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ dùng để biểu hiện.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng không được tiếp hợp hoặc có thể được tiếp hợp với ít nhất một trong số nhiều phân tử, ví dụ, để cải thiện các tính chất điều trị bệnh của phân tử, tạo điều kiện thuận lợi để phát hiện đích, hoặc để xử lý hình ảnh hoặc liệu pháp áp dụng cho bệnh nhân. Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể được đánh dấu hoặc được tiếp hợp trước hoặc sau khi làm sạch, nếu thực hiện việc làm sạch. Cụ thể là, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế có thể được tiếp hợp với chất dùng để điều trị bệnh, tiền dược chất, peptit, protein, enzym, virut, lipit, chất cải biến đáp ứng sinh học, dược chất, hoặc PEG.

Các thể tiếp hợp là độc tố miễn dịch bao gồm các kháng thể thông thường đã được mô tả nhiều trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các độc tố có thể được liên hợp với các kháng thể theo các kỹ thuật liên hợp thông thường hoặc độc tố miễn dịch chứa các phần độc tố protein có thể được tạo ra ở dạng protein dung hợp. Các kháng thể theo

sáng chế có thể được sử dụng theo cách tương ứng để thu được độc tố miễn dịch này. Làm sáng tỏ độc tố miễn dịch này là các loại được mô tả trong tài liệu: Byers, *Seminars cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 và tài liệu: Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần phải nhận thấy rằng cũng có thể lắp ráp các thể tiếp hợp bằng cách áp dụng rất nhiều kỹ thuật tùy thuộc vào các chất đã được chọn cần được tiếp hợp. Ví dụ, các thể tiếp hợp với biotin được tạo ra, ví dụ, bằng cách cho polypeptit liên kết với tau phản ứng với một este đã được hoạt hóa của biotin như este N-hyđroxysucxinimit biotin. Tương tự, có thể tạo ra các thể tiếp hợp với chất đánh dấu huỳnh quang với sự có mặt của tác nhân liên hợp, ví dụ, các chất được liệt kê trong bản mô tả này, hoặc bằng phản ứng với isothioxyanat, hoặc floresxein-isothioxyanat. Các thể tiếp hợp của các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế được tạo ra theo cách tương tự.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các chất dẫn xuất của chúng theo sáng chế được tiếp hợp với chất chẩn đoán hoặc chất điều trị bệnh. Các kháng thể này có thể được sử dụng nhằm mục đích chẩn đoán để, ví dụ, chứng minh sự có mặt của bệnh thần kinh, để thể hiện nguy cơ mắc bệnh thần kinh, để theo dõi sự phát triển hoặc sự tiến triển của bệnh thần kinh, tức là bệnh do tau như là một phần của quy trình thử nghiệm lâm sàng để, ví dụ, xác định tính hiệu quả của chế độ phòng và/hoặc điều trị bệnh nhất định. Có thể tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phát hiện bằng cách liên hợp kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó với một chất có thể phát hiện được. Các ví dụ về chất có thể phát hiện được bao gồm các enzym, các nhóm prostetic, các chất huỳnh quang, các chất phát quang, chất phát quang sinh học, các chất có hoạt tính phóng xạ khác nhau, các kim loại phát xạ positron bằng cách áp dụng các kỹ thuật chụp cắt lớp nhờ phát xạ positron khác nhau, và các ion kim loại thuận từ không có hoạt tính phóng xạ; ví dụ, xem, patent Mỹ số 4,741,900 để biết các ion kim loại mà có thể được tiếp hợp với các kháng thể để sử dụng làm chất chẩn đoán bệnh theo sáng chế. Các ví dụ về enzym thích hợp bao gồm oxiđazaperoxiđaza của củ cải cay, phosphataza kiềm, β-galactosiđaza, hoặc axetylcholinesteraza; các ví dụ về các phức chất nhóm prostetic thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ

về chất huỳnh quang thích hợp bao gồm umbeliferon, floresxein, floresxein isothioxyanat, rođamin, điclotriazinylamin floresxein, đansyl clorua hoặc phycoerytrin; một ví dụ về chất phát quang bao gồm luminol; các ví dụ về chất phát quang sinh học bao gồm luxiferaza, luxiferin, và aequorin; và các ví dụ về chất có hoạt tính phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In hoặc ^{99}Tc.

Kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó cũng có thể được đánh dấu theo kiểu có thể phát hiện được bằng cách liên hợp nó với hợp chất phát quang hóa học. Sau đó, xác định sự có mặt của kháng thể đã được gắn thẻ phát quang hóa học bằng cách phát hiện sự có mặt của sự phát quang xảy ra trong suốt quá trình phản ứng hóa học. Các ví dụ về các hợp chất đánh dấu phát quang hóa học đặc biệt hữu ích là luminol, isoluminol, este acriđini thơm, imiđazol, muối acriđini và este oxalat.

Một trong số các cách mà trong đó kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó có thể được đánh dấu theo kiểu có thể phát hiện được là cách liên kết chất này với enzym và bằng cách sử dụng sản phẩm đã được liên kết trong thử nghiệm miễn dịch bằng enzym (EIA) (Voller, A., "*The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*" *Microbiological Associates Quarterly Publication*, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller *et al.*, J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, *Meth. Enzymol.* 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (eds), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. *et al.*, (eds), *Enzyme Immunoassay*, Kgaku Shoin, Tokyo (1981). Tốt hơn, nếu enzym mà đã liên kết với kháng thể sẽ phản ứng với cơ chất thích hợp là cơ chất tạo sắc tố, theo cách sao cho tạo ra được gốc hóa học mà có thể phát hiện được, ví dụ, theo phương pháp quang trắc phổ, đo mức độ huỳnh quang hoặc bằng các phương tiện hiển thị. Các enzym mà có thể được sử dụng để đánh dấu kháng thể theo kiểu có thể phát hiện được bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đehydrogenaza malat, nucleaza tụ cầu khuẩn, isomeraza đelta-5-steroit, đehydrogenaza rượu của nấm men, alpha-glyxerophosphat, đehydrogenaza, isomeraza trioza phosphat, oxiđazaperoxiđaza của củ cải cay, phosphataza kiềm, asparaginaza, oxiđaza glucoza, beta-galactosiđaza, ribonucleaza, ureaza, catalaza, đehydrogenaza glucoza-6-phosphat, glucoamylaza và axetylcholinesteraza. Hơn thế nữa, có thể thực hiện việc phát hiện bằng các phương pháp so màu mà sử dụng cơ chất tạo sắc tố cho enzym. Cũng có thể thực hiện việc

phát hiện bằng cách so sánh hiển thị của mức độ phản ứng bằng enzym của cơ chất so với các chất tiêu chuẩn điều chế được theo cách tương tự.

Cũng có thể thực hiện việc phát hiện bằng cách áp dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm miễn dịch khác. Ví dụ, bằng cách đánh dấu phóng xạ kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó, có thể phát hiện kháng thể thông qua cách áp dụng thử nghiệm miễn dịch bằng phóng xạ (RIA) (ví dụ, xem tài liệu, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassys, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, (March, 1986)), mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ). Có thể phát hiện đồng vị có hoạt tính phóng xạ bằng các phương tiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, máy đếm gama, máy đếm nhấp nháy, hoặc phóng xạ tự ghi.

Kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó cũng có thể được đánh dấu theo kiểu có thể phát hiện được bằng cách sử dụng các kim loại phát huỳnh quang như ^{152}Eu, hoặc các chất khác thuộc dãy lantanoit. Các kim loại này có thể được gắn với kháng thể bằng cách sử dụng các nhóm tạo chelat với kim loại như axit đietylentriaminpentacxtic (DTPA) hoặc axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA).

Kỹ thuật tiếp hợp các gốc khác nhau với kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc chất dẫn xuất của nó thì biết rõ, ví dụ, xem tài liệu, Arnon *et al.*, "*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*", trong tài liệu: *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "*Antibodies For Drug Delivery*", trong tài liệu: *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*", trong tài liệu: *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.*(eds), pp. 475-506 (1985); "*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*", trong tài liệu: *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.*(eds), Academic Press pp. 303-16 (1985), và Thorpe *et al.*, "*The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates*", *Immunol. Rev.* 62 (1982), 119-158.

Như đã nêu, theo các phương án nhất định, có thể tiếp hợp gốc có tác dụng tăng cường tính ổn định hoặc tính hiệu quả của phân tử liên kết, ví dụ, polypeptit liên kết, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn đặc hiệu miễn dịch của nó. Ví dụ, theo một phương án, PEG có thể được tiếp hợp với các phân tử liên kết theo sáng chế để làm tăng thời gian bán hủy *in vivo* của chúng. Leong *et al.*, *Cytokine* 16 (2001), 106; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531; hoặc Weir *et al., Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002), 512.

VI. Chế phẩm và phương pháp sử dụng

Sáng chế liên quan đến chế phẩm chứa phân tử liên kết với tau nêu trên, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc chất dẫn xuất hoặc biến thể của nó, hoặc polynucleotit, vectơ hoặc tế bào theo sáng chế. Chế phẩm theo sáng chế còn có thể chứa chất mang dược dụng. Hơn thế nữa, dược phẩm theo sáng chế còn có thể chứa các chất như interleukin hoặc interferon tùy thuộc vào đường sử dụng được dự định của dược phẩm. Để sử dụng trong điều trị bệnh do tau, ví dụ, điều trị bệnh Alzheimer, có thể chọn chất bổ sung từ nhóm bao gồm phân tử hữu cơ nhỏ, kháng thể kháng tau, và các dạng kết hợp của chúng. Vì vậy, theo một phương án nhất định, sáng chế liên quan đến việc sử dụng phân tử liên kết với tau, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc việc sử dụng phân tử liên kết hầu như có cùng một số tính đặc hiệu liên kết của loại bất kỳ trong số chúng, polynucleotit, vectơ hoặc tế bào theo sáng chế để bào chế dược phẩm hoặc chế phẩm dùng để chẩn đoán cho phương pháp điều trị phòng và điều trị bệnh bệnh do tau, theo dõi sự tiến triển của bệnh do tau hoặc đáp ứng đối với phương pháp điều trị bệnh do tau ở đối tượng hoặc để xác định nguy cơ phát triển bệnh do tau của đối tượng.

Vì vậy, theo một phương án, sáng chế liên quan đến phương pháp điều trị rối loạn thần kinh đặc trưng bởi sự tích tụ và/hoặc sự lắng đọng bất thường của tau lần lượt trong não và hệ thần kinh trung ương, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng cần đến phương pháp này dùng một chất bất kỳ trong số các phân tử liên kết với tau, các kháng thể, các polynucleotit, các vectơ hoặc các tế bào được mô tả trên đây theo sáng chế với lượng để điều trị bệnh. Thuật ngữ "rối loạn thần kinh" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh do tau như bệnh Alzheimer, bệnh phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/hội chứng Parkinson–sa sút trí tuệ, bệnh sa sút trí tuệ có hạt ưa bạc, bệnh mạch máu do dạng tinh bột kiểu Anh, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột,

bệnh thoái hóa vỏ não-đáy não, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh sa sút trí tuệ do chấn động não, bệnh vôi hóa đám rối sợi thần kinh phân tán, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương có hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh viêm cơ thể vùi, bệnh teo đa hệ, bệnh loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh Niemann-Pick kiểu C, bệnh tế bào thần kinh vận động có đám rối sợi thần kinh không phải kiểu đảo Guam, bệnh Pick, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột và protein prion, chứng tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, chứng liệt trên nhân tiến triển, bệnh viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, bệnh sa sút trí tuệ chỉ do đám rối, bệnh sa sút trí tuệ do có nhiều ổ nhồi máu não và bệnh đột quỵ do thiếu máu cục bộ. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ thoái hóa thần kinh, thần kinh hoặc tâm thần-thần kinh được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

Một ưu điểm cụ thể của phương pháp điều trị bệnh theo sáng chế nằm ở chỗ các kháng thể theo sáng chế thu được từ các tế bào B hoặc các tế bào B nhớ từ đối tượng là người khỏe mạnh không có dấu hiệu của bệnh do tau và vì vậy mà, với một xác suất nhất định, có khả năng phòng bệnh do tau có biểu hiện lâm sàng, hoặc có khả năng giảm bớt nguy cơ xảy ra bệnh có biểu hiện lâm sàng, hoặc có khả năng trì hoãn sự khởi phát hoặc tiến triển của bệnh có biểu hiện lâm sàng. Thông thường, các kháng thể theo sáng chế cũng đã trải qua quá trình làm trưởng thành tế bào sinh dưỡng một cách thành công, tức là sự tối ưu hóa liên quan đến tính chọn lọc và tính hiệu quả về khả năng liên kết với ái lực cao với phân tử tau đích bằng phương tiện là thay đổi tế bào sinh dưỡng của các vùng biến đổi của kháng thể.

Sự hiểu biết rằng các tế bào như vậy *in vivo*, ví dụ, ở người, đã không được hoạt hóa nhờ các cấu trúc tế bào hoặc các protein sinh lý liên quan hoặc các cấu trúc tế bào hoặc các protein sinh lý khác về mức độ phản ứng tự miễn dịch học hoặc phản ứng dị ứng cũng có ý nghĩa lớn về y học vì điều này biểu lộ cơ hội vượt qua các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng thành công tăng lên một cách đáng kể. Có thể nói rằng, tính hiệu quả, khả năng chấp nhận và khả năng dung nạp đã được chứng minh trước quá trình phát triển tiền lâm sàng và lâm sàng của kháng thể phòng bệnh hoặc kháng thể dùng để điều trị bệnh ở ít nhất một đối tượng là người. Vì vậy, có thể kỳ vọng rằng các kháng thể kháng tau của người theo sáng chế, cả tính hiệu quả đặc hiệu với cấu trúc đích của

nó dưới dạng chất điều trị bệnh và khả năng tạo ra các tác dụng phụ giảm của nó làm tăng một cách đáng kể khả năng thành công lâm sàng của nó.

Sáng chế còn lần lượt đề xuất gói hoặc kit dược phẩm và chẩn đoán chứa một hoặc nhiều vật chứa được đổ đầy một hoặc nhiều thành phần được mô tả trên đây, ví dụ, kháng thể kháng tau, đoạn liên kết, chất dẫn xuất hoặc biến thể của nó, polynucleotit, vectơ hoặc tế bào theo sáng chế. Gắn liền với (các) vật chứa này có thể là một thông báo dưới dạng được quy định bởi cơ quan nhà nước quản lý việc tạo ra, sử dụng hoặc bán dược phẩm hoặc sản phẩm sinh học, thông báo này phản ánh sự phê duyệt của cơ quan này về việc sản xuất, sử dụng hoặc bán để dùng cho người. Ngoài ra hoặc theo cách khác, kit chứa các chất phản ứng và/hoặc các chỉ dẫn để dùng trong các thử nghiệm chẩn đoán thích hợp. Tất nhiên, chế phẩm, ví dụ, kit theo sáng chế là đặc biệt thích hợp đối với việc đánh giá nguy cơ, chẩn đoán, phòng và điều trị rối loạn mà đi kèm với sự có mặt của tau, và cụ thể là, có thể áp dụng được đối với việc điều trị bệnh Alzheimer (AD), bệnh phức hợp xơ cứng cột bên teo cơ/hội chứng Parkinson–sa sút trí tuệ (ALS-PDC), bệnh sa sút trí tuệ có hạt ưa bạc (AGD), bệnh mạch máu do dạng tinh bột kiểu Anh, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột, bệnh thoái hóa vỏ não-đáy não (CBD), bệnh Creutzfeldt-Jakob (CJD), bệnh sa sút trí tuệ do chấn động não, bệnh vôi hóa đám rối sợi thần kinh phân tán, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương có hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), bệnh thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh viêm cơ thể vùi, bệnh teo đa hệ, bệnh loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh Niemann-Pick kiểu C (NP-C), bệnh tế bào thần kinh vận động có đám rối sợi thần kinh không phải kiểu đảo Guam, bệnh Pick (PiD), hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột và protein prion, chứng tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, chứng liệt trên nhân tiến triển (PSP), bệnh viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, bệnh sa sút trí tuệ chỉ do đám rối, bệnh sa sút trí tuệ do có nhiều ổ nhồi máu não và bệnh đột quỵ do thiếu máu cục bộ.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế theo các phương pháp biết rõ trong lĩnh vực này; ví dụ, xem tài liệu: Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Các ví dụ về các chất mang dược phẩm thích hợp là biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này

và bao gồm dung dịch muối được đệm phosphat, nước, nhũ tương, như nhũ tương dầu/nhũ tương nước, các loại chất thấm ướt khác nhau, dung dịch tiệt trùng v.v.. Chế phẩm chứa các chất mang này có thể được bào chế bằng các phương pháp thông thường đã biết rõ. Có thể cho đối tượng dùng các dược phẩm này với liều thích hợp. Có thể thực hiện việc dùng chế phẩm thích hợp bằng các đường khác nhau, ví dụ, bằng cách dùng trong tĩnh mạch, trong màng bụng, dưới da, trong cơ, trong mũi, khu trú hoặc trong chân bì hoặc phân phối vào cột sống hoặc não. Các chế phẩm dạng sol khí như các chế phẩm dạng xịt mũi chứa dung dịch nước tinh khiết hoặc các dung dịch khác của hoạt chất với chất bảo quản và chất đẳng trương. Các chế phẩm như vậy được điều chỉnh đến độ pH và trạng thái đẳng trương tương hợp với niêm mạc mũi. Các chế phẩm để dùng qua đường trực tràng hoặc âm đạo có thể được thể hiện ở dạng viên thuốc đạn chứa chất mang thích hợp.

Hơn thế nữa, trong khi sáng chế bao gồm quy trình tiêu chuẩn hiện thời (mặc dù may mắn là không thường xuyên) là khoan một lỗ nhỏ ở sọ để dùng dược chất theo sáng chế, theo một khía cạnh, phân tử liên kết, đặc biệt là kháng thể hoặc dược chất trên cơ sở kháng thể theo sáng chế có thể xuyên qua hàng rào máu-não, điều này cho phép dùng qua đường tĩnh mạch hoặc qua đường miệng.

Chế độ liều lượng sẽ được xác định bởi bác sĩ tham gia điều trị bệnh và các yếu tố lâm sàng. Như biết rõ trong lĩnh vực y tế, liều lượng đối với một bệnh nhân bất kỳ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, kể cả kích cỡ của bệnh nhân, diện tích bề mặt cơ thể, độ tuổi, hợp chất cụ thể sẽ được dùng, giới tính, thời gian và đường dùng thuốc, sức khỏe tổng quát, và các dược chất khác đang được dùng đồng thời. Liều lượng thông thường có thể là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,001µg đến 1.000µg (hoặc của axit nucleic dùng để biểu hiện hoặc dùng để ức chế sự biểu hiện trong khoảng này); tuy nhiên, các liều lượng dưới hoặc trên khoảng thông thường này cũng được dự định, đặc biệt là có tính đến các yếu tố nêu trên. Nhìn chung, liều lượng có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 0,0001mg/kg đến 100mg/kg, và thông thường nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg đến 5mg/kg (ví dụ, 0,02mg/kg, 0,25mg/kg, 0,5mg/kg, 0,75mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg, v.v.), thể trọng của vật chủ. Ví dụ, liều lượng có thể là 1mg/kg thể trọng hoặc 10mg/kg thể trọng hoặc nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 10mg/kg, hoặc ít nhất 1mg/kg. Mức giữa của các liều lượng trong khoảng nêu trên cũng được dự định thuộc phạm vi của sáng chế. Có thể cho đối tượng dùng các liều lượng này hằng ngày, cách nhật, hằng tuần

hoặc theo lịch trình bất kỳ khác xác định được theo phương pháp phân tích thử nghiệm. Phương pháp điều trị bệnh làm ví dụ kéo theo cách dùng nhiều liều lượng trong một khoảng thời gian kéo dài, ví dụ, là ít nhất sáu tháng. Các chế độ điều trị bệnh làm ví dụ bổ sung kéo theo cách dùng hai tuần một lần hoặc một lần mỗi tháng hoặc 3 tháng đến 6 tháng một lần. Lịch biểu dùng liều làm ví dụ nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 10mg/kg hoặc 15mg/kg trong nhiều ngày liền tiếp, 30mg/kg cách nhật hoặc 60mg/kg hằng tuần. Trong một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu liên kết khác nhau được dùng một cách đồng thời, trong trường hợp này, liều lượng của mỗi kháng thể được dùng nằm trong các khoảng đã được chỉ ra. Có thể theo dõi sự tiến triển theo phương pháp đánh giá định kỳ. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch nước hoặc dung dịch không chứa nước vô trùng, huyền phù và nhũ tương. Các ví dụ về dung môi không chứa nước là propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu ôliu, và các este hữu cơ dùng để tiêm như etyl oleat. Các chất mang dạng nước bao gồm nước, dung dịch cồn/dung dịch nước, nhũ tương hoặc các huyền phù, kể cả dung dịch muối và môi trường được đệm. Các chất dẫn ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, đextroza Ringer, đextroza và natri clorua, dung dịch Ringer được lactat hóa, hoặc các dầu không bay hơi. Các chất dẫn dùng vào tĩnh mạch chứa chất bổ sung dịch và chất bổ sung dinh dưỡng, chất bổ sung chất điện phân (như các chất trên cơ sở đextroza Ringer) và các chất tương tự. Các chất bảo quản và các chất phụ gia khác cũng có thể có mặt như, ví dụ, chất chống vi khuẩn, chất chống oxy hóa, chất tạo chelat, và khí trơ và các chất tương tự. Hơn thế nữa, dược phẩm theo sáng chế còn có thể chứa các chất như đopamin hoặc thuốc tác động tâm thần, tùy thuộc vào việc sử dụng được dự định của dược phẩm.

Hơn thế nữa, theo một phương án nhất định của sáng chế, dược phẩm có thể được bào chế để làm vacxin, ví dụ, nếu dược phẩm theo sáng chế chứa kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết, chất dẫn xuất hoặc biến thể của nó để gây miễn dịch thụ động. Như đã được đề cập ở mục tình trạng kỹ thuật của sáng chế, loại phospho-tau đã được thông báo có trong ngoại bào trong huyết tương và CSF (Aluise *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1782 (2008), 549–558) và các nghiên cứu trong dòng chuột chuyển gen bằng cách áp dụng phương pháp chủng ngừa chủ động bằng các peptit tau được phosphoryl hóa đã cho thấy các lượng kết tụ tau trong não giảm và quá trình tiến triển

chậm lại của sự suy giảm khả năng hành vi (Sigurdsson, *J. Alzheimers Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel *et al.*, *Exp Neurol.* 224 (2010), 472-485). Do vậy, thận trọng khi kỳ vọng rằng sự gây miễn dịch thụ động bằng các kháng thể kháng tau của người và các phân tử liên kết với tau tương đương của sáng chế sẽ giúp ngăn chặn một vài tác dụng phụ có hại trong khái niệm về liệu pháp gây miễn dịch chủ động như đã được bàn luận ở mục tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Do đó, các kháng thể kháng tau này và các chất tương đương của chúng theo sáng chế là đặc biệt hữu ích làm vacxin để phòng hoặc làm thuyên giảm các bệnh do tau như AD, ALS-PDC, AGD, CBD, CJD, FTD, FTDP-17, NP-C, PiD, PSP hoặc các bệnh do tau khác như nêu trên.

Theo một phương án, có thể là có lợi nếu sử dụng các cấu trúc đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu tái tổ hợp của kháng thể theo sáng chế. Để tham chiếu, xem tài liệu: Fischer and Léger, *Pathobiology* 74 (2007), 3-14. Phân tử đặc hiệu kép này có thể được thiết kế để hướng đích đến tau bằng một nhánh liên kết và một thực thể bệnh khác như Aβ hoặc alpha-synuclein hoặc cấu hình riêng bệnh khác của tau bằng nhánh liên kết thứ hai. Theo cách khác, nhánh liên kết thứ hai có thể được thiết kế để hướng đích protein có mặt trong hàng rào máu-não để tạo điều kiện thuận lợi cho sự thâm nhập của kháng thể vào não.

Theo một phương án, có thể là có lợi nếu sử dụng đoạn Fab tái tổ hợp (rFab) và đoạn chuỗi đơn (scFv) của kháng thể theo sáng chế, mà có thể thâm nhập vào màng tế bào một cách dễ dàng hơn. Ví dụ, Robert *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* (2008) Oct 16; S1741-0134, được công bố trực tuyến trước đó, mô tả việc sử dụng đoạn Fab tái tổ hợp (rFab) thể khảm và đoạn chuỗi đơn (scFv) của kháng thể đơn dòng WO-2, kháng thể này nhận biết epitop trong vùng có đầu tận cùng N của Aβ. Các đoạn đã được tạo ra có khả năng (i) phòng hiện tượng xơ hóa dạng tinh bột, (ii) gây rã xơ Aβ1-42 đã được tạo ra từ trước và (iii) ức chế tính gây độc thần kinh do oligome Aβ1-42 gây ra *in vitro* một cách có hiệu quả như phân tử IgG nguyên. Các ưu điểm đã nhận thấy được của việc sử dụng các kiểu kháng thể đã được tạo ra trong scFv và Fab nhỏ mà thiếu chức năng tác động bao gồm sự di chuyển có hiệu quả hơn xuyên qua hàng rào máu-não và giảm đến mức tối thiểu nguy cơ gây ra các phản ứng phụ gây viêm. Hơn thế nữa, ngoài kháng thể scFv và kháng thể có một miền duy nhất giữ lại tính đặc hiệu liên kết của kháng thể có chiều dài đầy đủ, chúng có thể được biểu hiện ở dạng gen duy nhất và trong nội bào trong các tế bào của động vật có vú ở dạng kháng thể nội bào, với tiềm

năng làm thay đổi sự gấp cuộn, các tương tác, các cải biến, hoặc định vị dưới mức tế bào của các đích của chúng; tổng quan, ví dụ, xem tài liệu: Miller and Messer, *Molecular Therapy* 12 (2005), 394–401.

Trong phương pháp khác, tài liệu: Muller *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* (2005), 237-241, mô tả một nền tảng công nghệ, loại gọi là 'SuperAntibody Technology', mà được cho là giúp các kháng thể có thể di chuyển qua lại vào các tế bào sống mà không gây hại cho chúng. Các kháng thể thâm nhập vào tế bào này mở ra cánh cửa chẩn đoán và điều trị bệnh mới. Thuật ngữ 'TransMabs' đã được đặt cho các kháng thể này.

Theo một phương án khác nữa, việc dùng đồng thời hoặc dùng theo tuần tự các kháng thể khác hữu ích để điều trị bệnh do tau có thể là thích hợp. Theo một phương án, kháng thể bổ sung được đưa vào dược phẩm theo sáng chế. Các ví dụ về kháng thể mà có thể được sử dụng để điều trị bệnh cho đối tượng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể hướng đích dạng tinh bột beta, alpha-synuclein, TDP-43 và SOD-1.

Theo một phương án khác nữa, việc dùng đồng thời hoặc dùng theo tuần tự các chất bảo vệ thần kinh khác hữu ích để điều trị bệnh do tau có thể là thích hợp. Theo một phương án, chất bổ sung này được đưa vào dược phẩm theo sáng chế. Các ví dụ về các chất bảo vệ thần kinh mà có thể được sử dụng để điều trị bệnh cho đối tượng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế axetylcholinesteraza, chất đối kháng thụ thể liên quan đến glutamat, chất ức chế kinaza, chất ức chế HDAC, chất kháng viêm, đivalproex natri, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các ví dụ về các chất bảo vệ thần kinh khác mà có thể được sử dụng đồng thời với dược phẩm theo sáng chế đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, công bố đơn quốc tế số WO2007/011907. Theo một phương án, chất bổ sung này là đopamin hoặc chất chủ vận thụ thể đopamin.

Lượng hoặc liều lượng hữu hiệu để điều trị bệnh chỉ lượng của thành phần hoạt tính đủ để làm giảm các triệu chứng hoặc tình trạng bệnh lý. Tính hiệu quả của việc điều trị bệnh và độc tính của các hợp chất như vậy có thể xác định được bằng các quy trình dược tiêu chuẩn trong môi trường nuôi cấy tế bào hoặc động vật thử nghiệm, ví dụ, ED_{50} (liều lượng hữu hiệu để điều trị bệnh ở 50% quần thể) và LD_{50} (liều lượng gây chết 50% quần thể). Tỷ lệ liều lượng giữa tác dụng điều trị bệnh và tác dụng độc hại là chỉ số điều trị bệnh, và chỉ số này có thể được biểu thị ở dạng tỷ lệ, LD_{50}/ED_{50}.

Theo một phương án, chất điều trị bệnh trong chế phẩm có mặt ở lượng đủ để phục hồi hoặc giữ gìn các tính chất nhận thức và/hoặc hành vi bình thường trong trường hợp AD, ALS-PDC, AGD, CBD, CJD, FTD, FTDP-17, NP-C, PiD, PSP hoặc các bệnh do tau khác như nêu trên.

Từ phần nêu trên, thấy rõ rằng sáng chế bao gồm việc sử dụng bất kỳ của phân tử liên kết với tau bao gồm ít nhất một CDR của kháng thể được mô tả trên đây, cụ thể là, dùng để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh do tau như nêu trên, cụ thể là, bệnh Alzheimer. Theo một phương án, phân tử liên kết đã nêu là kháng thể theo sáng chế hoặc chuỗi globulin miễn dịch của nó. Hơn thế nữa, sáng chế còn liên quan đến các kháng thể kháng idiotyp của một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đã được đề cập và được mô tả trên đây. Đây là các kháng thể hoặc các phân tử liên kết khác mà liên kết với trình tự peptit kháng nguyên duy nhất nằm trong vùng biến đổi của kháng thể gần vị trí liên kết với kháng nguyên và hữu ích, ví dụ, để phát hiện các kháng thể kháng tau trong mẫu của một đối tượng.

Theo phương án khác, sáng chế liên quan đến chế phẩm dùng để chẩn đoán chứa một dạng bất kỳ trong số các phân tử liên kết với tau được mô tả trên đây, các kháng thể, các đoạn liên kết với kháng nguyên, các polynucleotit, các vectơ hoặc các tế bào theo sáng chế và tùy ý, các phương tiện thích hợp để phát hiện như các chất phản ứng thường được dùng trong các phương pháp chẩn đoán bệnh trên cơ sở axit nucleic hoặc trên cơ sở miễn dịch. Các kháng thể theo sáng chế là, ví dụ, thích hợp để sử dụng trong các thử nghiệm miễn dịch mà trong đó chúng có thể được sử dụng ở pha lỏng hoặc đã liên kết với chất mang pha rắn. Các ví dụ về thử nghiệm miễn dịch mà có thể sử dụng kháng thể theo sáng chế là thử nghiệm miễn dịch cạnh tranh và thử nghiệm miễn dịch không cạnh tranh kiểu trực tiếp hoặc gián tiếp. Các ví dụ về các thử nghiệm miễn dịch này là thử nghiệm miễn dịch bằng phóng xạ (RIA), kiểu kẹp (sandwich) (thử nghiệm đo mức người miễn dịch), đếm tế bào theo dòng chảy và thử nghiệm thấm tách Western. Các kháng nguyên và các kháng thể theo sáng chế có thể được liên kết với nhiều chất mang khác nhau và được sử dụng để phân lập các tế bào một cách đặc hiệu đã liên kết với nó. Các ví dụ về các chất mang biết rõ bao gồm thủy tinh, polystyren, polyvinyl clorua, polypropylen, polyetylen, polycacbonat, đextran, nylon, amyloza, xenluloza tự nhiên và xenluloza được cải biến, polyacrylamit, agaroza và magnetit. Bản chất của chất mang có thể là hòa tan được hoặc không hòa tan nhằm mục đích của

sáng chế. Có nhiều chất đánh dấu và phương pháp đánh dấu khác nhau mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết. Các ví dụ về các loại chất đánh dấu mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm các enzym, đồng vị phóng xạ, kim loại dạng keo, hợp chất huỳnh quang, hợp chất phát quang hóa học, và hợp chất phát quang sinh học; xem thêm các phương án được bàn luận trên đây.

Theo một phương án khác nữa, các phân tử liên kết với tau, cụ thể là, các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong phương pháp để chẩn đoán rối loạn ở cá thể bằng cách lấy mẫu dịch thể từ cá thể được thử nghiệm, mẫu này có thể là mẫu máu, mẫu bạch huyết hoặc mẫu dịch thể bất kỳ khác và cho mẫu dịch thể này tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế trong các điều kiện giúp tạo ra các phức hợp kháng thể-kháng nguyên. Sau đó, lượng của các phức hợp này xác định được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, một lượng lớn hơn một cách đáng kể so với lượng được tạo ra ở mẫu đối chứng biểu thị cá thể được thử nghiệm mắc bệnh. Theo cùng một cách, cũng có thể sử dụng kháng nguyên đặc hiệu được liên kết bởi các kháng thể theo sáng chế. Vì vậy, sáng chế liên quan đến thử nghiệm miễn dịch *in vitro* chứa phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Trong phạm vi của sáng chế, phương tiện được thiết kế một cách đặc hiệu nhằm mục đích của sáng chế được đề xuất. Ví dụ, có thể sử dụng mảng trên cơ sở kháng thể, mà, ví dụ, chứa các kháng thể hoặc các phân tử liên kết với kháng nguyên tương đương của sáng chế, kháng thể này nhận biết đặc hiệu với tau. Việc thiết kế các thử nghiệm miễn dịch vi mảng được tóm tắt trong tài liệu: Kusnezow *et al.*, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Do vậy, sáng chế còn liên quan đến các vi mảng chứa các phân tử liên kết với tau được nhận diện theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến phương pháp chẩn đoán bệnh do tau ở đối tượng, phương pháp này bao gồm việc xác định sự có mặt của tau và/hoặc tau được cải biến và/hoặc được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý trong mẫu từ đối tượng cần được chẩn đoán bằng ít nhất một kháng thể theo sáng chế, đoạn liên kết với tau của nó hoặc phân tử liên kết với tau hầu như có cùng một số tính đặc hiệu liên kết của loại bất kỳ trong số chúng, trong đó sự có mặt của tau được cải biến và/hoặc được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý chỉ báo về bệnh thoái hóa thần kinh do tau và sự tăng lượng tau được cải biến và/hoặc được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý so với lượng của dạng tau sinh lý chỉ báo về tiến triển của bệnh thoái hóa thần kinh do tau ở đối tượng này.

Đối tượng cần được chẩn đoán có thể không có triệu chứng hoặc tiền lâm sàng đối với bệnh. Theo một phương án, đối tượng đối chứng có bệnh do tau, ví dụ, AD, ALS-PDC, AGD, CBD, CJD, FTD, FTDP-17, NP-C, PiD, PSP hoặc các bệnh do tau khác như nêu trên, trong đó sự tương tự giữa lượng của tau được cải biến và/hoặc được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý và tiêu chuẩn tham chiếu thể hiện rằng đối tượng cần được chẩn đoán mắc bệnh do tau. Theo cách khác, hoặc hơn thế nữa, làm đối chứng thứ hai là đối tượng đối chứng không mắc bệnh do tau, trong đó sự khác nhau giữa lượng tau và/hoặc của tau được cải biến và/hoặc được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý và tiêu chuẩn tham chiếu thể hiện rằng đối tượng cần được chẩn đoán mắc bệnh do tau. Theo một phương án, đối tượng cần được chẩn đoán và (các) đối tượng đối chứng là cùng tuổi. Mẫu cần được phân tích có thể là dịch thể bất kỳ bị nghi là chứa tau được cải biến và/hoặc được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý, ví dụ, mẫu máu, mẫu CSF, hoặc mẫu nước tiểu.

Có thể đánh giá lượng tau và/hoặc của tau được cải biến và/hoặc được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý theo phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, phân tích tau bằng một hoặc nhiều kỹ thuật được chọn từ thấm tách Tây, kết tủa miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), thử nghiệm miễn dịch bằng phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), sàng lọc tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (fluorescent activated cell sorting - FACS), điện di trên gel không gian hai chiều, phổ khối (mass spectroscopy - MS), giải hấp/ion hóa bằng cách chiếu laze có sự trợ giúp của cơ chất-thời gian bay-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of light - MALDI-TOF), ion hóa giải hấp bằng cách chiếu laze tăng cường bề mặt-thời gian bay (surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight - SELDI-TOF), sắc ký lỏng hiệu suất cao (high performance liquid chromatography-HPLC), sắc ký lỏng protein nhanh (fast protein liquid chromatography - FPLC), sắc ký lỏng (liquid chromatography - LC) không gian đa chiều, sau đó đo phổ khối đồng thời (tandem mass spectrometry - MS/MS) và đo mật độ bằng laze. Theo một phương án, phương pháp xử lý hình ảnh *in vivo* đã nêu của tau bao gồm việc chụp cắt lớp nhờ phát xạ positron (positron emission tomography - PET), chụp cắt lớp nhờ phát xạ photon đơn (single photon emission tomography - SPECT), xử lý hình ảnh quang học nhờ ánh sáng cận hồng ngoại (near

infrared - NIR) hoặc xử lý hình ảnh bằng cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging - MRI).

Các phương pháp chẩn đoán bệnh do tau như bệnh Alzheimer, theo dõi sự tiến triển của bệnh do tau, và theo dõi quá trình điều trị bệnh do tau bằng cách sử dụng các kháng thể và các phương tiện có liên quan mà có thể được làm thích ứng theo sáng chế cũng đã được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO93/08302, WO94/13795, WO95/17429, WO96/04309, WO2002/062851 và WO2004/016655. Tương tự, các phương pháp phát hiện trên cơ sở kháng thể đối với tau được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2005/080986, nội dung bộc lộ của tất cả các bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Có thể áp dụng các phương pháp đó như được mô tả nhưng với kháng thể đặc hiệu với tau, đoạn liên kết, chất dẫn xuất hoặc biến thể theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế còn liên quan đến peptit có epitop của tau được nhận biết đặc hiệu bởi kháng thể bất kỳ theo sáng chế. Theo một phương án, peptit này chứa, cấu thành bởi hoặc về cơ bản cấu thành bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: các gốc 125 đến 131, 397 đến 441, 226 đến 244, 217 đến 227, 37 đến 55, 387 đến 406, 421 đến 427, 427 đến 439, 1 đến 158, 197 đến 207, 57 đến 67, 355 đến 441, 313 đến 319, 309 đến 319, 221 đến 231 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6, và dạng kết hợp bất kỳ của chúng, và trình tự được cải biến của chúng mà trong đó một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc nhiều axit amin được thế, được xóa bỏ và/hoặc thêm vào, trong đó peptit này được nhận biết bởi kháng thể bất kỳ theo sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, có thể sử dụng peptit này để chẩn đoán bệnh thoái hóa thần kinh do tau ở đối tượng, bao gồm bước xác định sự có mặt của kháng thể có tác dụng liên kết với peptit trong mẫu sinh học của đối tượng này, và để chẩn đoán bệnh do tau ở đối tượng này bằng cách đo các lượng của các kháng thể mà nhận biết peptit được mô tả trên đây theo sáng chế và so sánh các lượng này với lượng phát hiện được ở các đối tượng khỏe mạnh có cùng giới tính và độ tuổi. Một lượng lớn được đo của các kháng thể đặc hiệu với peptit theo sáng chế sẽ là chỉ báo bệnh do tau ở đối tượng đã nêu. Có thể bào chế peptit theo sáng chế lần lượt thành mảng, kit và chế phẩm, như được mô tả trên đây.

Sáng chế theo các phương án này và các phương án khác được bộc lộ và nằm trong phần mô tả và các ví dụ thực hiện sáng chế. Tài liệu chuyên ngành khác nữa liên quan đến phần bất kỳ trong số các chất, phương pháp, việc sử dụng và hợp chất được sử dụng theo sáng chế có thể được truy tìm từ các thư viện và cơ sở dữ liệu công cộng, bằng cách sử dụng, ví dụ, thiết bị điện tử. Ví dụ, có thể sử dụng cơ sở dữ liệu công cộng "Medline", cơ sở này được thuê lưu giữ tại Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc Gia Mỹ và/hoặc Thư viện Y học Quốc Gia Mỹ ở Viện Y Tế Quốc Gia Mỹ. Các cơ sở dữ liệu và địa chỉ mạng khác nữa, như các loại của Viện Tin Sinh học châu Âu (European Bioinformatics Institute - EBI), đây là một phần của Phòng thử nghiệm Sinh học Phân tử châu Âu (European Molecular Biology Laboratoroy - EMBL) người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết và cũng có thể nhận được bằng cách sử dụng các bộ máy tìm kiếm trên mạng. Tổng quan về thông tin sáng chế trong lĩnh vực công nghệ sinh học và việc tra cứu các nguồn thông tin sáng chế thích hợp hữu ích đối với phương pháp tìm kiếm hồi cứu và tạo ra kiến thức hiện thời được đưa ra trong tài liệu: Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Phần bộc lộ trên đây mô tả tổng quát sáng chế. Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ như được sử dụng trong bản mô tả này là theo định nghĩa như được đưa ra trong *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, 1997, cải biên năm 2000 và in lại năm 2003, ISBN 0 19 850673 2. Một vài tài liệu được trích dẫn trong toàn bộ bản mô tả này. Có thể tìm thấy các phần trích dẫn theo thư mục đầy đủ trong phần cuối của bản mô tả này ngay trước phần yêu cầu bảo hộ. Các nội dung của tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn (kể cả các tài liệu viện dẫn chuyên ngành, patent đã được cấp, các đơn yêu cầu cấp patent đã được công bố như được trích dẫn trong toàn bộ bản mô tả này và các phần chỉ dẫn, mô tả tính năng kỹ thuật của nhà sản xuất, v.v.) rõ ràng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ; tuy nhiên, không thừa nhận rằng tài liệu được trích dẫn bất kỳ thực sự là giải pháp kỹ thuật hiện có đối với sáng chế.

Có thể có được một sự hiểu biết đầy đủ hơn nhờ việc dựa vào các ví dụ cụ thể dưới đây, các ví dụ này được đưa ra trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích minh họa và không có ý định giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ nêu dưới đây minh họa thêm sáng chế, nhưng không nên hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các thử nghiệm trong các ví dụ dưới đây được minh họa và được mô tả liên quan đến các kháng thể NI-105.4E4, NI-105.24B2 và NI-105.4A3 được tách dòng, tức là các vùng biến đổi của Ig khung 1 (FR1) mà không được điều chỉnh theo các trình tự của dòng mầm (Germ Line - GL) của vùng biến đổi của chuỗi nặng và của chuỗi nhẹ của người; xem hình 1.

Nguyên vật liệu và phương pháp

Phần mô tả chi tiết về các phương pháp thông thường, như các phương pháp dùng trong bản mô tả này có thể được tìm thấy trong tài liệu chuyên ngành được trích dẫn; xem thêm "*The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*", ấn bản thứ 17, được hiệu đính bởi Beers và Berkow, (Merck & Co., Inc. 2003) và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2012/0087861, nội dung của bản mô tả này được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Việc thực hiện sáng chế sẽ áp dụng, trừ khi có quy định khác, các kỹ thuật thông thường của lĩnh vực sinh học tế bào, nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử, sinh học chuyển gen, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp, và miễn dịch học, các phương pháp này nằm trong phạm vi kỹ năng của lĩnh vực kỹ thuật này. Để triển khai chi tiết hơn các kỹ thuật chung hữu ích trong việc thực hiện sáng chế, nhà thực hành chuyên môn có thể tham khảo các sách giáo khoa và khảo cứu tiêu chuẩn trong lĩnh vực sinh học tế bào và nuôi cấy mô; xem thêm các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Có thể tìm thấy các phương pháp tổng quát trong lĩnh vực hóa sinh học phân tử và hóa sinh học tế bào trong các sách giáo khoa tiêu chuẩn như *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. Ed. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001); *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Ed. (Ausubel *et al.* Ed.,, John Wiley & Sons 1999); *DNA Cloning*, Volumes I và II (Glover Ed.,, 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (Gait Ed.,, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames and Higgins Ed., 1984); *Transcription and Translation* (Hames and Higgins Ed., 1984); *Culture of Animal Cells* (Freshney and Alan, Liss, Inc., 1987); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller and Calos, Ed.,); *Current Protocols in Molecular Biology*

and Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Ed. (Ausubel *et al.*, Ed.,); và *Recombinant DNA Methodology* (Wu, Ed.,, Academic Press). *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller and Calos, Ed.,, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu *et al.*, Ed.,); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); luận án, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, Ed.,, Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (Weir and Blackwell, Ed.,, 1986). *Protein Methods* (Bollag *et al.*, John Wiley & Sons 1996); *Non-Viral Vectors for Gene Therapy* (Wagner *et al.* Ed.,, Academic Press 1999); *Viral Vectors* (Kaplitt & Loewy Ed.,, Academic Press 1995); *Immunology Methods Manual* (Lefkovits Ed.,, Academic Press 1997); và *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Các chất phản ứng, vectơ tách dòng và kit dùng để tạo ra gen nêu trong bản mô tả sáng chế mua được từ các nhà cung cấp thương mại như BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, và ClonTech. Các kỹ thuật chung trong việc nuôi cấy tế bào và thu gom môi trường được tóm lược trong tài liệu: *Large Scale Mammalian Cell Culture* (Hu *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997), 148); *Serum-free Media* (Kitano, *Biotechnology* 17 (1991), 73); *Large Scale Mammalian Cell Culture* (*Curr. Opin. Biotechnol.* 2 (1991), 375); và *Suspension Culture of Mammalian Cells* (Birch *et al.*, *Bioprocess Technol.* 19 (1990), 251); *Extracting information from cDNA arrays*, Herzel *et al.*, CHAOS 11 (2001), 98-107.

Phương pháp nhận diện tế bào B đặc hiệu với tau và việc tách dòng các kháng thể tương ứng

Trừ khi có quy định khác dưới đây, việc nhận diện các tế bào B đặc hiệu với tau và việc tách dòng phân tử các kháng thể kháng tau thể hiện tính đặc hiệu đáng được quan tâm cũng như sự biểu hiện tái tổ hợp của chúng và việc xác định đặc điểm chức năng đã được hoặc thường có thể được thực hiện như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế và phần Các phương pháp Bổ sung của đơn quốc tế số PCT/EP2008/000053 được công bố với số WO2008/081008, nội dung bộc lộ của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Xem thêm công bố đơn yêu cầu

cấp patent Mỹ số 2012/0087861, nội dung của bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Một phương pháp mới dùng để nhận diện các tế bào B đặc hiệu với tau và việc tách dòng phân tử các kháng thể tau thể hiện tính đặc hiệu đáng được quan tâm cũng như sự biểu hiện tái tổ hợp của chúng và việc xác định đặc điểm chức năng được đề xuất trong phạm vi của sáng chế này. Như được mô tả trên đây, theo một phương án của sáng chế, các sản phẩm nuôi cấy của tế bào B duy nhất hoặc tế bào B ít dòng được nuôi cấy và dịch nổi trên bề mặt của sản phẩm nuôi cấy, mà chứa các kháng thể đã được tạo ra bằng các tế bào B đã nêu được sàng lọc để phát hiện sự có mặt và ái lực của các kháng thể kháng tau mới trong đó. Quy trình sàng lọc bao gồm các bước của thử nghiệm về khả năng phản ứng miễn dịch đối với mảng dạng tinh bột trong mô (TAPIR) nhạy như được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO2004/095031, nội dung bộc lộ của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ, và được thể hiện trên hình 3; việc sàng lọc đối với các chiết phẩm từ não để phát hiện khả năng liên kết với PHFTau như được mô tả trong ví dụ 2; sàng lọc để phát hiện khả năng liên kết của peptit thu được từ tau có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 với các nhóm phosphat trên các axit amin Ser-202 và Ser-205; trên axit amin Thr-231; và/hoặc trên các axit amin Ser-396 và Ser-404 của trình tự đã nêu như được mô tả theo cách tương tự trong ví dụ 3 với các peptit không được phosphoryl hóa nhờ các thử nghiệm xác nhận epitop đối với kháng thể NI-105.4E4; sàng lọc để phát hiện khả năng liên kết của tau có chiều dài đầy đủ của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 và phân lập kháng thể mà nhờ đó, khả năng liên kết được phát hiện hoặc tế bào tạo ra kháng thể này như được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO2008/081008 và như được mô tả trong ví dụ 1.

Làm sạch kháng nguyên

Tau40 tái tổ hợp của người đã được mua từ rPeptide (Bogart, GA, Mỹ). PHFTau chiết được ra từ não của người mắc bệnh AD.

Việc phân lập các sợi xoắn ghép cặp chứa các sợi tau được phosphoryl hóa do nguyên nhân bệnh lý (PHFTau) được thực hiện theo phương pháp của Goedert và các đồng tác giả (Goedert *et al.*, *Neuron* 8 (1992), 159-168) có các cải biến. Một gam mô não của người mắc bệnh AD được cắt thành miếng 5mm trên đó tất cả các mạch máu nhìn thấy được đã được loại bỏ. Mô này được rửa bằng 40ml dung dịch rửa được làm

lạnh (100mM Tris, độ pH = 7,4, 6mM EGTA, 1mM Na_3VO_4 và 1mM NaF) ba lần, sau đó quy trình làm đồng nhất bằng 20ml dung dịch đệm phân giải (10mM Tris, độ pH = 7,4, 0,8M NaCl, 1mM EGTA, 1 x hỗn hợp chất ức chế proteaza, 1mM Na_3VO_4, 1mM NaF, 1mM AEBSF, 10% sucroza sucroza). Sản phẩm đồng nhất được ly tâm ở 4°C ở tốc độ 20.000xg (200.000m/giây) trong 20 phút. Dịch nổi trên bề mặt được thu gom trong khi bổ sung N-lauroyl sarcosinat (Sigma, Thụy Sĩ) đến 1% (trọng lượng/thể tích). Sau hai giờ ủ ở 37°C trong khi vẫn lắc, dịch nổi trên bề mặt lúc này được ly tâm ở 4°C ở tốc độ 100.000xg (100.000m/giây) trong một giờ. Phần kết viên được thu gom và được tạo huyền phù lại trong PBS. Sau khi làm sạch các globulin miễn dịch ô tạp có thể có bằng hạt từ tính protein A, huyền phù PHFTau được bảo quản ở -80°C trước khi sử dụng. Chiết phẩm đối chứng từ mô não của người đối chứng khỏe mạnh được chuẩn bị một cách tương ứng.

Sàng lọc kháng thể tau của người

ELISA:

Các vi đĩa 96 giếng (Corning) được phủ nửa diện tích bằng protein tau tái tổ hợp (rPeptide, Bogart, Mỹ) ở nồng độ tiêu chuẩn là 1µg/ml trong dung dịch đệm phủ cacbonat ELISA (độ pH = 9,6) qua đêm ở 4°C. Đối với việc sàng lọc PHFTau, các vi đĩa Immobilizer MicroPlate loại 96 giếng (Nunc, Đan Mạch) được phủ bằng PHFTau chiết được từ não của người mắc bệnh AD của người ở mức pha loãng 1:100 trong dung dịch đệm phủ cacbonat ELISA (độ pH = 9,6) qua đêm ở 4°C. Các đĩa này được rửa trong PBS-T độ pH = 7,6 và các vị trí liên kết không đặc hiệu được phong bế trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng PBS-T chứa 2% BSA (Sigma, Buchs, Thụy Sĩ). Môi trường nuôi cấy trước tế bào B được chuyển từ các đĩa nuôi cấy tế bào B nhớ sang các đĩa ELISA và được ủ trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa ELISA được rửa trong PBS-T và sau đó, được ủ với các kháng thể đa dòng IgG của lừa kháng kháng thể của người (đặc hiệu với đoạn Fcγ) được tiếp hợp với oxiđazaperoxiđaza của củ cải ngựa (horse radish peroxidase - HRP) (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Vương Quốc Anh). Sau khi rửa bằng PBS-T, khả năng liên kết của các kháng thể của người xác định được bằng phép đo hoạt tính HRP trong thử nghiệm so màu tiêu chuẩn.

Sàng lọc vi đĩa MULTI-ARRAY®

Các đĩa MULTI-SPOT 96 giếng 10 chấm tiêu chuẩn (Meso Scale Discovery, Mỹ) được phủ bằng rTau 30µg/ml (rPeptide), chiết phẩm từ não có PHFTau và chiết phẩm từ não của đối chứng khỏe mạnh trong PBS. Các vị trí liên kết không đặc hiệu được phong bế trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng PBS-T chứa 3% BSA, sau đó ủ với môi trường nuôi cấy trước tế bào B trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa này được rửa trong PBS-T và sau đó, được ủ với kháng thể đa dòng kháng kháng thể của người được tiếp hợp với SULFO-Tag (Meso Scale Discovery, Mỹ). Sau khi rửa bằng PBS-T, kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng phép đo mức độ phát quang điện hóa học bằng cách sử dụng SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Mỹ).

Tách dòng phân tử của các kháng thể tau

Các mẫu chứa các tế bào B nhớ thu được từ đối tượng là người khỏe mạnh. Thu hoạch các tế bào B sống của sản phẩm nuôi cấy tế bào B nhớ được chọn và tạo ra ARN thông tin. Sau đó, các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thu được bằng cách áp dụng phương pháp PCR làm tổ.

Hỗn hợp gồm các đoạn mồi là đại diện cho tất cả các họ trình tự của kho dòng mầm globulin miễn dịch của người được sử dụng đối với các lần khuếch đại các peptit dẫn đầu, đoạn V và đoạn J. Việc khuếch đại vòng thứ nhất được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi đặc hiệu với peptit dẫn đầu ở đầu tận cùng 5' và đoạn mồi đặc hiệu với vùng hằng định ở đầu tận cùng 3' (Smith *et al.*, *Nat Protoc.* 4 (2009), 372-384). Đối với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kapa, việc khuếch đại vòng thứ hai được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi đặc hiệu với đoạn V ở đầu tận cùng 5' và đoạn mồi đặc hiệu với đoạn J ở đầu tận cùng 3'. Đối với chuỗi nhẹ lamđa, việc khuếch đại vòng thứ hai được thực hiện bằng cách sử dụng đoạn mồi đặc hiệu với đoạn V ở đầu tận cùng 5' và đoạn mồi đặc hiệu với vùng C ở đầu tận cùng 3' (Marks *et al.*, *Mol. Biol.* 222 (1991), 581-597; de Haard *et al.*, *J. Biol. Chem.* 26 (1999), 18218-18230).

Việc nhận diện dòng của kháng thể có độ đặc hiệu mong muốn được thực hiện bằng cách sàng lọc lại trên ELISA khi biểu hiện tái tổ hợp các kháng thể hoàn chỉnh. Sự biểu hiện tái tổ hợp kháng thể IgG1 hoàn chỉnh của người hoặc kháng thể IgG2a thể khảm đạt được sau khi chèn các trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ "trong khung đọc chính xác" vào các vectơ biểu hiện mà bổ trợ cho trình tự của vùng biến đổi với trình tự mã hóa peptit dẫn đầu ở đầu tận cùng 5' và ở đầu tận cùng

3' với trình tự mã hóa (các) miền ổn định thích hợp. Nhằm mục đích đó, các đoạn mồi chứa các vị trí giới hạn được thiết kế để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách dòng các trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ vào vectơ biểu hiện kháng thể. Globulin miễn dịch của chuỗi nặng được biểu hiện bằng cách chèn sản phẩm RT-PCR của chuỗi nặng của globulin miễn dịch trong khung vào vectơ biểu hiện chuỗi nặng mang peptit tín hiệu và các miền ổn định của globulin miễn dịch gama 1 của người hoặc globulin miễn dịch gama 2a của chuột. Globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ kapa được biểu hiện bằng cách chèn sản phẩm RT-PCR của chuỗi nhẹ kapa trong khung vào vectơ biểu hiện chuỗi nhẹ tạo ra peptit tín hiệu và miền ổn định của globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ kapa của người. Globulin miễn dịch chuỗi nhẹ lamđa được biểu hiện bằng cách chèn sản phẩm RT-PCR chuỗi nhẹ lamđa trong khung vào vectơ biểu hiện chuỗi nhẹ lamđa tạo ra peptit tín hiệu và miền ổn định của globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ lamđa của người hoặc của chuột.

Các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp chức năng thu được sau khi đồng chuyển nhiễm vào tế bào HEK293 hoặc tế bào CHO (hoặc dòng tế bào nhận thích hợp bất kỳ khác thu được từ người hoặc chuột) của vectơ biểu hiện chuỗi nặng của Ig và vectơ biểu hiện chuỗi nhẹ kapa hoặc lamđa của Ig. Tiếp theo, kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người được làm sạch khỏi môi trường có điều kiện nuôi cấy trước bằng cách áp dụng phương pháp làm sạch cột protein tiêu chuẩn. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người có thể được tạo ra với số lượng không hạn chế bằng cách sử dụng các tế bào đã được chuyển nhiễm một cách tạm thời hoặc ổn định. Dòng tế bào tạo ra kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người có thể được xác lập bằng cách sử dụng các vectơ biểu hiện Ig một cách trực tiếp hoặc bằng cách tái tách dòng các vùng biến đổi của Ig vào các vectơ biểu hiện khác nhau. Cũng có thể tạo ra các chất dẫn xuất như F(ab), $F(ab)_2$ và scFv từ các vùng biến đổi của Ig này.

Kháng thể

Kháng thể tau đơn dòng của chuột kháng kháng thể của người Tau12 (Covance, California, Mỹ) và kháng thể tau đơn dòng của chuột AT180 (Thermo Scientific, Mỹ) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các kháng thể tau tái tổ hợp của người NI-105.4E4, NI-105.24B2 và NI-105.4A3 được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2012/0087861, nội dung của tài liệu này được đưa vào đây hoàn toàn

bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các kháng thể tau tái tổ hợp của người NI-105.17C1, NI-105.17C1(N31Q), NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, và NI-105.9C4 là các kháng thể theo sáng chế. Chúng được biểu hiện trong tế bào HEK293 hoặc tế bào CHO, được làm sạch khỏi môi trường có điều kiện nuôi cấy trước và được sử dụng một cách trực tiếp trong các ứng dụng tiếp theo trừ khi có quy định khác.

ELISA trực tiếp (direct ELISA)

Các vi đĩa loại 96 giếng (Costar, Corning, Mỹ) được phủ bằng protein tau tái tổ hợp (hTau40, rPeptide, Bogart, Mỹ) được pha loãng đến nồng độ 1µg/ml trong dung dịch đệm phủ cacbonat ELISA (50mM, độ pH = 9,6) ở 4°C qua đêm. Các vị trí liên kết không đặc hiệu được phong bế trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng PBS chứa 2% BSA (Sigma, Buchs, Thụy Sĩ) và Tween20 0,5%. Khả năng liên kết của các kháng thể của người theo sáng chế xác định được bằng cách sử dụng Fcγ IgG của dê kháng kháng thể của người được tiếp hợp với HRP (Jackson immunoResearch, Newmarket, Vương Quốc Anh), sau đó đo hoạt tính HRP trong thử nghiệm so màu tiêu chuẩn. Trị số EC_{50} được ước tính theo phương pháp hồi quy không tuyến tính có sử dụng phần mềm GraphPad Prism (San Diego, Mỹ).

Nhuộm protein theo phương pháp thẩm tách Western

PHFTau và hTau40 tái tổ hợp được phân giải bằng SDS-PAGE gradien (NuPAGE 4-12%; Invitrogen, Basel, Thụy Sĩ), sau đó thẩm tách bằng điện trên màng nitroxenluloza. Sau khi phong bế sự liên kết không đặc hiệu bằng 2% BSA ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ, các phần thẩm tách được ủ qua đêm với các kháng thể kháng tau sơ cấp của người hoặc Tau12 (kháng thể đơn dòng của chuột, Covance, California, Mỹ), sau đó Fcγ IgG của dê kháng kháng thể của người được tiếp hợp với HRP (đối với các kháng thể sơ cấp của người) hoặc kháng thể thứ cấp IgG của dê kháng kháng thể của chuột được tiếp hợp với HRP.

Các phần thẩm tách được phát triển bằng cách áp dụng phương pháp phát hiện ECL và ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Thụy Sĩ).

Chiết PHFTau ra khỏi não của người mắc bệnh AD

Việc phân lập các sợi xoắn ghép cặp chứa các sợi tau được phosphoryl hóa do nguyên nhân bệnh lý (PHFTau) được thực hiện theo phương pháp của Goedert và các đồng tác giả (Goedert *et al.*, *Neuron* 8 (1992), 159-168) có các cải biến. Một gam của mô não của người mắc bệnh AD được cắt thành miếng 5mm, trên đó tất cả các mạch máu nhìn thấy được đã được loại bỏ. Mô được rửa bằng 40ml dung dịch rửa được làm lạnh (100mM Tris, độ pH = 7,4, 6mM EGTA, 1mM Na_3VO_4 và 1mM NaF) trong ba lần, sau đó quy trình làm tương đồng bằng 20ml dung dịch đệm phân giải (10mM Tris độ pH = 7,4, 0,8M NaCl, 1mM EGTA, 1 x hỗn hợp chất ức chế proteaza, 1mM Na_3VO_4, 1mM NaF, 1mM AEBSF, 10% sucroza). Sản phẩm đồng nhất được ly tâm ở 4°C ở 20.000xg trong thời gian 20 phút. Dịch nổi trên bề mặt được thu gom trong khi bổ sung N-lauroyl sarcosinat (Sigma, Thụy Sĩ) đến 1% (trọng lượng/thể tích). Sau hai giờ ủ ở 37°C trong khi vẫn lắc, dịch nổi trên bề mặt lúc này được ly tâm ở 4°C ở 100.000xg trong thời gian một giờ. Phần kết viên được thu gom và được tạo huyền phù lại trong PBS. Sau khi làm sạch các globulin miễn dịch ô tạp có thể có bằng hạt từ tính protein A, huyền phù PHFTau được bảo quản ở -80°C trước khi sử dụng. Chiết phẩm đối chứng từ mô não của người đối chứng khỏe mạnh được chuẩn bị một cách tương ứng.

Tổng hợp peptit tau

Peptit tương ứng với các axit amin 333 đến 346 của hTau40 ($_{333}$GGGQVEVKSEKLDF$_{346}$) mà chứa epitop của NI-105.4E4 được nhận diện theo phương pháp lập bản đồ Pepspot (các axit amin 337 đến 343) được tổng hợp bằng Schafer-N (Copenhagen, Đan Mạch). Xystein bổ sung được bổ sung vào đầu tận cùng C để cho phép tạo ra liên kết cộng hóa trị với vi đĩa Immobilizer Microplate (Nunc, Đan Mạch). Peptit thứ hai tương ứng với các axit amin 226 đến 239 của tau của người ($_{226}$VAVVRpTPPKSPSSA$_{239}$), epitop cùng nguồn gốc của kháng thể tau đơn dòng của chuột có bán trên thị trường AT180 (Thermo Scientific, Mỹ) được tổng hợp một cách tương ứng và được sử dụng làm đối chứng.

Chuột chuyển gen

Ba mô hình động vật khác nhau dùng cho các bệnh do tau được sử dụng để xác nhận các kháng thể tau (và các phân tử có tính đặc hiệu liên kết của chúng) theo sáng chế.

1. Chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra chuyển gen (dòng 183): biểu hiện tau 40 của người có đột biến P301L dưới trình tự khởi đầu Thy1.2 của chuột (việc tạo ra các động vật chuyển gen này được mô tả trong tài liệu: Götz et *al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 529-534 và trong công bố đơn quốc tế WO 2003/017918, nội dung của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ)

2. Chuột JNPL3 biểu hiện dạng đồng chức năng của tau 4R ngắn nhất của người có đột biến P301L dưới trình tự khởi đầu PrP của chuột (mua được từ Taconic, Hudson, NY, Mỹ).

3. Chuột P301STau (dòng PS19) biểu hiện tau của người có đột biến P301S dưới trình tự khởi đầu PrP của chuột (mua được từ Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, Mỹ).

Mô hình chuột có các bệnh do tau và chuột hoang tương ứng được giữ trong các điều kiện nhốt tiêu chuẩn theo chu kỳ sáng/tối là 12 giờ:12 giờ nghịch đảo được tự do tiếp cận với thức ăn và nước. Các nhóm điều trị được cân đối về độ tuổi và giới tính.

Ví dụ 1

Xác nhận đích và tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể tau của người

Để xác nhận tau làm đích được nhận biết của các kháng thể phân lập được, thử nghiệm ELISA trực tiếp được thực hiện như được mô tả trên đây. Đối với kháng thể NI-105.4A3 tái tổ hợp làm ví dụ của người, các vi đĩa loại 96 giếng (Costar, Corning, Mỹ) được phủ bằng tau tái tổ hợp của người (hTau40, rPeptide, Bogart, Mỹ) được pha loãng đến nồng độ 3µg/ml hoặc bằng BSA trong dung dịch đệm phủ cacbonat ELISA (độ pH = 9,6) và tính hiệu quả liên kết của kháng thể này được thử nghiệm. Kháng thể NI-105.4A3 làm ví dụ đã liên kết đặc hiệu với tau của người theo phương pháp ELISA. Không quan sát thấy sự liên kết nào với BSA.

Để xác định nồng độ hữu hiệu một nửa mức tối đa (EC_{50}) của các kháng thể làm ví dụ NI-105.4E4 và NI-105.24B2 bổ sung, các thử nghiệm ELISA trực tiếp với các nồng độ kháng thể khác nhau được thực hiện. Các vi đĩa có 96 giếng (Costar, Corning,

Mỹ) được phủ bằng tau tái tổ hợp của người (hTau40, rPeptide, Bogart, Mỹ) được pha loãng đến nồng độ 1µg/ml (đối với thử nghiệm bằng kháng thể NI-105.4E4), hoặc là 3µg/ml (đối với thử nghiệm bằng kháng thể NI-105.24B2) trong dung dịch đệm phủ cacbonat ELISA và tính hiệu quả liên kết của kháng thể này được thử nghiệm. Trị số EC_{50} được ước tính theo phương pháp hồi quy không tuyến tính có sử dụng phần mềm GraphPad Prism. Kháng thể NI-105.4E4 thu được từ kháng thể tái tổ hợp của người đã liên kết với hTau40 với ái lực cao trong khoảng nanomol thấp ở EC_{50} 2,4nM. NI-105.24B2 đã liên kết với hTau40 với ái lực cao trong khoảng nanomol thấp ở EC_{50} 6,6nM.

Nồng độ hữu hiệu một nửa mức tối đa (EC_{50}) của kháng thể NI-105.4A3 làm ví dụ cũng xác định được bằng cách áp dụng các thử nghiệm ELISA trực tiếp. Các đĩa ELISA được phủ bằng tau tái tổ hợp của người (hTau40, 1ug/ml), PHFTau (1:100) và chế phẩm đối chứng (1:100), và được ủ với các nồng độ kháng thể khác nhau. NI-105.4A3 đã liên kết với rTau với ái lực cao trong khoảng nanomol thấp ở EC_{50} 1,4nM. NI-105.4A3 liên kết với PHFTau với ái lực cao trong khoảng nanomol thấp ở EC_{50} 1,2nM.

Ví dụ 2

Phân tích khả năng liên kết của các kháng thể tái tổ hợp của người với tau tái tổ hợp và tau gây bệnh chiết được từ não của người mắc bệnh AD

Để xác định khả năng liên kết của NI-105.4E4 và NI-105.24B2 với loại tau gây bệnh chiết được từ não của người mắc bệnh AD. Phương pháp SDS-PAGE và phân tích bằng thẩm tách Western được thực hiện như được mô tả một cách chi tiết trên đây. Các phần thẩm tách được ủ qua đêm với các kháng thể sơ cấp NI-105.4E4 (của người), NI-105.24B2 (của người) hoặc Tau12 (kháng thể đơn dòng của chuột, Covance, California, Mỹ), sau đó Fcγ IgG của dê kháng kháng thể của người được tiếp hợp với HRP (đối với các kháng thể của người) hoặc kháng thể thứ cấp IgG của dê kháng kháng thể của chuột được tiếp hợp với HRP.

Các kháng thể tái tổ hợp NI-105.4E4 và NI-105.24B2 đã nhận biết hTau40 tái tổ hợp cũng như PHFTau được cải biến do nguyên nhân bệnh lý chiết được từ não của

người mắc bệnh AD ở phép thẩm tách Western. Kháng thể đối chứng Tau12 cũng đã nhận biết cả hai loại tau.

Ngoài ra, như được bàn luận trong ví dụ 1 nêu trên, nồng độ hữu hiệu một nửa mức tối đa (EC_{50}) của kháng thể NI-105.4A3 làm ví dụ được xác định trong các thử nghiệm ELISA trực tiếp bằng cách sử dụng PHFTau. NI-105.4A3 đã liên kết với PHFTau với ái lực cao trong khoảng nanomol thấp ở EC_{50} 1,2nM.

Ví dụ 3

Lập bản đồ NI-105.4E4 và NI-105.4A3 liên kết với epitop trên hTau40

Một mảng peptit chứa 118 trình tự peptit che hTau40 có chiều dài đầy đủ (các axit amin 1 đến 441) với mức chồng lấn là 11 axit amin giữa hai peptit liền kề được chấm lên màng nitroxenluloza (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Đức). Việc đánh dấu miễn dịch các kháng thể cũng như tái tạo màng được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để loại trừ sự liên kết không đặc hiệu của kháng thể phát hiện, trước tiên, màng được dò bằng IgG của dê kháng kháng thể của người được tiếp hợp với HRP lược bỏ kháng thể sơ cấp. Sau khi tái tạo, màng được dò bằng kháng thể NI-105.4E4 tái tổ hợp 100nM. Phát hiện kháng thể đã liên kết bằng cách áp dụng phương pháp phát hiện ECL và ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Thụy Sĩ).

Hai nhóm bao gồm các chấm peptit liền kề (peptit 83, 84 và 85; peptit 96 và 97) được nhận diện một cách đặc hiệu bằng NI105.4E4, so với trường hợp chỉ có kháng thể phát hiện. Các trình tự bị che bởi hai nhóm bao gồm các peptit này tương ứng với các axit amin 329 đến 351 và 387 đến 397 của hTau40. Các dữ liệu này cho thấy rằng NI-105.4E4 đã nhận biết epitop không liên tục chứa hai trình tự kiểu tuyến tính: một trình tự trong miền liên kết của vi cấu trúc hình ống R4 và trình tự kia trong miền có đầu tận cùng C.

Trình tự chung của các peptit 83 đến 85 chứa các gốc axit amin 337 đến 343 của hTau40. Dữ liệu Pepspot (JPT) cho thấy rằng NI-105.4E4 đã nhận biết epitop trong hTau mà chứa các axit amin 337 đến 343 của tau của người. Vùng này nằm trong miền liên kết của vi cấu trúc hình ống của tau và được bảo toàn trong số tất cả các dạng đồng chức năng của tau thần kinh của người cũng như ngang qua các loài khác kể cả chuột nhắt và chuột cống.

Khi miền này được liên kết với vi cấu trúc hình ống trong tau liên quan đến vi cấu trúc hình ống gây bệnh, NI-105.4E4 được kỳ vọng là ưu tiên hướng đích đến nhóm tau có liên quan do nguyên nhân bệnh lý mà được tách ra khỏi vi cấu trúc hình ống.

Để xác định các gốc chủ chốt trong các peptit liên kết với NI-105.4E4, phương pháp quét alanin được thực hiện để thay thế từng gốc một bằng alanin. Các gốc alanin trong trình tự gốc (A384 và A390) được sử dụng để thế cho prolin và glyxin. Các chấm 35 đến 50 và 51 đến 68 là các peptit gốc (chấm 35 và chấm 51) và các biến thể đã được thế alanin của chúng. Việc quét alanin đã cho thấy V339, E342, D387, E391 và K395 là cần thiết đối với khả năng liên kết với NI-105.4E4.

Một thử nghiệm bổ sung đã được thực hiện bằng cách thử nghiệm khả năng liên kết của NI-105.4E4 với peptit tau. ELISA trực tiếp đã cho thấy NI-105.4E4 đã nhận biết đặc hiệu peptit tương ứng với axit amin 333-346 của hTau40, mà chứa các gốc axit amin 337-343 được nhận diện theo phương pháp lập bản đồ Pepspot. Không quan sát thấy phản ứng chéo của NI-105.4E4 với peptit đối chứng che epitop AT180. Trái lại, AT180 đã nhận biết peptit chứa epitop cùng nguồn gốc của nó nhưng đã không liên kết với peptit đặc hiệu với NI-105.4E4. Các kháng thể thứ cấp đặc hiệu với các loại đã không liên kết với peptit bất kỳ trong số các peptit này. Đồng thời, ELISA trực tiếp có các peptit được phủ đã xác nhận rằng NI-105.4E4 đã nhận biết đặc hiệu peptit chứa các gốc axit amin 337 đến 343 của tau của người được nhận diện theo phương pháp lập bản đồ Pepspot.

Để lập bản đồ epitop liên kết với NI-105.4A3 trên hTau40 một cách sơ bộ, bốn polypeptit miền của tau (miền I, miền II, miền III và miền IV của tau) đã được tạo ra. Các đoạn ADN, tổng hợp được bằng cách sử dụng GeneArt® (Invitrogen), mà mã hóa mỗi miền Tau có 6xHis được gắn thẻ ở đầu tận cùng N được tách dòng vào vectơ biểu hiện pRSET-A (Invitrogen), được chuyển nhiễm vào *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs). Sự biểu hiện của các miền Tau được gắn thẻ His được tạo ra bằng IPTG 0,5mM trong sáu giờ trước khi vi khuẩn được phân giải bằng lysozym đc làm đồng nhất bằng siêu âm. Sản phẩm phân giải được đun sôi trong năm phút trước khi được làm sạch thêm bằng Ni-NTA Superflow Column (Qiagen). Các miền Tau được gắn thẻ His đã được rửa giải được phủ trên các đĩa ELISA hoặc được chất lên gel polyacrylamit dùng cho phương pháp thẩm tách Western. Polypeptit miền của tau chồng lấn một cách liền kề này đã che chiều dài đầy đủ của hTau40. Các miền tau đã

được tinh chế được phủ trên đĩa ELISA và thử nghiệm về khả năng liên kết của NI-105.4A3. NI-105.4A3 chỉ liên kết với miền Tau I và hTau40 có chiều dài đầy đủ, thể hiện epitop là nằm trong phần có đầu tận cùng N của hTau40 (aa1 đến 136). Phương pháp thẩm tách Western đã xác nhận khả năng liên kết đặc hiệu của NI-105.4A3 với miền Tau I. Việc lập bản đồ epitop NI-105.4A3 bằng công nghệ PepSpot (JPT) đã nhận diện các axit amin Q35 đến Q49 của Tau40 của người. Để xác định các gốc chủ chốt trong epitop đối với khả năng liên kết với NI-105.4A3, phương pháp quét alanin được thực hiện để thay thế từng gốc một bằng alanin. Gốc alanin trong trình tự gốc (A41) được thế bằng glyxin hoặc prolin. Việc quét alanin đã cho thấy D40, A41 và K44 là các gốc chủ chốt đối với khả năng liên kết với NI-105.4A3.

Ví dụ 4

Đánh giá khả năng liên kết của NI-105.4E4 với các dạng sinh lý cũng như các khối kết tụ bệnh gây ra bởi tau trong mô não của người mắc bệnh AD và ở chuột chuyển gen tau của người

Đám rối sợi thần kinh (NFT) cấu thành bởi các sợi tau được phosphoryl hóa quá mức là dấu hiệu về bệnh thần kinh của AD. Các sợi tau được phosphoryl hóa quá mức cũng là các thành phần chính của các sợi thần kinh loạn dưỡng và sợi mạng lưới thần kinh, cả hai trong số chúng là các dấu hiệu bệnh thần kinh thông thường ở bệnh AD. Sự biểu hiện quá mức tau của người chứa đột biến tau P301L di truyền ở các con chuột tạo ra NFT ở thời điểm sáu tháng tuổi (Gotz *et al.*, 2001a).

Để đánh giá khả năng liên kết của kháng thể tau tái tổ hợp của người với các dạng sinh lý cũng như các khối kết tụ bệnh bởi tau, phương pháp nhuộm mô học miễn dịch được thực hiện ở mô não của người mắc bệnh AD và ở chuột chuyển gen TauP301L bằng kháng thể làm ví dụ NI-105.4E4 theo sáng chế.

Chuột được truyền dung dịch chứa 20ml 100mM TrisCl/6mM EGTA (độ pH = 7,4) ở nhiệt độ trong phòng trong điều kiện gây mê sâu. Não được lấy ra và ngâm trong PFA 4% trong PBS (độ pH = 7,4) ở 4°C qua đêm để cố định, sau đó vùi vào parafin. Đối với mô của người, các khối parafin của mô não từ đối tượng mắc bệnh AD và đối tượng đối chứng khỏe mạnh được sử dụng. Phương pháp nhuộm DAB được thực hiện theo các quy trình tiêu chuẩn. Kháng thể đơn dòng Tau-12 của chuột

(Covance, California, Mỹ) được dùng làm đối chứng dương. Các kháng thể phát hiện được tiếp hợp với HRP mà không có kháng thể sơ cấp cũng được đưa vào.

Kháng thể tái tổ hợp của người NI-105.4E4 đã nhận diện nhiều NFT và sợi mạng lưới thần kinh khác nhau trong não của người mắc bệnh AD (hình 2A), mà không có ở não của đối chứng khỏe mạnh (hình 2B). Chỉ một mình kháng thể thứ cấp đã không có tín hiệu ở cả não của người mắc bệnh AD (hình 2C) và não của đối chứng (hình 2D). Ở não của chuột chuyển tau P301L, NI-105.4E4 đã liên kết mạnh với NFT giống với tau gây bệnh (hình 2E, F và H), sợi mạng lưới thần kinh (hình 2E và G) và các sợi thần kinh loạn dưỡng (hình 2E và H). Hơn thế nữa, NI-105.4E4 cũng đã nhận diện các khối kết tụ tau trong giai đoạn tiền rối (hình 2I). Trong não của chuột chuyển gen biểu hiện quá mức cả tau, P301L và APP của người có đột biến kiểu Thụy Điển và đột biến kiểu Bắc Cực, NI-105.4E4 đã liên kết đặc hiệu với các sợi thần kinh loạn dưỡng xung quanh các mảng dạng tinh bột beta (hình 2J).

Ví dụ 5

Thử nghiệm *in vivo* các kháng thể theo sáng chế

Như đã được mô tả trên đây, các nghiên cứu ở dòng chuột chuyển gen bằng cách áp dụng phương pháp chủng ngừa chủ động bằng các peptit tau được phosphoryl hóa đã cho thấy các lượng kết tụ tau trong não giảm ở não và quá trình suy giảm khả năng hành vi tiến triển chậm lại (Sigurdsson, *J. Alzheimers Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel *et al.*, *Exp. Neurol.* 224 (2010), 472-485). Tuy nhiên, phương pháp chủng ngừa chủ động có thể không sử dụng được ở người bởi vì dự định là một phần đáng kể trong số người cao tuổi là người không đáp ứng đối với phương pháp chủng ngừa. Hơn thế nữa, cũng có thể khó kiểm soát các tác dụng phụ tiềm tàng liên quan đến đáp ứng miễn dịch hướng đến tau. Có thể dự định một cách hợp lý rằng các phân tử liên kết với tau theo sáng chế sẽ đạt được các mức giảm về khối kết tụ tau trong não tương tự như được mô tả trên đây với các kháng thể của chuột, vì tính đặc hiệu liên kết tương tự của chúng với loại tau do nguyên nhân bệnh lý. Tuy nhiên, vì sự tối ưu hóa theo kiểu tiến hóa và mức trưởng thành ái lực trong kháng thể hệ miễn dịch của người theo sáng chế tạo ra công cụ điều trị bệnh quý giá do phân lập được từ đối tượng là người khỏe mạnh với khả năng cao về biên dạng an toàn tuyệt hảo và tình trạng thiếu tính sinh miễn dịch. Có thể đưa ra sự xác nhận các tác dụng điều trị bệnh được dự định này bằng các

phương pháp thử nghiệm như được mô tả trong các thử nghiệm nêu trên với các kháng thể của chuột. Cụ thể là, có thể áp dụng các kháng thể cần được sàng lọc theo các đường dùng đa dạng có thể có cho các động vật như tiêm kháng thể trong màng bụng, tiêm trong sọ, tiêm truyền trong não thất và thử nghiệm các kháng thể này về tác dụng điều trị bệnh. Một trong số hai khả năng áp dụng nêu trên có thể cũng được sử dụng sau khi tiêm trước vào não các chế phẩm dạng tinh bột beta vào não của chuột chuyển gen tau để đánh giá các tác dụng điều trị với bệnh do tau do dạng tinh bột beta gây ra.

Có thể thực hiện việc đánh giá các tác dụng điều trị bệnh bằng các phương pháp hóa mô bao gồm việc định lượng số lượng tế bào dương tính với Gallyas, tổng lượng nhuộm tau của người, tổng lượng tau được phosphoryl hóa trong não và/hoặc xác định hóa sinh tau hòa tan và không hòa tan trong não và lượng phospho-tau sau khi chiết não liền kề. Hơn thế nữa, có thể thực hiện thử nghiệm hành vi ở chuột được điều trị bệnh, ví dụ, không thích mùi vị có điều kiện hoặc tình trạng điều kiện hóa chứng sợ theo bối cảnh để có được sự xác nhận tác dụng điều trị bệnh của các kháng thể theo sáng chế (Pennanen, *Genes Brain Behav.* 5 (2006), 369-79, Pennanen *Neurobiol Dis.* 15 (2004), 500-9.)

Ví dụ 6

Tạo thể khảm đối với các kháng thể NI-105.4E4 và NI-105.4A3 bằng các miền ổn định IgG2a của chuột

Để tạo các kháng thể có tính sinh miễn dịch giảm để dùng trong các nghiên cứu điều trị bệnh lâu dài, các phiên bản kháng thể của thể khảm của chuột NI-105.4E4 và NI-105.4A3 được tạo ra bằng cách áp dụng công nghệ ADN tái tổ hợp. Kiểu tương đương IgG2a/lamđa của chuột được chọn đối với các kháng thể của thể khảm này, để tạo ra phân tử mà liên kết với ái lực cao với thụ thể Fc-gama của chuột, và do đó, có khả năng tạo ra đáp ứng tác động miễn dịch. Trình tự axit amin của cấu trúc chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của NI-105.4E4 ("ch4E4") thể khảm và cấu trúc chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của NI-105.4A3 ("ch4A3") thể khảm được thể hiện dưới đây.

Bảng 5: Trình tự axit amin của NI-105.4E4 (ch4E4) thể khảm và NI-105.4A3 (ch4A3) thể khảm

Chuỗi nặng của	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQAS

ch4E4 trưởng thành (IgG2a của chuột) SEQ ID NO: 20	GKGLEWVGRIRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAY LQMSSLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
Chuỗi nhẹ của ch4E4 trưởng thành (lamđa của chuột) của SEQ ID NO: 21	SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQ APVLVIYKDTERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEAD YYCLSADNSATWVFGGGTKVTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEEL ETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSK QSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVEKSLS RADCS

Ví dụ 7

Loại bỏ vị trí glycosyl hóa được liên kết với N liên ứng khỏi chuỗi nặng của ch4E4 (IgG2a của chuột)

Vị trí glycosyl hóa được liên kết với N liên ứng được nhận diện trong vùng CDR1 của chuỗi nặng của NI-105.4E4. Sau khi biểu hiện tế bào (CHO) của động vật có vú, vị trí glycosyl hóa N đã được dự đoán (Asn-30) bị chiếm chỗ hoàn toàn bởi glycan, như được chứng minh bằng phép đo phổ khối. Để loại bỏ vị trí glycosy hóa N trong vùng này và làm giảm tính không đồng nhất của sản phẩm, Asn-30 của chuỗi nặng của ch4E4 được thay đổi thành Gln (bảng 4). Nếu được tạo ra và tinh sạch từ các tế bào CHO, kháng thể được cải biến đã liên kết với tau tái tổ hợp với ái lực liên kết biểu kiến cao hơn gần 4 lần so với kháng thể được glycosyl hóa gốc.

Bảng 6: Trình tự axit amin của chuỗi nặng của ch4E4(N30Q) trưởng thành (IgG2a của chuột). Gốc Gln được thế được in đậm và gạch chân.

Chuỗi nặng của ch4E4(N30Q) trưởng thành (IgG2a của chuột) SEQ ID NO: 22	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNF**Q**ISAIHWVRQAS GKGLEWVGRIRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAY LQMSSLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGQGTLVTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVA HPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPK IKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKL RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Ví dụ 8

Tạo ra NI-105.4E4(N30Q) không được glycosyl hóa thể khảm (ch4E4(N30Q) mIgG1 Agly)

Một biến thể không được glycosyl hóa thể khảm NI-105.4E4 của chuột đã được tạo dòng mầm được tạo ra ("ch4E4(N30Q) IgG1-Agly") để đánh giá mối quan hệ giữa hoạt tính và chức năng tác động kháng thể. Đối với chuỗi nặng (SEQ ID 214), miền biến đổi của NI-105.4E4(N30Q) (SEQ ID NO: 43) được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1 chuột chứa đột biến Asn thành Gln để loại bỏ vị trí glycosyl hóa Fc liên ứng. Vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa dạng thay đổi N30Q để loại bỏ vị trí glycosyl hóa N liên ứng ở CDR1 (ví dụ 7). Chuỗi nhẹ này là chuỗi nhẹ lamđa của ch4E4 được mô tả trên đây (SEQ ID 21).

Ví dụ 9

Nghiên cứu mức độ thâm nhập vào não cấp tính của 4E4 và 4A3 của người

Các kháng thể đã được tạo dòng mầm NI-105.4E4 và NI-105.4A3 của người được tạo ra theo phương pháp chuyển nhiễm nhất thời các tế bào CHO và được tinh sạch theo phương pháp tinh sạch ái lực. Các lượng nội độc tố được kiểm soát và tất cả đều dưới 1EU/mg. Các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được tiêm trong màng bụng kháng thể với lượng NI-105.4E4 30mg/kg (n=7), 4A3 (n=7) hoặc cùng thể tích PBS (n=7) vào ngày 1 và ngày 4. Vào ngày 5, các con chuột được truyền dịch trong điều kiện gây mê bằng PBS chứa heparin 1 đơn vị/ml. Máu, não và tủy sống

được thu gom để phân tích. Bán cầu não phải được làm đông lạnh ở -80°C, bán cầu não trái và tủy sống được cố định sau trong formalin đã được trung hòa 10% ở 4°C trong hai ngày trước khi vùi trong khối parafin và được cắt. Huyết tương được bảo quản ở -80°C trong các phần phân ước.

Chiết protein ra khỏi não: bán cầu phải đã được làm đông lạnh được cân và làm đồng nhất trong 5 lần thể tích (5ml/g mô ướt) của dung dịch chứa 50mM NaCl, 0,2% đietylamin, chất ức chế proteaza (Roche Diagnostics GmbH) và chất ức chế phosphataza (Roche Diagnostics GmbH). Sau đó, các mẫu được chuyển sang các ống polycacbonat và được bổ sung 5 thể tích khác của dung dịch làm đồng nhất, và được giữ trên nước đá trong 30 phút. Sau đó, thu gom phần hòa tan sau khi ly tâm ở tốc độ 100.000g, 4°C trong 30 phút. Phần hòa tan này được sử dụng trong thử nghiệm IgG của người. Phần kết viên được tạo huyền phù lại trong 3 mức thể tích của PBS với chất ức chế proteaza và chất ức chế phosphataza. Sau khi ly tâm ở tốc độ 16.000g, 4°C trong 30 phút, các dịch nổi trên bề mặt và phần kết viên được bảo quản riêng biệt ở -80°C để chiết thêm tau không hòa tan. Phần kết viên còn được chiết theo phương pháp chiết sarcosyl được cải biến (Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. *Neuron* 8, 159 (1992)).

Thử nghiệm ELISA kẹp đặc hiệu với IgG của người: 2µg/ml của Fab IgG của dê kháng của người (Jackson) trong dung dịch đệm phủ cacbonat ELISA 50mM (độ pH = 9,6) được sử dụng làm kháng thể bắt. Các vi đĩa có 96 giếng được phủ nửa diện tích bằng kháng thể bắt với mức 30µl/lỗ ở 4°C qua đêm. Sau đó, rửa đĩa này 4 lần bằng PBS chứa 0,1% Tween 20 trước khi ủ bằng 50µl PBS /giếng chứa 2% BSA ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Các phần hòa tan của các chiết phẩm từ não, các mẫu huyết tương và phần kháng thể tiêu chuẩn (4A3) được pha loãng trong PBS chứa 2% BSA và 0,1% Tween 20. 30µl dung dịch chứa các mẫu đã được pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Sau đó, rửa đĩa này bằng 200µl PBS /giếng chứa 0,1% Tween 20 trong bốn lần trước khi được ủ với Fcγ lừa kháng kháng thể của người được tiếp hợp với HRP (Jackson, được pha loãng ở 1:10.000 trong PBS chứa 2% BSA và 0,1% Tween 20) ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Sau đó, rửa đĩa này bằng 200µl PBS /giếng chứa 0,1% Tween 20 bốn lần trước khi bổ sung 20µl TMB /giếng (1:20 trong dung dịch xitrat 10mM độ pH=4,1). Sau đó, kết thúc phản ứng bằng cách bổ sung 10µl dung dịch H_2SO_4 1M vào mỗi

giếng. Thu được đường chuẩn kháng thể từ các dung dịch pha loãng theo bậc chứa NI-105.4A3. Nồng độ kháng thể trong mẫu huyết tương và mẫu não được tính theo các tiêu chuẩn. Sau đó, lượng IgG trong não người được chuyển đổi thành µg kháng thể/gam mô não tươi (giả định là 1g/10ml) như được thể hiện trên hình 6.

Các lượng lớn IgG của người được phát hiện trong huyết tương của tất cả các con chuột được điều trị bằng NI-105.4E4 và NI-105.4A3. Trái lại, không phát hiện thấy IgG của người trong huyết tương của các con chuột được điều trị bằng PBS (hình 5). Đã phát hiện thấy lượng IgG đáng kể của người ở các phần đồng nhất của não của các con chuột được điều trị bằng 4E4 và 4A3 (hình 6).

Ví dụ 10

Nghiên cứu bệnh mãn tính bằng NI-105.4E4 và NI-105.4A3 thể khảm

NI-105.4E4 và NI-105.4A3 thể khảm chứa các miền biến đổi của kháng thể gốc của người và các vùng hằng định của IgG2a của chuột có thể được tạo ra theo phương pháp chuyển nhiễm nhất thời các tế bào CHO và được tinh sạch theo phương pháp tinh sạch ái lực. Lượng nội độc tố trong mỗi mẻ của các kháng thể sẽ được kiểm soát và được giữ dưới 1Eu/mg. Các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra đã được cân đối về giới tính ở độ tuổi 7,5 tháng đến 8 tháng sẽ được tiêm trong màng bụng 10mg/kg, 3mg/kg dung dịch chứa kháng thể, hoặc cùng thể tích của đối chứng PBS. Mỗi nhóm điều trị gồm 20 đến 25 con chuột. Việc điều trị sẽ được thực hiện mỗi tuần một lần trong thời gian 26 tuần. Theo cách khác, việc điều trị sẽ được thực hiện hai lần mỗi tuần trong thời gian 13 tuần. Thể trọng sẽ được theo dõi hai tuần một lần. Các con chuột được truyền dịch trong điều kiện gây mê vào cuối khoảng thời gian điều trị. Não, tủy sống và máu được thu gom. Một nửa não và tủy sống có thể được cố định sau trong formalin 10% trong ba ngày trước khi vùi trong khối parafin. Có thể sử dụng các phần cắt dày 4µm đến 6µm cắt được từ các khối mô này đối với các nghiên cứu hóa mô miễn dịch. Nửa não kia được cân và được làm đông lạnh sâu ở -80°C dùng cho các phân tích hóa sinh.

Các tác dụng của dược chất sẽ được đánh giá bằng cách so sánh lượng của đám rối sợi thần kinh (NFT) và lượng của tau có các đặc tính về độ hòa tan khác nhau ở mẫu được điều trị và mẫu đối chứng. NFT có thể được làm hiển thị theo kỹ thuật tẩm bạc của Gallyas (F Gallyas Acta Morphol. *Acad. Sci. Hung* 19,1 (1971)), hoặc bằng

cách nhuộm miễn dịch bằng kháng thể đơn dòng AT100 và AT180 của chuột, kháng thể này nhận biết tau được phosphoryl hóa do nguyên nhân bệnh lý ở NFT. Con số hoặc tần số của các tế bào thần kinh dương tính với Gallyas và/hoặc các tế bào thần kinh được đánh dấu AT100, AT180 trong não và tủy sống ở chuột được điều trị bằng kháng thể và các con chuột đối chứng có thể được xác định để đánh giá hiệu quả của việc điều trị bằng kháng thể.

Có thể chiết tau hòa tan và không hòa tan theo quy trình chiết protein ra khỏi não được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, có thể chiết tau hòa tan và tau không hòa tan theo phương pháp chiết sarcosyl được cải biến (Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. *Neuron* 8, 159 (1992)). Nói một cách ngắn gọn, não đã được làm đông lạnh được làm đồng nhất trong 10 thể tích (trọng lượng/thể tích) của dung dịch đệm đồng nhất 10% sucroza bao gồm 10mM Tris•HCl (độ pH = 7,4), 0,8M NaCl, 1mM EGTA, 1mM Na_3VO_4, 1mM NaF, 1mM AEBSF, chất ức chế proteaza (Roche Diagnostics GmbH) và chất ức chế phosphataza (Roche Diagnostics GmbH). Sản phẩm đồng nhất được ly tâm trong thời gian 20 phút ở tốc độ 20.000g, và dịch nổi trên bề mặt được giữ lại. Phần kết viên được làm đồng nhất trong 10 lần thể tích của dung dịch đệm làm đồng nhất và được ly tâm lần thứ hai. Các dịch nổi trên bề mặt có thể được tập hợp lại, và N-lauryl-sarkosinat (Sigma) được bổ sung vào nồng độ cuối 1% (trọng lượng/thể tích), và được ủ ở 37°C trong khi vẫn quay ở tốc độ 300 vòng/phút trong 1,5 giờ, sau đó ly tâm ở tốc độ 100.000g trong 1 giờ. Dịch nổi trên bề mặt được thu gom dưới dạng phần hòa tan trong sarcosyl và phần kết viên từ 1g mô não được tạo huyền phù lại trong 0,2ml 50mM Tris•HCl (độ pH = 7,4) để làm phần PHF.

Các lượng tau hòa tan và tau không hòa tan sẽ được đo bằng kit Tau ELISA có bán trên thị trường (Invitrogen). Hơn thế nữa, các chiết phẩm protein từ não sẽ được tách bằng Bis-Tris SDS-PAGE 4% đến 12%, sau đó thấm tách miễn dịch bằng các kháng thể Tau12 (tau của người), AT8 (pS202/pT205), AT100 (pT212/pS214), AT180 (pT231) và E178 (pS396). Phương pháp phân tích bán định lượng sẽ được thực hiện với việc đo mật độ tích hợp của mỗi mẫu với các tiêu chuẩn của các lượng tau đã biết.

Ngoài ra, có thể thực hiện các thử nghiệm hành vi như được chỉ ra trong ví dụ 5, trên đây. Ví dụ, có thể thử nghiệm đối với tình trạng cải thiện của trí nhớ làm việc ở chuột được điều trị bằng kháng thể TauP301L bằng cách áp dụng hành vi trong mê lộ chữ Y thử nghiệm kép (ví dụ, Pennanen, *Genes Brain Behav.* 5 (2006), 369-79, mà

được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn toàn bộ). Ba nhánh của mê lộ dài 22cm, rộng 5cm và sâu 15cm. Các manh mối trừu tượng đen và trắng được đặt trên màn đen xung quanh mê lộ này. Các thử nghiệm được thực hiện với mức ánh sáng môi trường là 6 lux ơ trong suốt pha tối. Mỗi thử nghiệm bao gồm phiên luyện tập và phiên quan sát. Trong suốt phiên luyện tập, chuột được phân vào hai trong số ba nhánh này (nhánh bắt đầu và nhánh thứ hai), nhánh này có thể được khám phá một cách tự do trong toàn bộ thời gian 4 phút, không có sự tiếp cận với nhánh thứ ba (nhánh mới). Sau đó, con chuột này được lấy ra khỏi mê lộ và được giữ trong lồng nhốt trong thời gian 1,5 phút đến 5 phút, trong khi mê lộ được làm sạch triệt để bằng etanol 70% để loại bỏ manh mối về khứu giác bất kỳ. Sau đó, đưa con chuột này trở lại mê lộ để quan sát với tất cả ba nhánh có thể tiếp cận được trong thời gian 4 phút. Trình tự các lần xâm nhập, số lần xâm nhập vào mỗi nhánh và thời gian ở lại trong mỗi nhánh được ghi lại. Từ đó, tỷ lệ giữa thời gian ở lại trong nhánh thứ ba mới và trị số trung bình của thời gian ở lại trong hai nhánh kia (nhánh bắt đầu và nhánh thứ hai) được tính và so sánh trong số các nhóm điều trị khác nhau ở mô hình chuột mắc bệnh do tau và chuột kiểu dại đối chứng tương ứng. Các động vật gặm nhấm thường thích khám phá nhánh mới của mê lộ mà không phải là trở lại nhánh mà trước đó đã vào. Các tác dụng của các kháng thể có thể được theo dõi liên quan đến sự phục hồi sở thích này của các con chuột mô hình bệnh do tau được điều trị so với hành vi không phân biệt của các con chuột không được điều trị do tình trạng suy giảm trí nhớ làm việc liên quan đến rối loạn của chúng. Do đó, tỷ lệ gần bằng 1 biểu thị tình trạng suy giảm trí nhớ làm việc. Một tỷ lệ cao hơn biểu thị trí nhớ làm việc tốt hơn. Tình trạng suy giảm trí nhớ làm việc ở các con chuột có TauP301L được xem là bệnh do tau là kết quả của sự biểu hiện quá lượng tau của người. Do đó, tỷ lệ cao hơn một cách đáng kể được quan sát thấy ở các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được điều trị bằng kháng thể kháng tau so với ở các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra đối chứng sẽ cho thấy rằng kháng thể kháng tau có tác dụng điều trị bệnh đối với bệnh do tau.

Ví dụ 11

Nhận diện các kháng thể kháng tau của người.

Các kháng thể tau tái tổ hợp của người NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-

105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, và NI-105.9C4 phân lập được theo các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Đích và tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể tau của người này được xác nhận như được mô tả trên đây. Tóm tắt về các phát hiện được đưa ra trong bảng 5. Tất cả các kháng thể được sử dụng ngoài trừ NI-105.17C1 được tạo dòng mầm.

輟轖□. Xác định đặc điểm *in vitro* các kháng thể kháng tau của người.

Kháng thể	EC_{50} [nM]/rTau ELISA	EC_{50} [nM]/ PHFTau ELISA	Vùng liên kết (hTau40)*	Sự phosphoryl hóa cần thiết**
NI-105.6C5	0,033	0,04	125-131	Không
NI-105.17C1	3,3	4,7	397-441	Không
NI-105.40E8	>100	0,133	226-244	Có, pS235
NI-105.6E3	>100	18,7	ND	Có
NI-105.29G10	3,8	5,3	217-227	Không
NI-105.48E5	>500	13,2	37-55; 387-406	pS396, pS46 không được xác nhận
NI-105.26B12	2,9	>90	421-427	Không được xác định
NI-105.6L9	2,5	>60	427-439	Không được xác định
NI-105.12E12	28,6	>150	1-158	Không được xác định
NI-105.60E7	0,18	-	197-207	Sự phosphoryl hóa ở 198,199 ,202 hoặc 205 phá vỡ sự liên kết
NI-105.14E2	0,65	-	57- 67	Không
NI-105.39E2	0,7	-	355-441	Không được xác định
NI-105.19C6	4,0	-	313-319	Không
NI-105.22E1	1,1	>200	309-319	Không
NI-105.9C4	5,2	-	221-231	pS231 phá vỡ sự liên kết

*: vùng liên kết trên hTau40 được nhận diện bằng các phương pháp kết hợp của PepSPOT, ELISA và thẩm tách Western các đoạn tau, ELISA peptit tau và phương pháp quét alanin.

**: liệu việc liên kết kháng thể có cần phosphoryl hóa ở các axit amin nhất định trên protein tau hay không được xác minh bằng cách so sánh khả năng liên kết của kháng thể với rTau, PHFTau, PHFTau được khử phosphoryl bằng phosphataza của ruột bò, rTau *in vitro* đã được phosphoryl hóa bằng GSK3β hoặc GSK3β/CDK5/p35, và các peptit tau được phosphoryl hóa trên PepSPOT và ELISA trực tiếp.

Ví dụ 12

Tạo thể khảm của các kháng thể của người bằng các miền ổn định IgG2a của chuột

Để tạo các kháng thể có tính sinh miễn dịch giảm để dùng trong các nghiên cứu điều trị lâu dài, các phiên bản kháng thể của thể khảm của chuột NI-105.17C1 ("ch17C1"), NI-105.6C5 ("ch6C5"), NI-105.40E8 ("ch40E8"), và NI-105.6E3 ("ch6E3") được tạo ra bằng cách áp dụng công nghệ ADN tái tổ hợp. Kiểu tương đương IgG2a/lamđa của chuột được chọn cho các kháng thể của thể khảm này, để tạo ra phân tử mà liên kết với ái lực cao với thụ thể Fc-gama của chuột và do đó, có khả năng tạp ra đáp ứng tác động miễn dịch. Trình tự axit amin của các cấu trúc chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của ch17C1, ch6C5, ch40E8, ch40E8(R104W), và ch6E3 được thể hiện dưới đây.

chuỗi nặng ch17C1 (IgG2a của chuột)	SEQ ID NO: 203
chuỗi nhẹ ch17C1 (lamđa của chuột)	SEQ ID NO: 204
chuỗi nặng ch6C5 (IgG2a của chuột)	SEQ ID NO: 205
chuỗi nhẹ ch6C5 (lamđa của chuột)	SEQ ID NO: 206
chuỗi nặng ch40E8 (IgG2a của chuột)	SEQ ID NO: 207
chuỗi nặng ch40E8(R104W) (IgG2a của chuột	SEQ ID NO: 208
chuỗi nhẹ ch40E8 (lamđa)	SEQ ID NO: 209
chuỗi nặng ch6E3 (IgG2a của chuột)	SEQ ID NO: 210
chuỗi nhẹ ch6E3 (kapa của chuột)	SEQ ID NO: 211

Ví dụ 13

Loại bỏ vị trí glycosyl hóa CDR trong chuỗi nhẹ của NI-105.17C1.

Vị trí glycosyl hóa được liên kết với N liên ứng được nhận diện trong vùng CDR1 của chuỗi nhẹ NI-105.17C1. Sau khi biểu hiện tế bào (CHO) của động vật có vú, vị trí glycosyl hóa N đã được dự đoán (Asn-31) bị chiếm chỗ hoàn toàn bởi glycan, như được chứng minh bằng phép đo phổ khối. Để loại bỏ vị trí glycosy hóa N trong vùng này và cải thiện tính không đồng nhất của sản phẩm, Asn-31của chuỗi nhẹ của ch17C1 được thay đổi thành Gln (xem trình tự dưới đây). Khi được tạo ra và làm sạch khỏi các tế bào CHO, kháng thể được cải biến (ch17C1(N31Q) mIgG2a) đã liên kết với tau tái tổ hợp với ái lực liên kết biểu kiến tương tự so với kháng thể được glycosyl

hóa gốc (xem hình 8A). Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của NI-105.17C1(N31Q) chứa trình tự axit amin có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 221.

chuỗi nhẹ ch17C1 (N31Q) (lamđa của chuột)	SEQ ID NO: 212
VL của NI-105.17C1(N31Q) của người	SEQ ID NO: 221

Ví dụ 14

Tạo ra kháng thể có chức năng tác động giảm.

Các biến thể kháng thể chứa các đột biến ở vị trí glycosyl hóa N liên ứng trong miền Fc chuỗi nặng được tạo ra. Các biến thể này, được gọi là "Agly", được thiết kế để tạo ra các kháng thể kháng tau có chức năng tác động miễn dịch giảm. Trình tự axit amin của các biến thể Agly của các kháng thể tau được đưa ra dưới đây.

chuỗi nặng ch4A3-mIgG1-Agly	SEQ ID NO: 213
chuỗi nặng ch4E4(N30Q)-mIgG1-Agly	SEQ ID NO: 214
chuỗi nặng ch6C5-mIgG1-Agly	SEQ ID NO: 215
chuỗi nặng ch17C1-mIgG1-Agly	SEQ ID NO: 216

Ví dụ 15

So sánh hoạt tính liên kết của ch17C1-mIgG2a và ch17C1-mIgG1-Agly.

Mối quan hệ giữa hoạt tính và chức năng tác động kháng thể được đánh giá đối với ch17C1 Agly (hình 8A). Kháng thể ch17C1 chứa chuỗi nặng ch17C1 (SEQ ID NO: 203), và chuỗi nhẹ ch17C1 (SEQ ID NO: 204). Kháng thể ch17C1(N31Q) mIgG2a chứa chuỗi nặng ch17C1 (SEQ ID NO: 203), và chuỗi nhẹ ch17C1(N31Q) (SEQ ID NO: 212), phần này sát nhập đột biến N31Q ở CDR1 để loại bỏ vị trí glycosyl hóa CDR. Kháng thể ch17C1(N31Q) mIgG1Agly chứa chuỗi nặng ch17C1-mIgG1-Agly (SEQ ID NO: 216), trong đó các miền biến đổi của 17C1 được dung hợp với chuỗi nặng của IgG1 chuột chứa đột biến Asn thành Gln ở vị trí 294 (gốc theo Kabat là 297) để loại bỏ vị trí glycosyl hóa Fc liên ứng, và chuỗi nhẹ ch17C1 (N31Q) (SEQ ID NO: 212). Khi được tạo ra và làm sạch khỏi các tế bào CHO, ch17C1(N31Q) mIgG1 Agly đã liên kết với tau tái tổ hợp với ái lực liên kết biểu kiến tương tự so với kháng thể được glycosyl hóa gốc (xem hình 8A).

Ví dụ 16

So sánh valin với isoleuxin ở vị trí 48 của chuỗi nhẹ 17C1.

Trong quy trình tạo phiên bản IgG2a thể khảm của chuột của kháng thể NI-105.17C1 đã được tách dòng, gốc 48 của chuỗi nhẹ cũng được thay đổi từ valin thành isoleuxin. Để xác nhận rằng sự thay thế này đã không ảnh hưởng đến ái lực liên kết của NI-105.17C1, phiên bản IgG2a thể khảm của chuột của NI-105.17C1 có valin ở vị trí 48 được tạo ra. Khi được tạo ra và làm sạch khỏi các tế bào CHO, kháng thể ch17C1(N31Q, I48V) mIgG2a đã liên kết với tau tái tổ hợp với ái lực liên kết biểu kiến tương tự so với ch17C1(N31Q) mIgG2a (xem hình 8B). Kháng thể ch17C1(N31Q) mIgG2a chứa chuỗi nặng ch17C1 (SEQ ID NO: 203), và chuỗi nhẹ ch17C1 (N31Q, I48V) (SEQ ID NO: 217).

chuỗi nhẹ ch17C1 (N31Q, I48V) (lamđa của chuột)	SEQ ID NO: 217
VL của NI-105.17C1(N31Q, I48V) của người	SEQ ID NO: 222

Ví dụ 17

So sánh Arg với Trp ở vị trí 104 của NI-105.40E8.

Kháng thể NI-105.40E8 mà là chọn lọc đối với dạng được phosphoryl hóa của tau được tìm thấy ở các sợi xoắn ghép cặp (PHF) của người, chứa gốc arginin bất thường ở vị trí 104 của VH của NI-105.40E8. Thông thường, vị trí này trong kho globulin miễn dịch của người bị chiếm chỗ bởi gốc tryptophan. Một dạng của chuỗi nặng NI-105.40E8, NI-105.40E8(R104W)-hIgG1, được tạo ra mà trong đó gốc Arg104 được thay thế bằng tryptophan. Khi được tạo ra và làm sạch khỏi các tế bào CHO, kháng thể NI-105.40E8(R104W)-hIgG1 đã liên kết với tau PHF người với ái lực liên kết biểu kiến tương tự so với NI-105.40E8-hIgG1 (xem hình 9). Chuỗi nhẹ của hai kháng thể này là tương đồng.

NI-105.40E8(R104W)-hIgG1 của người, chuỗi nặng	SEQ ID NO: 218
chuỗi nhẹ NI-105.40E8 người (lamđa của người)	SEQ ID NO: 219
VH của NI-105.40E8(R104W) của người	SEQ ID NO: 220

Ví dụ 18

Kháng thể kháng tau của người liên kết với tau được kết tụ do nguyên nhân bệnh lý trong não của người mắc bệnh AD và trong não của mô hình chuột chuyển gen của bệnh do tau.

Các mẫu mô não thu được từ bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer và các bệnh nhân đối chứng, cũng như từ não của chuột chuyển gen của bệnh do tau và đối chứng kiểu dại được nhuộm bằng các kháng thể đã được tách dòng kháng tau của người được đề xuất trong bản mô tả này. Các hình ảnh làm ví dụ của các kháng thể kháng tau đã được tách dòng NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6C5 và NI-105.17C1 của người liên kết với các khối kết tụ tau gây bệnh trong não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer (AD) và trong não của chuột chuyển gen có bệnh do tau (Tg) được thể hiện trên hình 10. Không có kháng thể nào trong số các kháng thể này liên kết với tau bình thường ở đối tượng khỏe mạnh về sức khỏe tâm thần (Ctr) hoặc não của chuột hoang (Wt). Các mẫu hình khác nhau trong số các kháng thể này đã phản ánh các khác biệt của chúng về tính đặc hiệu với epitop và ái lực liên kết.

Ví dụ 19

Động vật và điều trị bằng kháng thể: Các kháng thể kháng tau NI-105.6C5, NI-105.40E8 và NI-105.6E3 của người được tạo ra theo phương pháp chuyển nhiễm nhất thời các tế bào CHO và được làm sạch bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Kháng thể được làm tương thích với người không có tính phản ứng chéo với các kháng nguyên của chuột được sử dụng làm đối chứng kiểu tương đương (hIgG1). Trong thử nghiệm thứ nhất, một nửa kháng thể NI-105.6C5, NI-105.6E3 và hIgG1 đã được tiêm được đánh dấu bằng Cy3 (GE Healthcare, PA13105) với tỷ lệ kháng thể: Cy3 khoảng là 1:3. Việc đánh dấu bằng Cy3 đã không làm thay đổi khả năng liên kết của kháng thể như được xác nhận bằng ELISA và nhuộm miễn dịch bằng não có TauP301L (dữ liệu không được thể hiện). Trong thử nghiệm thứ hai, kháng thể kháng tau NI-105.6C5 và NI-105.40E8 không được đánh dấu được sử dụng.

Các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra từ 18 tháng tuổi đến 22 tháng tuổi đã tiếp nhận hai liều lượng NI-105.6C5, NI-105.6E3 30mg/kg hoặc đối chứng kiểu

tương đương IgG1 của người là hIgG1 thông qua phương pháp tiêm trong màng bụng trong vòng bảy ngày. Các mẫu mô được thu gom từ ba con chuột của mỗi nhóm được điều trị tại các thời điểm một ngày, tám ngày và 22 ngày sau đợt dùng liều thứ hai. Trong thử nghiệm thứ hai, các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được tiêm trong màng bụng h40E8 và h6C5 với lượng 30mg/kg hai lần trong vòng bảy ngày và các mẫu mô được thu gom từ các con chuột đó một ngày sau khi tiêm lần thứ hai.

Đối với việc thu gom mẫu mô, các con chuột được gây mê sâu bằng ketamin/xylazin trước khi máu được thu gom thông qua não nhĩ phải. Sau đó, thu gom CSF theo phương pháp chọc hút vùng bể lớn. Tiếp theo, thu gom não và xương sống sau khi truyền dịch trong thời gian 2 phút bằng PBS lạnh bằng nước đá, chứa heparin 10 UI/ml và năm phút bằng formalin 10% đã được trung hòa thông qua não thất trái. Não được cố định trong formalin đã được trung hòa 10% trong thời gian 3 giờ nữa ở 4°C, sau khi ngâm trong sucroza 30% trong thời gian 48 giờ. Sau đó, não được làm đông lạnh trong nước đá khô và tiếp theo, được cắt thành loạt phần cắt theo mặt phẳng vành dày 30µm. Loạt phần cắt được bảo quản ở -20°C trong dung dịch chống đông chứa 1M glucoza, 37,5% etylen glycol trong dung dịch chứa 50mM natri phosphat độ pH 7,4 có 0,025% natriazit trước khi sử dụng. Xương sống được cố định sau trong formalin đã được trung hòa 10% trong hai ngày và được vùi vào các khối parafin.

Hóa mô miễn dịch: Các phần cắt theo mặt phẳng vành có độ dày 30µm được dò bằng IgG lừa kháng kháng thể của người đã được biotin hóa (H+L) theo phương pháp nhuộm nổi tự do. Các phần cắt nổi tự do được rửa trong Tris-Triton độ pH = 7,4 (50mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Triton X-100), được ủ trong H_2O_2 PBS 1% trong 30 phút, và được ủ với dung dịch phong bế chứa huyết thanh dê và huyết thanh ngựa bình thường 2% trong Tris-Triton có lượng bổ sung Triton X-100 là 0,2% trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, các phần cắt được ủ với IgG lừa kháng kháng thể của người đã được biotin hóa (H+L) (Jackson Immunoresearch Labs, 709-065-149) ở 1:200 trong dung dịch phong bế trong 16 giờ ở 4°C trong khi vẫn khuấy ở tốc độ 100 vòng/phút để phát hiện IgG của tế bào thần kinh người. Kháng thể được biotin hóa đã liên kết với mô được hiển thị bằng phản ứng tạo sắc tố bằng oxiđazaperoxiđaza bằng cách sử dụng kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, PK6100, 1:100). Kết thúc phản ứng enzym bằng PBS được làm lạnh bằng nước đá và các phần cắt được rửa trong PBS 3 lần. Sau đó, các phần cắt được gắn lên bản kính mang vật và được làm

khô trong không khí qua đêm trước khi chúng được nhuộm tương phản bằng dung dịch hemalum để hiển thị nhân (Carl Roth GmbH + Co., T865,1). Sau bước loại nước, các bản kính mang vật được che bằng kính che trước khi được quét bằng hệ hiển vi ảo Olympus dotSlide 2.1.

Các kháng thể của người được phát hiện trong não của chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra, các con chuột này đã tiếp nhận hoặc các kháng thể kháng tau của người hoặc kháng thể đối chứng hIgG1 thông qua phương pháp tiêm trong màng bụng, nhưng không phải ở chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra và chuột kiểu dại không có việc điều trị bằng kháng thể (hình 11). Tuy nhiên, sự nhuộm tế bào thần kinh chỉ được quan sát thấy trong vùng não đồi hải mã của chuột được điều trị bằng kháng thể kháng tau NI-105.6C5, NI-105.6E3 và NI-105.40E8, nhưng không phải ở chuột được điều trị bằng hIgG1. Sự nhuộm tế bào thần kinh bằng các kháng thể kháng tau có thể dễ dàng phát hiện được một ngày sau khi tiêm, kém rõ rệt hơn tại thời điểm tám ngày sau khi tiêm, và không thể phát hiện được ở thời điểm 22 ngày sau khi tiêm (dữ liệu không được thể hiện). Các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra tạo ra lượng lớn của tau chuyển gen của người trong quá trình tạo ra trong vùng não đồi hải mã, và vùng não đồi hải mã là một trong số các vùng sớm nhất phát triển đám rối sợi thần kinh. Vì vậy, các kháng thể kháng tau được tiêm ngoại vi không chỉ đi vào não mà còn chắc chắn đi vào các tế bào thần kinh mà chứa lượng lớn tau.

Ví dụ 20

Tác dụng của việc điều trị bệnh lâu dài các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra bằng ch4E4(N30Q) và ch17C1(N31Q).

Động vật và điều trị bằng kháng thể: NI-105.4E4 (N30Q) thể khảm ("ch4E4(N30Q)") và NI-105.17C1(N31Q) thể khảm ("ch17C1(N31Q)") chứa các miền biến đổi của kháng thể của người và các vùng hằng định của IgG2a của chuột được tạo ra theo phương pháp chuyển nhiễm nhất thời các tế bào CHO và được làm sạch bằng cách áp dụng các phương pháp tiêu chuẩn.

Các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra đã được cân đối về giới tính ở độ tuổi 7,5 tháng đến 8 tháng hằng tuần được dùng ch17C1(N31Q) 10mg/kg (n=20), ch4E4(N30Q) 10mg/kg (n=20) hoặc cùng thể tích PBS (n=20) thông qua phương pháp

tiêm trong màng bụng. Thể trọng được theo dõi hai tuần một lần. Đã không quan sát thấy sự giảm cân đáng kể nào. Hai con chuột từ nhóm PBS và một con chuột từ nhóm được điều trị bằng ch17C1(N31Q) đã chết trước khi trưởng thành. Các con chuột được gây mê một ngày sau lần điều trị thứ 25 để thu gom mô. Máu được thu gom thông qua xoang hốc mắt. Tiếp theo, thu gom não và xương sống sau khi truyền dịch trong 2 phút bằng PBS lạnh như nước đá, chứa heparin 10 UI/ml, thông qua não thất trái. Sau đó, nửa não trái được cân, được làm đông lạnh sâu trong nước đá khô và được bảo quản ở -80°C trước khi sử dụng. Nửa não phải và xương sống được cố định sau trong formalin 10% đã được trung hòa ở 4°C trong thời gian hai ngày, sau đó bảo quản thêm trong PBS trước khi được xử lý thành khối não và khối tủy sống được vùi vào parafin.

Chiết protein ra khỏi não: protein não được chiết một cách liền kề trên cơ sở độ hòa tan. Trước tiên, nửa não trái được làm đồng nhất trong 10 lần trọng lượng/thể tích của 50mM NaCl chứa 0,2% đietylamin, chất ức chế proteaza 1X (lần) (Roche Diagnostics GmbH) và chất ức chế phosphataza 1X (Roche Diagnostics GmbH). Sau khoảng thời gian ủ 30 phút trên nước đá, dung dịch đồng nhất của được ly tâm ở tốc độ 100.000g ở 4°C trong 30 phút. Tiếp đó, dịch nổi trên bề mặt được thu gom và được xác định là phần hòa tan. Phần kết viên còn lại được làm đồng nhất trong 12 lần trọng lượng/thể tích của đệm phân giải 10% sucroza chứa 10mM Tris 7,4, 0,8M NaCl, 1mM EGTA, chất ức chế phosphataza 1X, chất ức chế proteaza 1X, 1mM Na_3VO_4, 1mM NaF và 1mM AEBSF. Sau khoảng thời gian ủ 30 phút trên nước đá, dung dịch đồng nhất của được ly tâm ở tốc độ 20.500g ở 4°C trong thời gian 20 phút. 95% dịch nổi trên bề mặt được thu gom cẩn thận dùng để chiết sarcosyl. Phần kết viên được bảo quản ở -80°C. N-lauryl-sarcosinat được bổ sung vào dịch nổi trên bề mặt (nồng độ cuối là 1% (trọng lượng/thể tích)). Sau khoảng thời gian ủ 1 giờ ở 37°C trong khi vẫn khuấy ở tốc độ 220 vòng/phút, dung dịch này được ly tâm ở tốc độ 100.000g ở 4°C trong thời gian một giờ. Dịch nổi trên bề mặt được thu gom và được xác định là phần hòa tan trong sarcosyl. Phần kết viên được để cho khô ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút, sau đó được hòa tan trong dung dịch chứa 50mM Tris độ pH = 7,4 (trọng lượng não ban đầu là 20% thể tích/trọng lượng) và được xác định là phần không hòa tan trong PHF, phần này được bảo quản ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Phép đo ELISA: Tổng lượng tau của người và tau được phosphoryl hóa trong ba phần protein não được định lượng bằng kit ELISA thương mại (Life Technologies)

theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng số tau của người, tau của người được phosphoryl hóa trong threonin 231 (tau pT231), tau của người được phosphoryl hóa trong serin 199 (tau pS199) và tau của người được phosphoryl hóa trong threonin 181 (tau pT181) được phát hiện. Các mẫu của phần hòa tan được chuẩn hóa thành 1mg/ml trên cơ sở tổng lượng protein đo được bằng thử nghiệm protein BCA (Pierce) chứa 50mM Tris độ pH 7,4. Các phần phân ước của các mẫu đã được chuẩn hóa được tạo ra cho phương pháp đo ELISA và thẩm tách Western. Để tạo ra phần không hòa tan trong PHF đã được hòa tan dùng cho ELISA, 10µl PHFTau được ủ với 10µl dung dịch chứa guanidin hyđroclorua 8M ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ, sau đó bổ sung 180µl dung dịch chứa 50mM Tris 7,4. Phương pháp đo ELISA được thực hiện theo các quy trình tiêu chuẩn. Lượng tau trong mỗi mẫu được đo bằng ELISA được chuẩn tắc hóa thành trọng lượng não ban đầu dùng cho lần phân tích cuối cùng.

lượng dược chất trong huyết tương tại thời điểm cuối được đo bằng cách áp dụng ELISA kẹp (sandwich ELISA). Nói một cách ngắn gọn, rTau 3µg/ml (rPeptide) (SEQ ID NO: 6) trong dung dịch đệm phủ cacbonat ELISA 100nM (độ pH = 9,6) được ủ trong các đĩa ELISA nửa diện tích của Costar ở 4°C qua đêm. Các đĩa này được phong bế bằng dung dịch chứa 3% BSA trong PBS ở nhiệt độ trong phòng trong một giờ. Các mẫu huyết tương được pha loãng trong dung dịch chứa 3% BSA trong PBS chứa 0,1% Tween®20 đến 1:200, 1:400 và 1:800. Các dung dịch pha loãng theo bậc he Prch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) được sử dụng để tạo ra đường chuẩn. Sau thời gian ủ một giờ, các đĩa được rửa 4 lần bằng dung dịch chứa PBS chứa 0,1% Tween®20, sau đó ủ một giờ với IgGFcγ-HRP của lừa kháng kháng thể của chuột (theo tỷ lệ 1:10.000). Sau khi rửa, kháng thể đã liên kết được xác định thêm bằng thử nghiệm so màu tiêu chuẩn. Đường chuẩn được tạo ra bằng đường cong sigma được làm khớp bằng GraphPad Prism 5.

Thẩm tách Western: Các mẫu protein của ba phần được gia nhiệt ở 70°C trong 10 phút trong dung dịch đệm mẫu NuPAGE® LDS 4X (Life Technologies) và cùng một lượng của tổng lượng protein từ mỗi mẫu được điện di trên gel NuPAGE® 4% đến 12% (trọng lượng/thể tích). Sau khi chuyển bán khô protein sang màng PVDF, màng này được phong bế trong dung dịch chứa 3% BSA chứa 0,1% Tween-20 trong TBS và tiếp theo, được dò bằng các kháng thể kháng tau khác nhau ở 4°C qua đêm. Sau đó, các kháng thể thứ cấp được tiếp hợp với oxiđazaperoxiđaza được ủ ở nhiệt độ

trong phòng trong 1 giờ sau 4 lần rửa bằng TBST. Tiếp đó, các kháng thể đã liên kết được phát hiện theo phương pháp phát quang hóa học tăng cường (enhanced chemiluminescence - ECL) (Pierce). Phương pháp phân tích đo mật độ các phần thấm tách miễn dịch được thực hiện bằng chương trình National Institutes of Health ImageJ.

Mê lộ chữ Y thử nghiệm kép: các con chuột được thử nghiệm về trí nhớ không gian ngắn bằng cách áp dụng thử nghiệm mê lộ chữ Y thử nghiệm kép. Các nhánh của mê lộ dài 35cm, rộng 5cm và sâu 10cm. Manh mối trừu tượng được đặt trên màn xung quanh mê lộ. Các thử nghiệm được thực hiện với mức ánh sáng môi trường xung quanh là 6 luxơ. Trong suốt pha tiếp xúc, các con chuột được phân vào hai nhánh (nhánh bắt đầu và một nhánh khác), nhánh này có thể được khám phá một cách tự do trong toàn bộ thời gian 4 phút, mà không liền kề nhánh thứ ba (nhánh mới), được chặn lại bằng cửa được làm bằng cùng một chất liệu với mê lộ. Sau đó, các con chuột được đưa ra khỏi mê lộ và được giữ trong lồng nhốt trong thời gian 2 phút, khi mê lộ này được làm sạch bằng etanol 50%. Trong suốt pha thử nghiệm, các con chuột được đặt vào cuối nhánh bắt đầu và được phép tự do khám phá tất cả ba nhánh trong toàn bộ thời gian 4 phút. Pha thử nghiệm được ghi lại bằng phần mềm TSE videoMot2 để lần theo chuyển động trong video và phân tích hành vi của con chuột (TSE Systems, Bad Homburg, Đức). Số lần xâm nhập vào nhánh và thời gian ở lại trong nhánh mới được ghi lại. Trị số trung bình của số lần xâm nhập vào nhánh và thời gian ở lại trong hai nhánh kia mà đã mở trong suốt phiên luyện tập được tính. Tỷ lệ giữa số lần xâm nhập vào nhánh (hoặc thời gian ở lại trong) nhánh mới và trị số trung bình của hai nhánh kia được tính. Các con chuột đối chứng hoang mà không có sự suy giảm trí nhớ làm việc theo không gian thường có tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2 trong thử nghiệm này. Pennanen *et al.*, Genes Brain Behav 5(5):369-79 (2006).

Phân tích dữ liệu: Dữ liệu ELISA được biến đổi theo hàm logarit để đáp ứng giả định về độ chuẩn của phương pháp phân tích phương sai hai chiều. Mức khác biệt được xem là đáng kể nếu $p<0,05$.

ch4E4(N30Q) đã làm giảm một cách đáng kể tau hòa tan của người ở chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra: Các lượng tau của người ở các phần hòa tan trong DEA, hòa tan trong sarcosyl, và các phần không hòa tan của các chiết phẩm protein từ não được định lượng bằng ELISA. Đa số tau của người được tìm thấy trong phần hòa tan trong DEA (dữ liệu không được thể hiện). Tổng lượng tau của người (hTau) đã giảm

xuống ở phần hòa tan trong DEA từ các con chuột được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) so với tổng lượng tau của người của các con chuột được điều trị bằng PBS (tính trung bình mức giảm là 29% ở ch17C1(N31Q) và 37% ở ch4E4(N30Q), hình 12A). Cũng đã thấy sự giảm ở tau được phosphoryl hóa (pT231, pS199 và pT181) ở phần hòa tan trong DEA (lần lượt trên hình 12B, C và D). Trước đó, chúng tôi đã quan sát thấy mức biểu hiện tau của người thấp hơn ở các con chuột cái mắc bệnh do TauP301L gây ra so với các đối tượng đực tương đương của chúng. Do đó, để phân tích một cách chính xác dữ liệu, các tác giả sáng chế đã sử dụng ANOVA hai chiều mà giới tính và phương pháp điều trị là hai biến. Tác dụng đến giới tính được xác nhận với $p<0,01$ ở tất cả các phép đo tau hòa tan của người (tổng lượng tau của người, pS199, pT181 và tau pT231 của người). Không có sự tương tác giữa giới tính và phương pháp điều trị bệnh ($0,49 <p<0,91$ ở tất cả các phép đo tau hòa tan của người). Điều quan trọng là, đã có tác dụng điều trị đáng kể ở tan trong DEA của người ($p<0,05$ đối với hTau, pS199 và pT231, và $p=0,06$ đối với pT181). Tác dụng điều trị bệnh chủ yếu được thúc đẩy bởi ch4E4(N30Q). Nếu so với đối chứng PBS, ch4E4(N30Q) đã làm giảm một cách đáng kể hTau ($p<0,05$), pS199 ($p<0,01$), pT231 ($p<0,01$) và pT181 ($p<0,05$). Phương pháp đo ELISA bằng cách sử dụng phần không hòa tan trong sarcosyl đã cho thấy độ biến thiên cao trong số các con chuột, và đã không quan sát thấy tác dụng đến giới tính đáng kể nào. Đã không quan sát thấy tác dụng điều trị đáng kể nào trong phần không hòa tan trong sarcosyl. Tương tự, đã không quan sát thấy tác dụng điều trị đáng kể nào bằng ELISA trong phần hòa tan trong sarcosyl.

Phương pháp thẩm tách Western có sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu với tau của người Tau12 đã thể hiện tau có chiều dài đầy đủ của người, ở dạng dải đơn ở 62kDa, dưới dạng thành phần tau có tính phản ứng miễn dịch chính ở phần hòa tan trong DEA. Đã quan sát thấy sự giảm rõ ràng của tau có chiều dài đầy đủ của người ở đa số các con chuột được điều trị bằng ch4E4(N30Q) và ch17C1(N31Q). Trong phần không hòa tan trong sarcosyl, đã quan sát thấy dải 64 kDa và một vài dải có trọng lượng phân tử cao hơn khác, cũng như các dải có trọng lượng phân tử nhỏ hơn có lẽ tương ứng với các đoạn tau của người. Phương pháp phân tích đo mật độ đã cho thấy độ biến thiên cao trong số các con chuột riêng biệt, điều này ngăn chặn phương pháp so sánh định lượng bất kỳ. Tuy nhiên, đã có tổng mức giảm định tính ở tất cả các

protein tau của người trong phần không hòa tan trong sarcosyl được phát hiện bằng Tau12 ở các con chuột được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) (thẩm tách Western đại diện được thể hiện trên hình 13).

Mức độ dược chất trong huyết tương: các con chuột được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) với lượng 10mg/kg hằng tuần thông qua phương pháp tiêm trong màng bụng. Để đánh giá mức độ tiếp xúc với dược chất, các mẫu huyết tương được thu gom 24 giờ sau lần điều trị cuối. Các lượng dược chất trong huyết tương được đo bằng ELISA bằng cách sử dụng rTau làm tác nhân thu bắt. Lượng trong huyết tương trung bình của ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) lần lượt là 200µg/ml và 145µg/ml, cho thấy cả hai kháng thể đều có mức độ tiếp xúc tốt với máu (hình 14).

Điều trị bằng kháng thể và trí nhớ không gian: Một nghiên cứu trước đó đã cho thấy sự suy giảm trí nhớ tham chiếu không gian, tình trạng này phụ thuộc vào vùng não đồi hải mã, ở các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra (Pennanen *et al.*, *Genes Brain Behav* 5(5):369-79 (2006)). Mê lộ chữ Y thử nghiệm kép được ghi nhận là thử nghiệm nhạy để phát hiện tình trạng suy giảm trí nhớ không gian trong thời gian ngắn ở chuột có gen chuyển tau (Troquier *et al., Curr Alzheimer Res.* 9 (4):397-405 (2012)). Trong suốt pha tiếp xúc, tất cả các nhóm đã khám phá mê lộ ngang nhau, bỏ ra thời lượng tương tự ở mỗi nhánh sẵn có (dữ liệu không được thể hiện). Đã không phát hiện thấy sự khác biệt nào khi so sánh khoảng cách di chuyển. Trong suốt pha thử nghiệm, các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được điều trị bằng PBS đã thực hiện số lần xâm nhập ở nhánh mới hầu như ngang bằng với trị số trung bình của hai nhánh kia đã khám phá trong suốt pha tiếp xúc, (tỷ lệ=1,18), cho thấy trí nhớ làm việc theo không gian kém ở chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được điều trị bằng PBS. Cả chuột được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và chuột được điều trị bằng ch4E4(N30Q) đều thể hiện sở thích đối với nhánh mới so với hai nhánh kia, và chúng đã thực hiện nhiều lần xâm nhập vào nhánh mới hơn so với trị số trung bình của hai nhánh kia (tỷ lệ=1,50 đối với ch17C1(N31Q) và 1,30 đối với ch4E4(N30Q)). Tỷ lệ xâm nhập vào nhánh mới ở các con chuột mắc bệnh do TauP301L gây ra được điều trị bằng ch17C1(N31Q) và ch4E4(N30Q) so với tỷ lệ xâm nhập vào nhánh mới của nhóm đã được điều trị bằng PBS được thể hiện trên hình 15.

Sáng chế không bị giới hạn về phạm vi bởi các phương án nhất định được mô tả mà theo dự định, các phương án này chỉ đơn thuần là các minh họa về từng khía cạnh của sáng chế, và các chế phẩm hoặc phương pháp bất kỳ mà tương đương về chức năng đều trong phạm vi của sáng chế. Thực vậy, các cải biến khác nhau của sáng chế, ngoài các loại được thể hiện và mô tả trong bản mô tả này, sẽ trở nên dễ thấy đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này nhờ phần mô tả nêu trên và các hình vẽ kèm theo. Theo dự định, các cải biến này cũng nằm trong phạm vi bảo hộ được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) chứa các vùng xác định tính bổ trợ (CDR) 1, 2, và 3 của VH và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) chứa các CDR 1, 2, và 3 của VL, trong đó:

(a) các CDR 1, 2, và 3 của VH bao gồm các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87, và các CDR 1, 2, và 3 của VL bao gồm các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89, và SEQ ID NO:90; hoặc

(b) các CDR 1, 2, và 3 của VH bao gồm các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, và các CDR 1, 2, và 3 của VL bao gồm các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:107, và SEQ ID NO:108.

2. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm 1, trong đó:

(a) VH bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:48 và

VL bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49; hoặc

(b) VH bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47 và

VL bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49;

(c) VH bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:54 và

VL bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:55; hoặc

(d) VH bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:220 và

VL bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:55.

3. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó:

(a) VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:48 và

VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49; hoặc

(b) VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:47 và

VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:49;

(c) VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:54 và

VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:55; hoặc

(d) VH bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:220 và

VL bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:55.

4. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:218 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:219.

5. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau này được chọn từ nhóm gồm Fab, Fab', F(ab')2, Fd, Fv, Fv chuỗi đơn (scFv), kháng thể chuỗi đơn, và Fv được liên kết đisulfua (sdFv).

6. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng tau này hoặc đoạn liên kết tau của nó chứa vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 người và vùng hằng định của chuỗi nhẹ lamda người.

7. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 và 5, trong đó kháng thể kháng tau này hoặc đoạn liên kết tau của nó chứa vùng hằng định của chuỗi nhẹ lamda người.

8. Kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể kháng tau này hoặc đoạn liên kết tau của nó chứa polyetylen glycol hoặc nhãn phát hiện được được chọn từ nhóm gồm enzym, đồng vị

phóng xạ, hợp chất huỳnh quang, hợp chất phát quang hóa học, hợp chất phát quang sinh học, và kim loại nặng.

9. Dược phẩm chứa kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, và chất mang dược dụng.

10. Polynucleotit được phân lập chứa trình tự nucleotit hoặc các trình tự nucleotit mã hóa kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

11. Polynucleotit theo điểm 10, trong đó polynucleotit này chứa:

(a) trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:173 và/hoặc SEQ ID NO:174; hoặc

(b) trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:179 và/hoặc SEQ ID NO:180.

12. Vectơ biểu hiện chứa polynucleotit theo điểm 10 hoặc 11.

13. Tế bào chủ được phân lập chứa vectơ biểu hiện theo điểm 12 hoặc polynucleotit theo điểm 10 hoặc 11.

14. Phương pháp tạo ra kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó, phương pháp này bao gồm các bước:

nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 13 trong môi trường nuôi cấy tế bào; và

phân lập kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau của nó từ môi trường nuôi cấy tế bào này.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước bào chế kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau này thành dược phẩm vô trùng thích hợp để cấp cho đối tượng là người.

16. Chế phẩm chứa kháng thể kháng tau hoặc đoạn liên kết tau theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 dùng để chẩn đoán *in vivo* các bệnh liên quan đến tau ở đối tượng là người khi cần.

Hình 1

A) NI-105.4E4-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH; SEQ ID NO:9)

```
--FR1-------------------------CDR1----FR2---------CDR2-------
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSHNYATLY

--------FR3-------------------------------CDR3------JH-------
AASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSSLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGQGTLVTVSS
```

NI-105.4E4-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL; SEQ ID NO:11)

```
--FR1-------------------CDR1-------FR2------------CDR2---FR3--
SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAPVLVIYKDTERPSGIPERFS
LPV
------------------------CDR3------JK--------
GSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCLSADNSATWVFGGGTKVTVL
```

B) NI-105.24B2-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH; SEQ ID NO:13)

```
FR1-------------------------CDR1-FR2-----------CDR2---------
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFVNYIIHWVRQAPGQGLEWMGIINPNGGNTSYAE
E
----FR3-------------------------------CDR3--JH---------
KFQARVTLTSDTSTSTVYMDLSSLTSEDTAVYYCAVLSPSNPWGQGTTVTVSS
```

NI-105.4E4-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL; SEQ ID NO:15)

```
FR1-------------------CDR1-------FR2------------CDR2---FR3----
SYELTQPPSVSVSPGQTAGITCSGDALPKQFVYWYQKKPGQAPVLLIYKDTERPSRIPERFS
V
------------------------CDR3-------JK--------
GSTSGTTVALTINGVQAEDEADYYCQSADRSGALWVFGGGTKLTVL
```

C) NI-105.4A3-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH; SEQ ID NO:17)

```
FR1-------------------------CDR1-FR2-----------CDR2---------
QVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMHWVRQAPGKGLQWVAVISYEGTYKYYAD
E     T
----FR3-------------------------------CDR3-------------JH-------
SVKGRFTISRDNSKNTLNLQMSSLRVEDTAVYFCVKARAFASGQRSTSTVPDYWGQGTLVTV

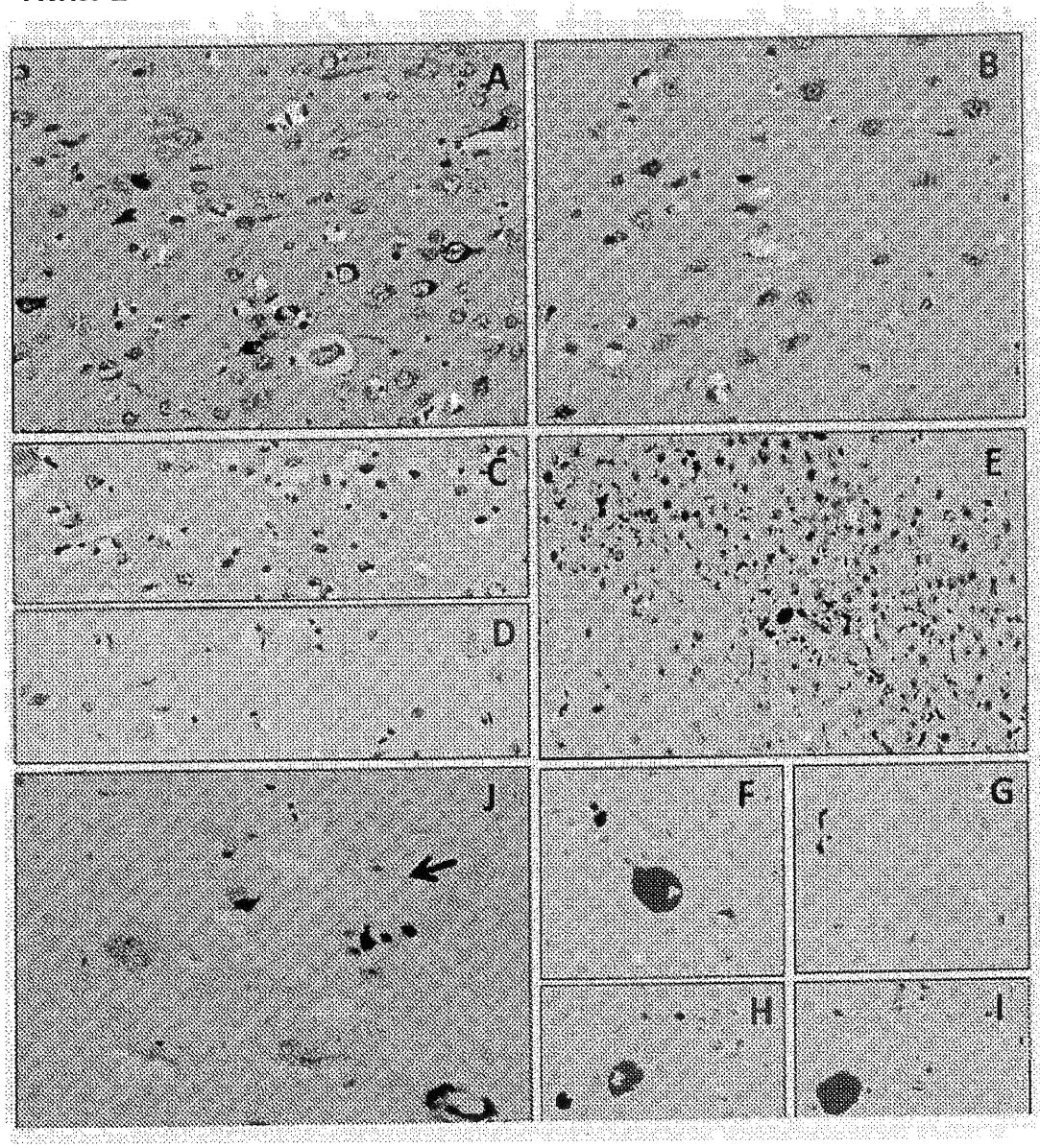
SS
```

NI-105.4A3-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL; SEQ ID NO:19)

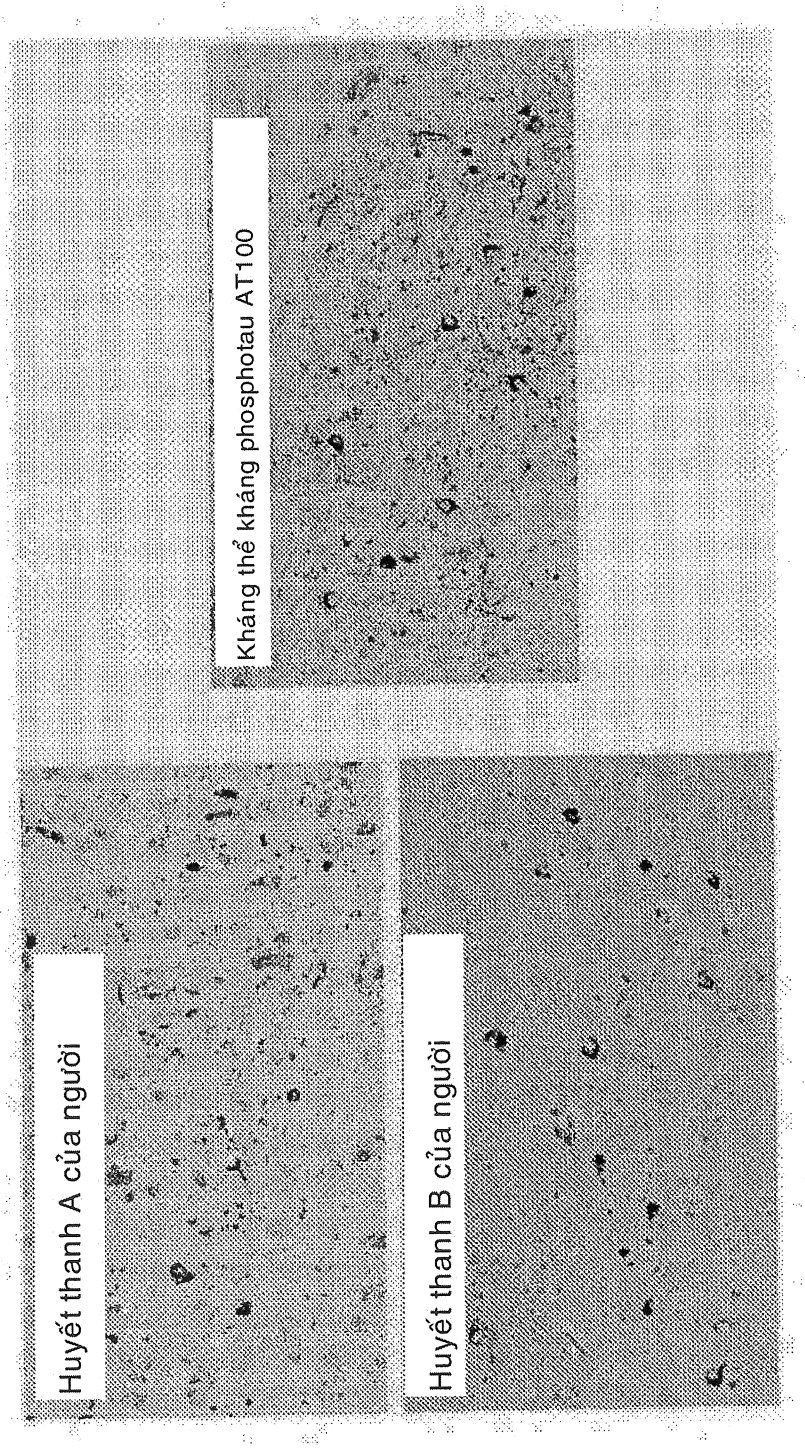
```
FR1-------------------CDR1-------FR2------------CDR2---FR3----
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDNKRPSGIPERFS

------------------------CDR3-------JK--------
GSSSGTVATLTISGAQVDDEADYYCYSTDISGDLRVFGGGTKLTVL
```

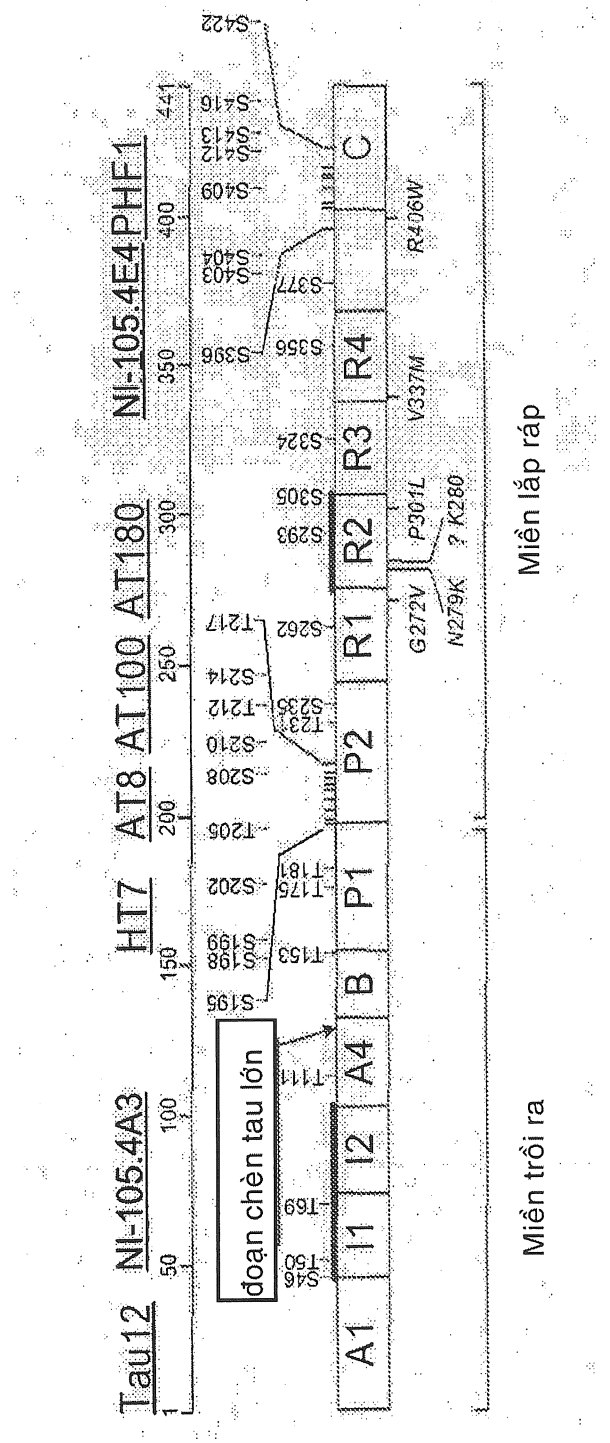
Hình 2



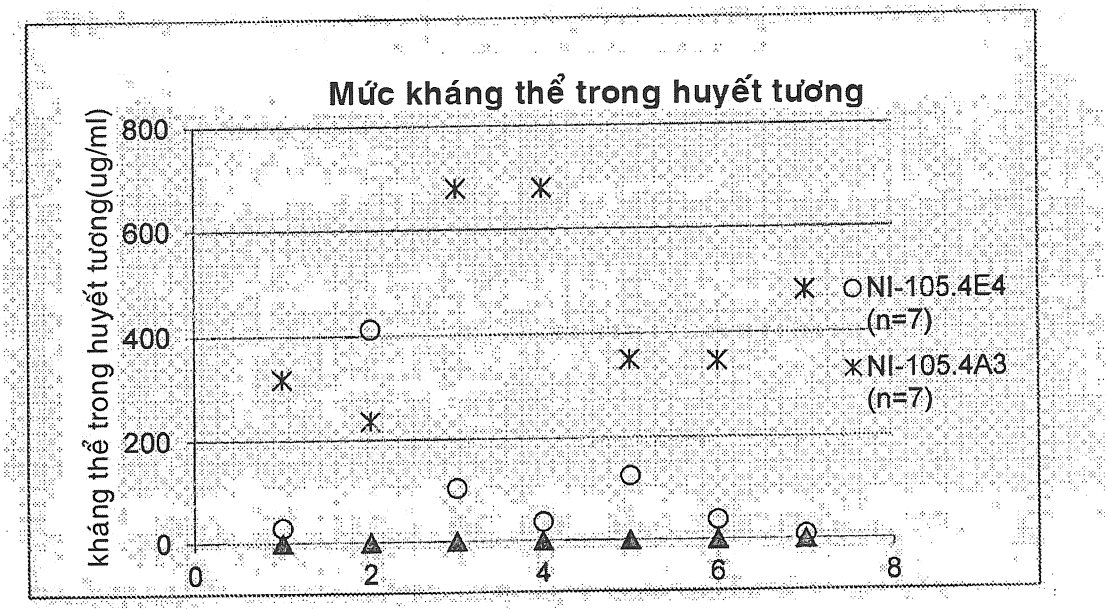
Hình 3


Kháng thể kháng phosphotau AT100
Huyết thanh A của người
Huyết thanh B của người

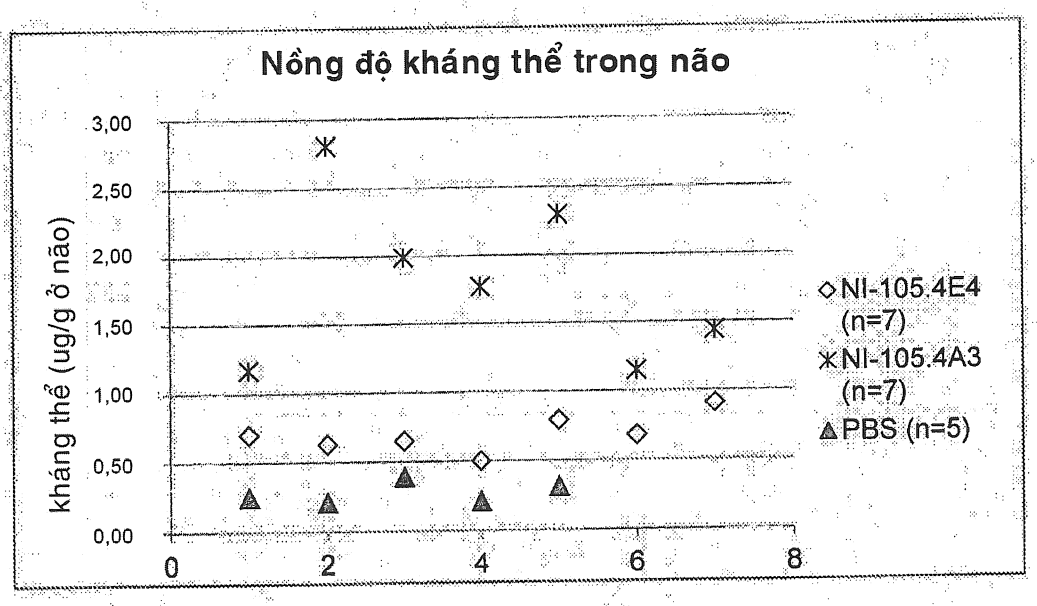
Hình 4


Tau12
NI-105.4A3
HT7
AT8
AT100
AT180
NI-105.4E4PHF1
A1
I1
I2
A4
B
P1
P2
R1
R2
R3
R4
C
đoạn chèn tau lớn
Miền trồi ra
Miền lắp ráp
G272V
P301L
V337M
R406W
N279K
? K280

Hình 5


Mức kháng thể trong huyết tương
kháng thể trong huyết tương(ug/ml)
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
NI-105.4E4 (n=7)
NI-105.4A3 (n=7)

Hình 6


Nồng độ kháng thể trong não
kháng thể (ug/g ở não)
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
0
2
4
6
8
NI-105.4E4 (n=7)
NI-105.4A3 (n=7)
PBS (n=5)

Hình 7A đến 7C

Hình 7A

NI-105.17C1 VH (SEQ ID NO:44)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKAFGYSFTNFWIGWVRQVPGKGLEWVGIIYPGDSD
TRYSPSFQGQVTISADKSIDTAYLQWGHLKASDSAMYFCARRGFWTGSQIEYWGQG
TQVTVSS

NI-105.17C1 VL (SEQ ID NO:46)
QSALTQPPSASGSPGHSVTISCTGTSSDVGNYSFVSWYQQYPGKAPKVIIYDVSKRS
SGVPDRFFGSKSANTASLTVSGVQEEDEADYFCSSYGGSKYPWVFGGGTKLTVL

Hình 7B

NI-105.6C5 VH (SEQ ID NO:48)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRVSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFD
GSNEFYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGASVTTSNAEN
FHHWGQGTLVTVSS

NI-105.6C5 VL (SEQ ID NO:49)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKRYVYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGI
PETFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTDSNGHHWVFGGGTKLTVL

Hình 7C

NI-105.29G10 VH (SEQ ID NO:50)
EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFDFSGYSMAWVRQAPGKGLEWVSYISGTY
VSGGTGTMYYLDSVKGRFFISRDDATSSLYLQMDSLRDEDTAVYYCARVYDYGEDW
GQGTLVTVSS

NI-105.29G10 VK (SEQ ID NO:51)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSRSVLYSSNSKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYGTPRTFGQGTKVEIK

Hình 7D đến 7F

Hình 7D

NI-105.6L9 VH (SEQ ID NO:52)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGTRFTFSTYAMGWVRQAPGRGLEWVSAIGGSG
DSTSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGVYDYLWGSYRLF
DYWGQGTLVTVSS

NI-105.6L9 VL (SEQ ID NO:53)
SYVLTQPPSVSVAPGQTARFTCGGNNIASKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPS
RIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSTSDHVVFGGGTKLTVL

Hình 7E

NI-105.40E8 VH (SEQ ID NO:54)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPNYVMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSG
GSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTALYYCAKGSGGIRGQGTMVT
VSS

NI-105.40E8 VL (SEQ ID NO:55)
QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWHQQHPGKAPKLLIYDVTKR
PSGVPDRFSGSKSGNTAALTISGLQAEDEADYYCHSYVGSYTLVFGGGTKLTVL

Hình 7F

NI-105.48E5 VH (SEQ ID NO:56)
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKA
NSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSPTVTTEVWGQG
TLVTVSS

NI-105.48E5 VK (SEQ ID NO:57)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKDYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVSDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPITFGQGTRLEIK

Hình 7G đến 7I

Hình 7G

NI-105.6E3 VH (SEQ ID NO:58)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIGSSGMTFSSYAFNWVRQTPGKGLEWVSSISRFG
STVDYTDSVRGRFTISRDDGQRSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRSTASGSRSPGIIWG
QGTTVTVSS

NI-105.6E3 VK (SEQ ID NO:59)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIVNNLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQGG
VPSKFSGSASGTDFSLTISNLQPEDFATYFCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK

Hình 7H

NI-105.22E1 VH (SEQ ID NO:60)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
DTRYSPSYQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTGMYYCARVAGDIGYENYYYYG
MDVWGQGTTVTVSS

NI-105.22E1 VK (SEQ ID NO:61)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYGSNNKNYLAWYQQKLGQSPKLLIYWA
SARESGVPDRFGGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK

Hình 7I

NI-105.26B12 VH (SEQ ID NO:62)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTRYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYD
GTNKYYADSLQGRFTISRDTSTNTLYLQMNGLRVEDRAVYYCAREGFQGAIDYWGQ
GTLVTVSS

NI-105.26B12 VK (SEQ ID NO:64)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNILYSSDNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSIPRTFGQGTKVEIK

Hình 7J đến 7L

Hình 7J

NI-105.12E12 VH (SEQ ID NO:65)
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFSFSDSAFHWARQASGKGLEWVGRIRSKG
NNYATAYAASVKGRFTVSRDDSKNTTYLQMNSLKTDDTAIYYCTRQGPSYGGINWG
LGTLVTVSS

NI-105.12E12 VK (SEQ ID NO:66)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTILYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLRAEDVAVYYCQQYYSSPQTFGQGTKVEIK

Hình 7K

NI-105.60E7 VH (SEQ ID NO:67)
EVQLVESGGGFVRPGGSITLSCATSGFTFTKAWMTWVRQAPVKGLEWIGHIKTRIEG
ATTDYAAPVEGRFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDSGIYYCSTDFDYWGQGTLVTV
SS

NI-105.60E7 VK (SEQ ID NO:68)
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCTSSQSLLYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLMYKV
SKRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLSISRVEAEDVGVYYCMQGSLWPRYTFGQGTKVEI
K

Hình 7L

NI-105.14E2 VH (SEQ ID NO:69)
EVQLVQSGAEVKKPGDSLRISCKASGYNFPNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
DIRYSPSFQGHVTISSDKSITTAYLQWTSLKVADSAMYYCARVERPDKGGWFGPWG
QGTLVTVSS

NI-105.14E2 VK (SEQ ID NO:70)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLYTSNNQNYLAWYQHKPGQPPKVLIYWA
STREYGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQYYNSPYTFGQGTKLEIK

Hình 7M đến 7O

Hình 7M

NI-105.39E2 VH (SEQ ID NO:71)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMNWVRQAPGKGLEWVAHITGSG
TPIFYADSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRNDDTALYFCVRGTVDYWGQGTLVTV
SS

NI-105.39E2 VL (SEQ ID NO:72)
QAGLTQPPSVSKDLRQTATLTCSGNSNNVGNQGAAWLQQFPGHPPKLLFYENINRP
SGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYYCSAWDGHLNAWVFGGGTKLTVL

Hình 7N

NI-105.19C6 VH (SEQ ID NO:73)
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFISYWVGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS
DTRYSPSFEGQVSISADKSISTAYLQWTSLKASDTAMYYCARHWGPAAVTDSPWFG
PWGQGTLVTVSS

NI-105.19C6 VK (SEQ ID NO:74)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYTSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHYYSTPFTFGPGTKVDIK

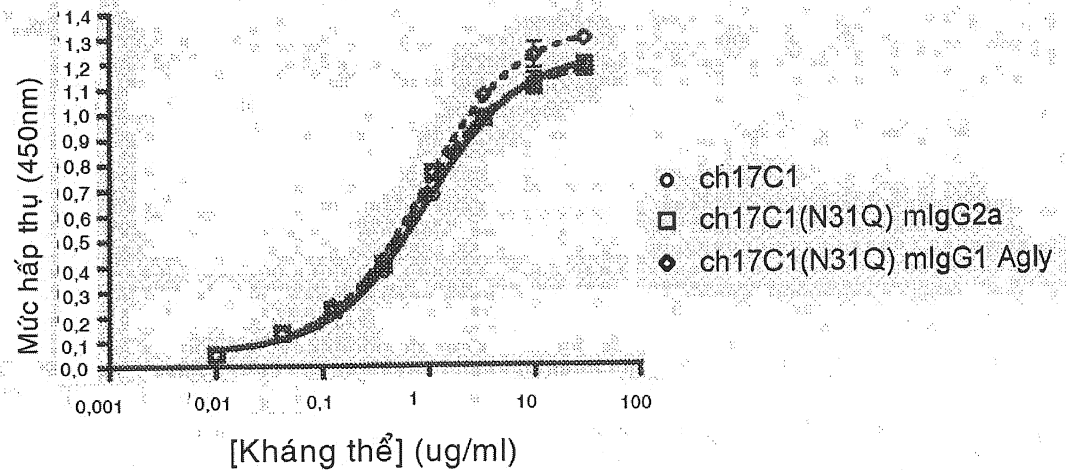
Hình 7O

NI-105.9C4 VH (sau khi chỉnh sửa đột biến do đoạn mồi kích thích) (SEQ ID NO:76)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAFFMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDS
GATKYAHNFQGRVTMTRDTSISTAFMELSGLKSDDTGVYYCATGMAVTGNFWGQG
TLVTVSS

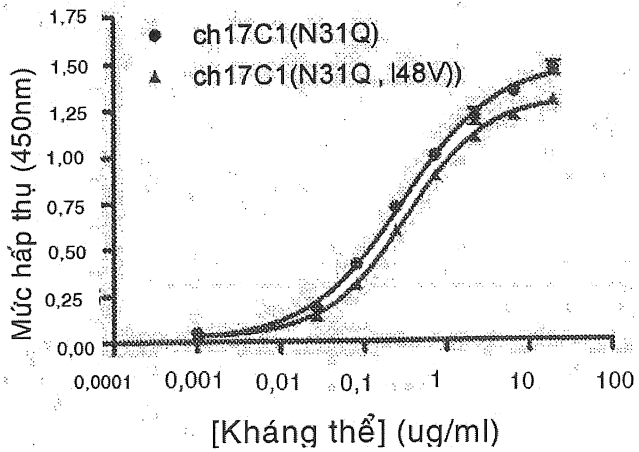
NI-105.9C4 VL (sau khi chỉnh sửa đột biến do đoạn mồi kích thích) (SEQ ID NO:78)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAETYARWFQQKPGQAPVLVMYRDRERPAG
IPERFSGSSSGNTVTLTISGAQAEDEAVYHCHSVADNNLDWVFGGGTKLTVL

Hình 8A đến 8B

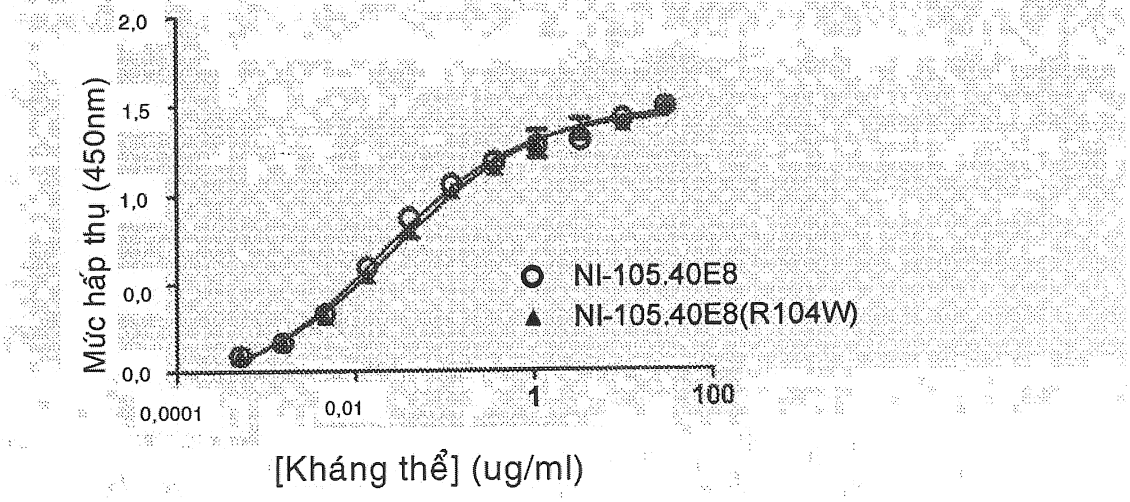
A)



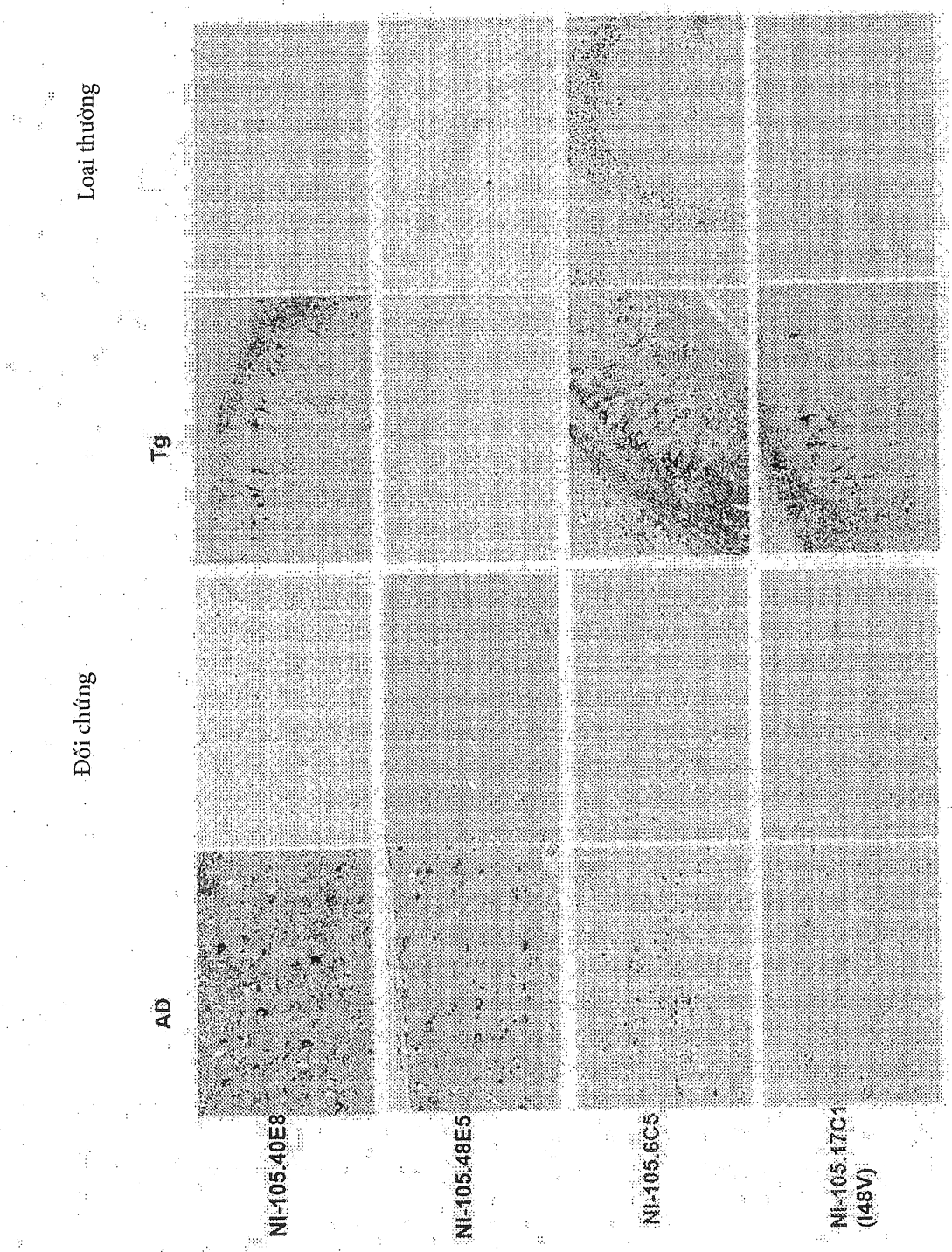
B)



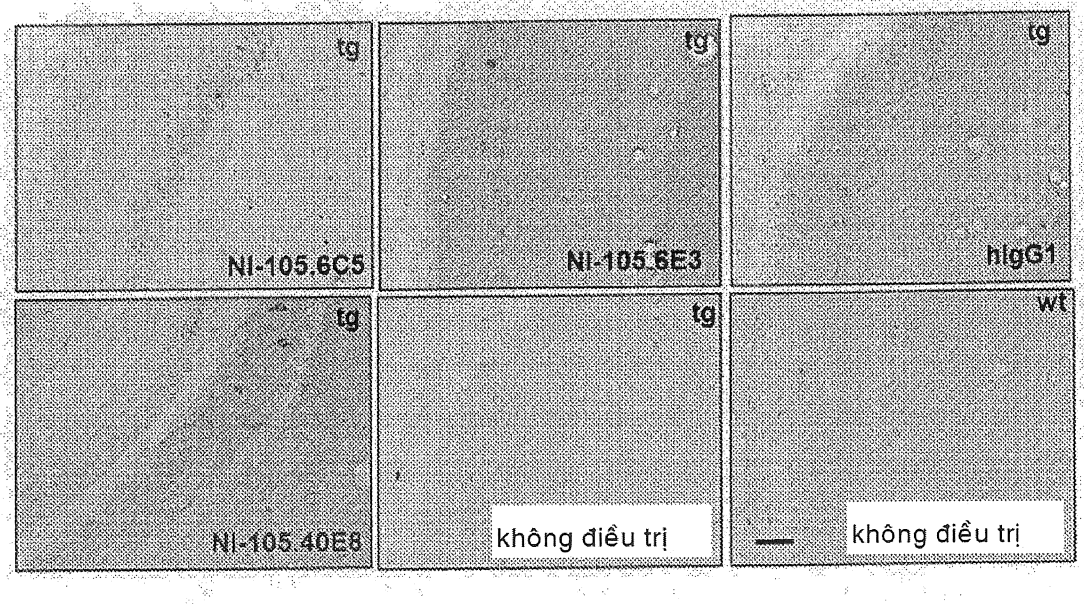
Hình 9


Mức hấp thụ (450nm)
2,0
1,5
1,0
0,0
0,0
0,0001
0,01
1
100
[Kháng thể] (ug/ml)
NI-105.40E8
NI-105.40E8(R104W)

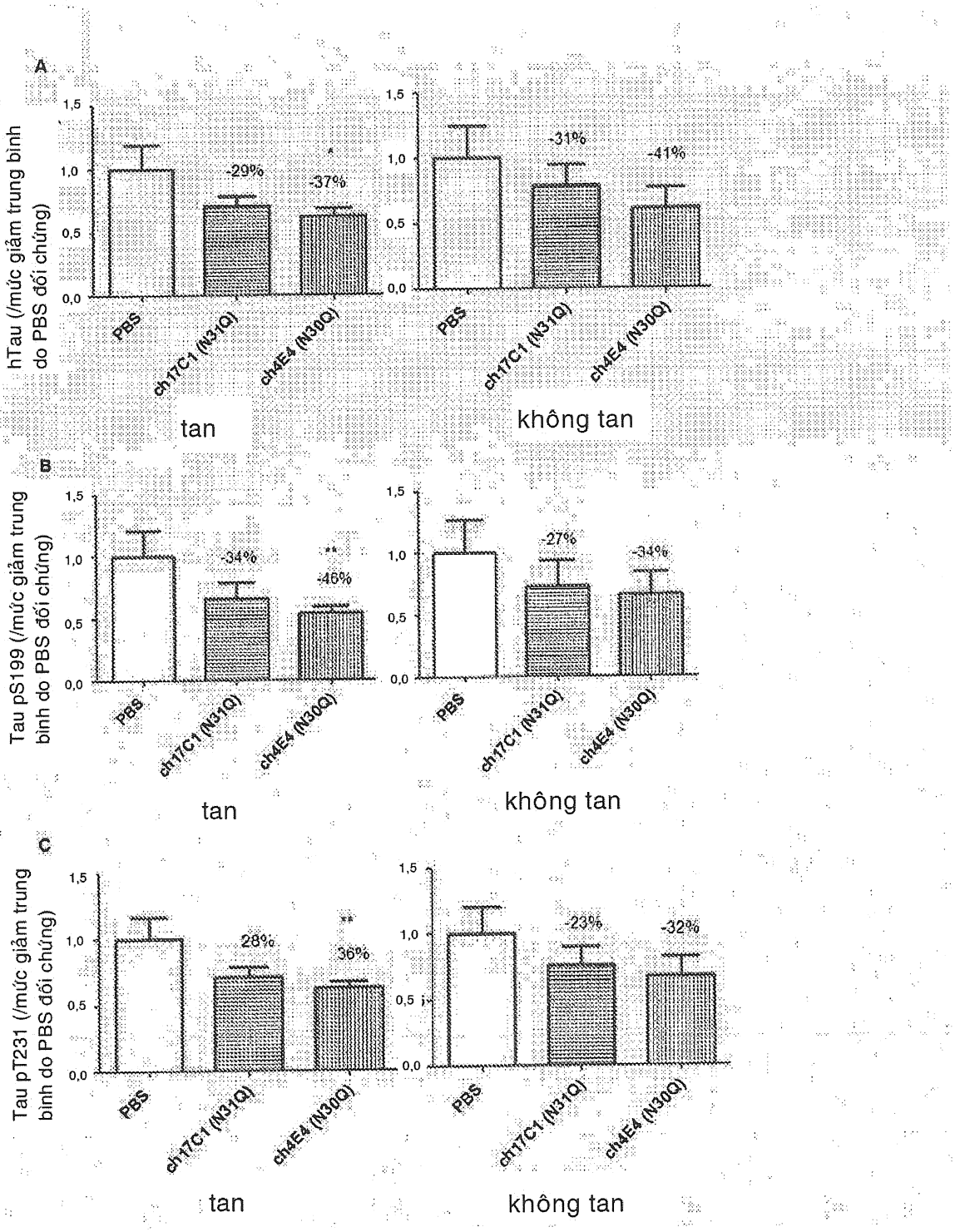
Hình 10


Đối chứng
Loại thường
AD
Tg
NI-105.40E8
NI-105.48E5
NI-105.6C5
NI-105.17C1
(I48V)

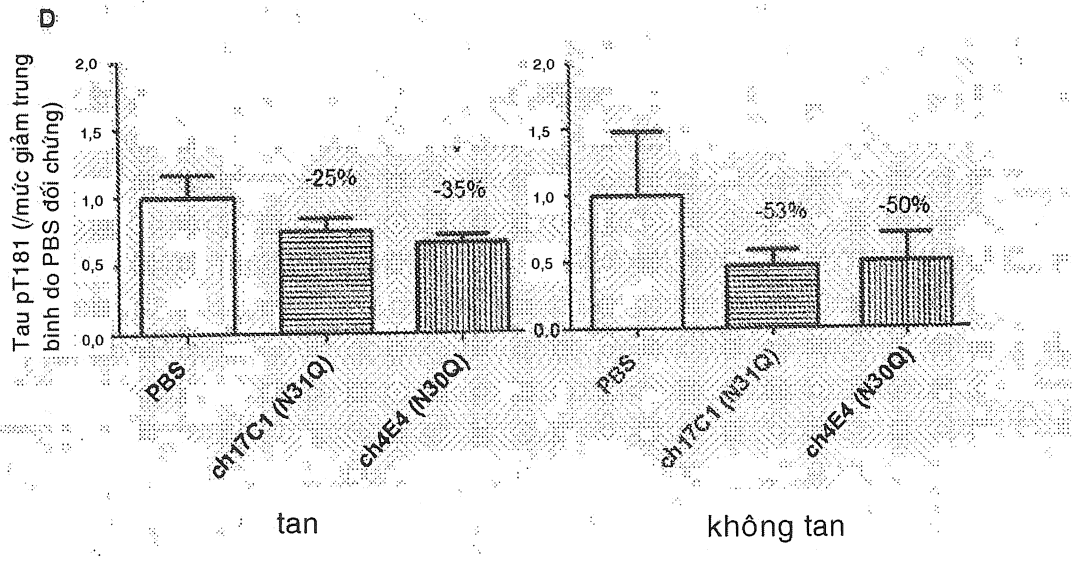
Hình 11


tg
NI-105.6C5
tg
NI-105.6E3
tg
hIgG1
tg
NI-105.40E8
tg
không điều trị
wt
không điều trị

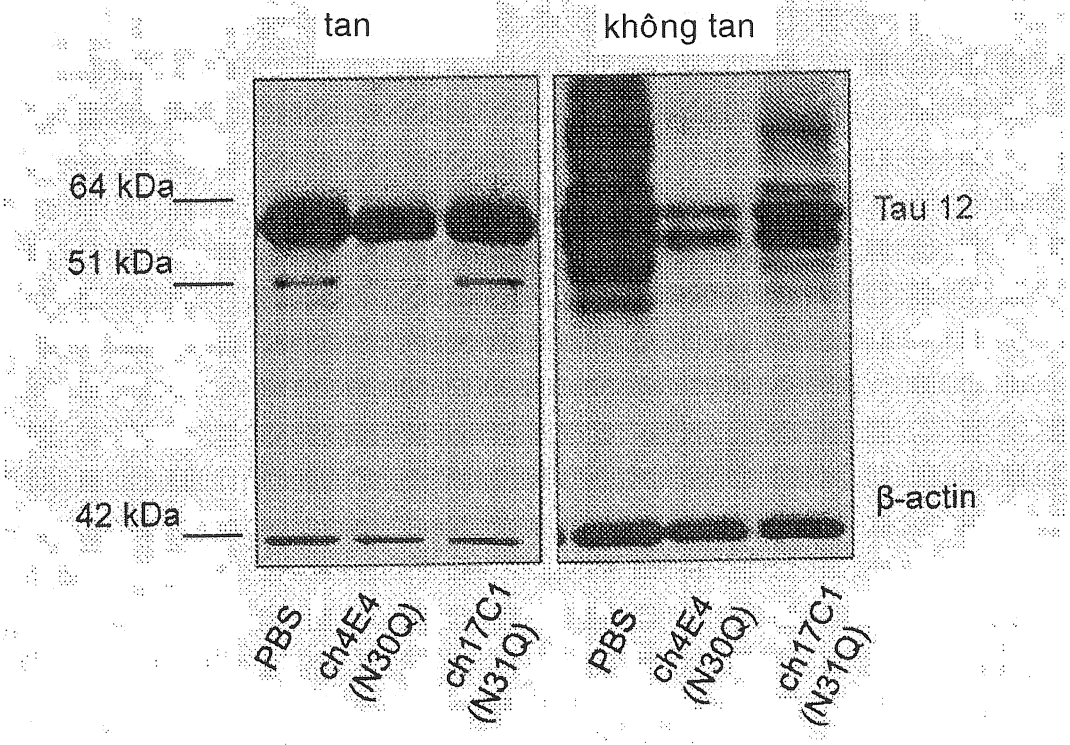
Hình 12A đến 12C



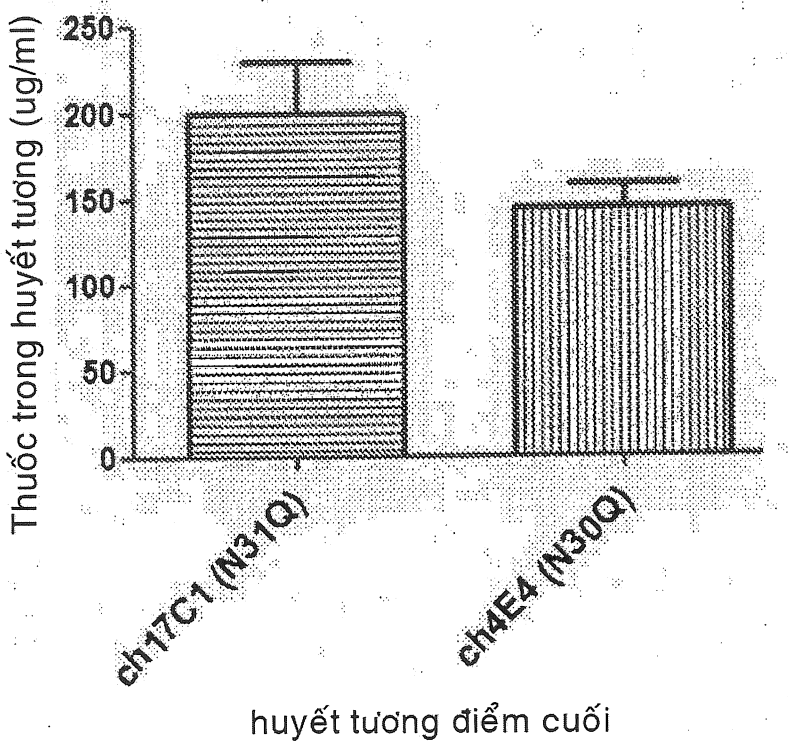
Hình 12D


D
Tau pT181 (/mức giảm trung bình do PBS đối chứng)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-25%
-35%
-53%
-50%
PBS
ch17C1 (N31Q)
ch4E4 (N30Q)
tan
không tan

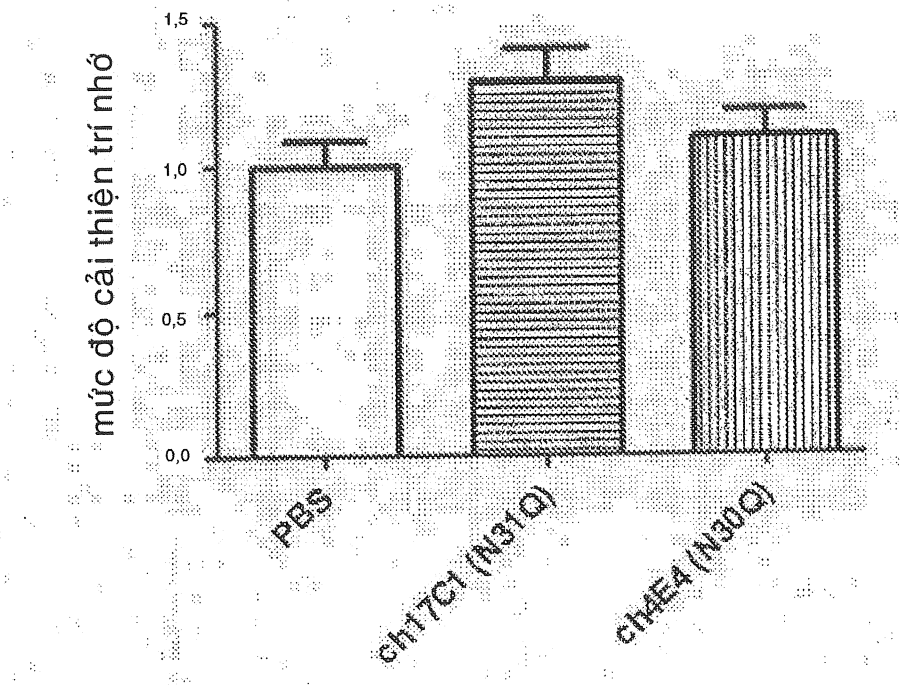
Hình 13


tan
không tan
64 kDa
51 kDa
42 kDa
Tau 12
β-actin
PBS
ch4E4 (N30Q)
ch17C1 (N31Q)
PBS
ch4E4 (N30Q)
ch17C1 (N31Q)

Hình 14


Thuốc trong huyết tương (ug/ml)
250
200
150
100
50
0
ch17C1 (N31Q)
ch4E4 (N30Q)
huyết tương điểm cuối

Hình 15



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Biogen Idec MA Inc.
Biogen Idec International Neuroscience GmbH
Weinreb, Paul H.
Chen, Feng
Garber, Ellen A.
Grimm, Jan
Montrasio, Fabio

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG TAU VÀ POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP CHỨA TRÌNH TỰ NUCLEOTIT MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 2159.404PC01

<140> sẽ được cấp
<141> kèm ở đây

<150> 61/745,410
<151> 2012-12-21

<160> 224

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 352
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(352)
<223> Dạng tương đồng tau thai nhi

<300>
<301> Goedert M., Wischik C., Crowther R., Walker J., Klug A.
<302> Tạo dòng thuần và giải trình tự ADN bổ trợ mã hóa protein lõi của sợi xoắn theo cặp trong bệnh Alzheimer: nhận diện là protein tau gắn liền với vi cấu trúc hình ống.

<303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
<304> 85
<306> 4051-4055
<307> 1988-06-01

<300>
<308> P10636-2
<309> 2010-10-05
<313> (1)..(352)

<400> 1

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 Ala Glu Glu Ala
        35                  40                  45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
    50                  55                  60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65                  70                  75                  80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
                85                  90                  95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
            100                 105                 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
        115                 120                 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
    130                 135                 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145                 150                 155                 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
            180                 185                 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
        195                 200                 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
    210                 215                 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225                 230                 235                 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
                245                 250                 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
```

260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

<210> 2
<211> 381
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(381)
<223> Dạng tương đồng Tau-B

<300>
<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.
<302> Nhiều dạng tương đồng của protein tau gắn liền với vi cấu trúc hình ống của người:các trình tự và tình trạng định vị ở đám rối sợi thần kinh của bệnh Alzheimer.
<303> Neuron
<304> 3
<306> 519-526
<307> 1989-10-01

<300>
<308> P10636-4
<309> 2010-10-05
<313> (1)..(381)

<400> 2

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 Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65                  70                  75                  80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
                85                  90                  95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
            100                 105                 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
        115                 120                 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
    130                 135                 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145                 150                 155                 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
                165                 170                 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
            180                 185                 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
        195                 200                 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
    210                 215                 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225                 230                 235                 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
                245                 250                 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
        275                 280                 285
```

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 3
<211> 410
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(410)
<223> Dạng tương đồng Tau-C

<300>
<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.
<302> Nhiều dạng tương đồng của protein tau gắn liền với vi cấu trúc hình ống của người: các trình tự và tình trạng định vị ở đám rối sợi thần kinh của bệnh Alzheimer.
<303> Neuron
<304> 3
<306> 519-526
<307> 1989-10-01

<300>
<308> P10636-5
<309> 2010-10-05
<313> (1)..(410)

<400> 3

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 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
305 310 315 320

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
325 330 335

Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
340 345 350

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
355 360 365

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
370 375 380

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405 410

<210> 4
<211> 383
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(383)
<223> Dạng tương đồng Tau-D

<300>
<301> Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.-C., Ulrich J., Crowther R.A.
<302> Tạo dòng thuần và giải trình tự ADN bổ trợ mã hóa dạng tương đồng của protein tau gắn liền với vi cấu trúc hình ống chứa bốn đơn vị lặp lại nối tiếp: mức biểu hiện khác biệt của ARN thông tin protein tau ở não người.
<303> EMBO J.
<304> 8
<306> 393-399
<307> 1989-02-01

<300>

<308> P10636-6
<309> 2010-10-05
<313> (1)..(383)

<400> 4

```
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 Ala Glu Glu Ala
        35                  40                  45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
    50                  55                  60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65                  70                  75                  80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
                85                  90                  95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
            100                 105                 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
        115                 120                 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
    130                 135                 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145                 150                 155                 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
                165                 170                 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
            180                 185                 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
        195                 200                 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
    210                 215                 220
```

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
245 250 255

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 5
<211> 412
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(412)
<223> Dạng tương đồng Tau-E

<300>
<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.
<302> Nhiều dạng tương đồng của protein tau gắn liền với vi cấu trúc hình ống của người: các trình tự và tình trạng định vị ở đám rối sợi thần kinh của bệnh Alzheimer.
<303> Neuron
<304> 3
<306> 519-526

<307> 1989-10-01

<300>
<308> P10636-7
<309> 2010-10-05
<313> (1)..(412)

<400> 5

```
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 Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65                  70                  75                  80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
                85                  90                  95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
            100                 105                 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
        115                 120                 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
    130                 135                 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145                 150                 155                 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
                165                 170                 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
            180                 185                 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
        195                 200                 205
```

```
Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
    210                 215                 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225                 230                 235                 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
                245                 250                 255

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
            260                 265                 270

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
        275                 280                 285

Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
    290                 295                 300

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
305                 310                 315                 320

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
                325                 330                 335

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
            340                 345                 350

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
        355                 360                 365

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
    370                 375                 380

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
385                 390                 395                 400

Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
                405                 410
```

<210> 6
<211> 441
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(441)

<223> Dạng tương đồng Tau-F

<300>
<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.
<302> Nhiều dạng tương đồng của protein tau gắn liền với vi cấu trúc hình ống của người: các trình tự và tình trạng định vị ở đám rối sợi thần kinh của bệnh Alzheimer.
<303> Neuron
<304> 3
<306> 519-526
<307> 1989-10-01

<300>
<308> P10636-8
<309> 2010-10-05
<313> (1)..(441)

<400> 6

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

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Epitop được nhận biết bởi kháng thể NI-105.4E4

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(7)
<223> Epitop NI-105.4E4

<400> 7

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
1 5

<210> 8
<211> 363
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)
<223> NI-105.4E4-VH trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH)

<220>
<221> Vùng V
<222> (91)..(105)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Vùng V
<222> (148)..(204)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Vùng V
<222> (301)..(330)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR3

<400> 8
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg gga
48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

```
tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc aat ttc aac atc tct
96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Ile Ser
            20                  25                  30

gct ata cac tgg gtc cgc cag gct tcc ggg aaa ggg ctg gag tgg gtt
144
Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

ggc cga ata aga agt aaa tct cac aat tac gcg act tta tat gct gcg
192
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

tcc ctg aaa ggc cgg ttc acc ctc tcc aga gat gat tca agg aac acg
240
Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
65                  70                  75                  80

gcg tat ctg caa atg agc agc ctg caa acc gag gat atg gcc gtc tat
288
Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr
                85                  90                  95

tac tgt act gtt ctg agt gcg aat tac gac acc ttt gac tac tgg ggc
336
Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg
363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 9

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Ile Ser
            20                  25                  30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
```

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 321
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của NI-105.4E4-VL trong đó trình tự axit amin Ser-Tyr-Glu ở các vị trí 1-3 cũng có thể là Leu-Pro-Val

<220>
<221> Vùng V
<222> (67)..(99)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>
<221> Vùng V
<222> (145)..(165)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>
<221> Vùng V
<222> (262)..(291)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 10
tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag
48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

acg gcc agg atc tcc tgc ttt gga gat aca ttg cca aag caa tat act
96
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr
20 25 30

tat tgg tat cag cag aag cct ggc cag gcc cct gtg tta gtg att tat
144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

aaa gac act gag agg ccc tca ggg atc ccc gag cga ttc tct ggc tcc
192

```
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

agc tca ggg aca aca gtc acc ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa
240
Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65                  70                  75                  80

gac gag gct gac tat tac tgt cta tca gct gac aac agt gct act tgg
288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp
                85                  90                  95

gtg ttc ggc gga ggg acc aag gtg acc gtc cta
321
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105


<210>  11
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Người hiện đại

<400>  11

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr
            20                  25                  30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
        35                  40                  45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp
                85                  90                  95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105


<210>  12
<211>  345
<212>  ADN
<213>  Người hiện đại

<220>
```

<221> CDS
<222> (1)..(345)
<223> NI-105.24B2-VH trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) trong đó Gln ở vị trí 1 của trình tự này cũng có thể là Glu

<220>
<221> Vùng V
<222> (91)..(105)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Vùng V
<222> (148)..(198)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Vùng V
<222> (295)..(312)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR3

<400> 12
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc
48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tcg gtg aag gtt tcc tgt aag gca tct gga tac acc ttc gtc aat tac
96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn Tyr
20 25 30

att ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg
144
Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

gga atc atc aat cct aat ggc gga aac aca agt tat gca gag aaa ttc
192
Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

cag gcc cga gtc acc ttg acc agc gac acg tct acg agt acg gtg tac
240
Gln Ala Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

atg gac ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtc tat tac tgt
288
Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc gtc ctt tcc cct tcg aat ccc tgg ggc cag ggg acc acg gtc acc
336
Ala Val Leu Ser Pro Ser Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

gtc tcc tcg
345
Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 115
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 13

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Ala Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Val Leu Ser Pro Ser Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của NI-105.24B2-VL trong đó Glu ở vị trí 3 trong trình tự này cũng có thể là Val

<220>
<221> Vùng V
<222> (67)..(99)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>
<221> Vùng V
<222> (145)..(165)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>
<221> Vùng V
<222> (262)..(294)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 14
tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag
48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

acg gcc ggg atc acc tgc tct gga gat gct ttg cca aag caa ttt gtt
96
Thr Ala Gly Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Phe Val
20 25 30

tat tgg tac cag aag aag cca ggc cag gcc cct gtg tta ttg ata tat
144
Tyr Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

aaa gac act gag agg ccc tca cga atc cct gag cgc ttc tct ggc tcc
192
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

acc tca ggg aca aca gtc gcg ttg acc atc aat ggg gtc cag gca gag
240
Thr Ser Gly Thr Thr Val Ala Leu Thr Ile Asn Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gcc gac cgc agt ggt gct ctt
288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ala Leu
85 90 95

tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta
324
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 15

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

Thr Ala Gly Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Phe Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Thr Val Ala Leu Thr Ile Asn Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ala Leu
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 16
<211> 378
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(378)
<223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của NI-105.4A3-VH trong đó Gln ở vị trí 1 của trình tự này cũng có thể là Glu và Ser ở vị trí 7 của trình tự này cũng có thể là Thr

<220>
<221> Vùng V
<222> (91)..(105)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Vùng V
<222> (148)..(198)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Vùng V
<222> (295)..(345)
<223> vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VH-CDR3

<400> 16
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gcg gtc cag cct ggg ggg
48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ala Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt gac tat
96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

gcc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg cag tgg gtg
144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

gca gtt ata tcg tat gag gga act tat aaa tac tat gca gac tcc gtg
192
Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Thr Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg aac
240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn
65 70 75 80

ttg cag atg agc agc ctg aga gtt gaa gac acg gct gtg tat ttc tgt
288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

gtg aaa gct cga gcc ttt gcc tcc gga cag cga agc acc tcc acc gta
336
Val Lys Ala Arg Ala Phe Ala Ser Gly Gln Arg Ser Thr Ser Thr Val
100 105 110

cct gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg
378
Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 17
<211> 126
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Thr Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Lys Ala Arg Ala Phe Ala Ser Gly Gln Arg Ser Thr Ser Thr Val
100 105 110

```
Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125


<210>  18
<211>  324
<212>  ADN
<213>  Người hiện đại


<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(324)
<223>  Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của NI-105.4A3-VL

<220>
<221>  Vùng V
<222>  (67)..(99)
<223>  vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>
<221>  Vùng V
<222>  (145)..(165)
<223>  vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>
<221>  Vùng V
<222>  (262)..(294)
<223>  vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400>  18
tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga caa
48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1               5                   10                  15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aaa aaa tat gct
96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
            20                  25                  30

tat tgg tac cag cag aag tca ggc cag gcc cct gtg ttg gtc atc tat
144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
        35                  40                  45

gag gac aac aaa cga ccc tcc ggg atc cct gag aga ttc tct ggc tcc
192
Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

agc tca ggg aca gtg gcc acc ttg act atc agt ggg gcc cag gtg gac
240
Ser Ser Gly Thr Val Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Asp
65                  70                  75                  80

gat gaa gct gac tac tac tgc tac tcg aca gac atc agt ggt gac ctt
288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asp Leu
                85                  90                  95
```

cgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc ctc
324
Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 19

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Val Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Asp
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asp Leu
85 90 95

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 20
<211> 451
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng ch4E4 trưởng thành (IgG2a chuột)

<400> 20

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Ile Ser
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
65                  70                  75                  80

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
        115                 120                 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
    130                 135                 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu
145                 150                 155                 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr
            180                 185                 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro
        195                 200                 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr
    210                 215                 220

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
            260                 265                 270

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
        275                 280                 285
```

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
290 295 300

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
305 310 315 320

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
355 360 365

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
370 375 380

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
405 410 415

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
420 425 430

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 21
<211> 213
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nhẹ ch4E4 trưởng thành (lamđa)

<400> 21

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser
100 105 110

Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Glu Thr
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Val
130 135 140

Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val Thr Gln Gly Met
145 150 155 160

Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Met Ala Ser
165 170 175

Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg His Ser Ser Tyr
180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu Lys Ser Leu Ser
195 200 205

Arg Ala Asp Cys Ser
210

<210> 22
<211> 451
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> chuỗi nặng ch4E4(N30Q) trưởng thành (IgG2a của chuột)

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gln Ile Ser
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu
145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr
180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr
210 215 220

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
245 250 255

Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
260 265 270

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
275 280 285

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
290 295 300

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
305 310 315 320

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
355 360 365

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
370 375 380

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
405 410 415

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
420 425 430

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4E4-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR1

<400> 23

Ile Ser Ala Ile His
1 5

<210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4E4-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR2

<400> 24

Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Leu Lys Gly

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4E4-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR3

<400> 25

Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4E4-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR1

<400> 26

Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4E4-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR2

<400> 27

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4E4-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CD3

<400> 28

Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp Val
1 5 10

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.24B2-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR1

<400> 29

Asn Tyr Ile Ile His
1 5

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.24B2-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CD2

<400> 30

Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.24B2-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR3

<400> 31

Leu Ser Pro Ser Asn Pro
1 5

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.24B2-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR1

<400> 32

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Phe Val Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.24B2-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR2

<400> 33

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.24B2-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR3

<400> 34

Gln Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ala Leu Trp Val
1 5 10

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4A3-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR1

<400> 35

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4A3-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR2

<400> 36

Val Ile Ser Tyr Glu Gly Thr Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4A3-VH (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VH) CDR3

<400> 37

Ala Arg Ala Phe Ala Ser Gly Gln Arg Ser Thr Ser Thr Val Pro Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4A3-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR1

<400> 38

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4A3-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR2

<400> 39

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> NI-105.4A3-VL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VL) CDR3

<400> 40

Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asp Leu Arg Val
1 5 10

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> PEPTIT

<400> 41

Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
1 5 10

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> PEPTIT

<400> 42

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

<210> 43
<211> 121
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH kháng thể

<400> 43

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gln Ile Ser
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 120
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 44

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 Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 120
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 45

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 Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 111
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 46

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asn Tyr
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

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

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 47
<211> 125
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe
100 105 110

His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 48
<211> 125
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 48

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe
100 105 110

His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 49
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 49

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Arg Tyr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Thr Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Asn Gly His His
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 50
<211> 121
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Tyr Val Ser Gly Gly Thr Gly Thr Met Tyr
50 55 60

Tyr Leu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asp Ala
65 70 75 80

Thr Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Asp Tyr Gly Glu Asp Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Arg Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 52
<211> 124
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Thr Arg Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 53

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Ala Ser Lys Ser Val
20 25 30

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

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Thr Ser Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 54
<211> 114
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 54

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Arg Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 55

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Val Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 56
<211> 118
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 56

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Ser Pro Thr Val Thr Thr Glu Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 58
<211> 122
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 58

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Gly Ser Ser Gly Met Thr Phe Ser Ser
20 25 30

Tyr Ala Phe Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ser Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ser Thr Val Asp Tyr Thr Asp Ser
50 55 60

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ser Thr Ala Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Ile Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 59

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Val Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 60
<211> 126
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 60

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 Arg Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Tyr
50 55 60

Gln 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 Gly Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ala Gly Asp Ile Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 61

<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Val Glu Asp Arg Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Phe Gln Gly Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 64
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 64

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 65
<211> 120
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 65

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Ala Phe His Trp Ala Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Thr Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Gln Gly Pro Ser Tyr Gly Gly Ile Asn Trp Gly Leu
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Ser Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 67
<211> 115
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ile Thr Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala
20 25 30

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

Gly His Ile Lys Thr Arg Ile Glu Gly Ala Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ser Thr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 68

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Met Tyr Lys Val Ser Lys Arg Asp Pro Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Ser Leu Trp Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 69
<211> 121
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 69

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Pro Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Val Ala Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Glu Arg Pro Asp Lys Gly Gly Trp Phe Gly Pro Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 70

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Thr
20 25 30

Ser Asn Asn Gln Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Tyr Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 71
<211> 114
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 71

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

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

Ala His Ile Thr Gly Ser Gly Thr Pro Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Gly Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 72
<211> 110
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 72

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

Thr Ala Thr Leu Thr Cys Ser Gly Asn Ser Asn Asn Val Gly Asn Gln
20 25 30

Gly Ala Ala Trp Leu Gln Gln Phe Pro Gly His Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Phe Tyr Glu Asn Ile Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser
50 55 60

Ala Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Gly His Leu
85 90 95

Asn Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 73
<211> 124
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 73

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 Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Glu Gly Gln Val Ser Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Trp Gly Pro Ala Ala Val Thr Asp Ser Pro Trp Phe Gly
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 74
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 74

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Thr
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
100 105 110

Lys

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 75

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Phe
20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ala Thr Lys Tyr Ala His Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Lys Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Met Ala Val Thr Gly Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 117
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 76

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Phe
20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ala Thr Lys Tyr Ala His Asn Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Lys Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Met Ala Val Thr Gly Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 77

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Ala Glu Thr Tyr Ala
20 25 30

Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Arg Asp Arg Glu Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Val Tyr His Cys His Ser Val Ala Asp Asn Asn Leu Asp
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 78
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 78

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Ala Glu Thr Tyr Ala
20 25 30

Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Arg Asp Arg Glu Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Val Tyr His Cys His Ser Val Ala Asp Asn Asn Leu Asp
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 79

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

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 80

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 81

Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 82

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asn Tyr Ser Phe Val Ser
1 5 10

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 83

Asp Val Ser Lys Arg Ser Ser
1 5

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 84

Ser Ser Tyr Gly Gly Ser Lys Tyr Pro Trp Val
1 5 10

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 85

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His
1 5 10

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 86

Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 87
<211> 16
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 87

Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe His His
1 5 10 15

<210> 88

<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 88

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Arg Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 89

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 90

Tyr Ser Thr Asp Ser Asn Gly His His Trp Val
1 5 10

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 91

Gly Phe Asp Phe Ser Gly Tyr Ser Met Ala
1 5 10

<210> 92
<211> 22
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 92

Tyr Ile Ser Gly Thr Tyr Val Ser Gly Gly Thr Gly Thr Met Tyr Tyr
1 5 10 15

Leu Asp Ser Val Lys Gly
20

<210> 93
<211> 7
<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 93

Val Tyr Asp Tyr Gly Glu Asp
1 5

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 94

Lys Ser Ser Arg Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 95

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 96

Gln Gln Tyr Tyr Gly Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 97

Arg Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Gly
1 5 10

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 98

Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 99
<211> 15
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 99

Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 100

Gly Gly Asn Asn Ile Ala Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 101

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 102

Gln Val Trp Asp Ser Thr Ser Asp His Val Val
1 5 10

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 103

Gly Phe Thr Phe Pro Asn Tyr Val Met Thr
1 5 10

<210> 104
<211> 18
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 104

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 105
<211> 5
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 105

Gly Ser Gly Gly Ile
1 5

<210> 106
<211> 14
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 106

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 107

Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 108
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 108

His Ser Tyr Val Gly Ser Tyr Thr Leu Val
1 5 10

<210> 109
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 109

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Ala Met His
1 5 10

<210> 110
<211> 19
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 110

Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 111

Thr Ser Pro Thr Val Thr Thr Glu Val
1 5

<210> 112
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 112

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 113
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 113

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 114

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr
1 5

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 115

Ser Gly Met Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Phe Asn
1 5 10

<210> 116
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 116

Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ser Thr Val Asp Tyr Thr Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 117
<211> 14
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 117

Val Arg Ser Thr Ala Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Ile Ile
1 5 10

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 118

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Val Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 119

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly
1 5

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 120

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 121

Gly Tyr Arg Phe Thr Thr Tyr Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 122

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 123
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 123

Val Ala Gly Asp Ile Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 124
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 124

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 125

Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser
1 5

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 126

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 127

Gly Phe Thr Phe Thr Arg Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 128
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 128

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 129
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 129

Glu Gly Phe Gln Gly Ala Ile Asp Tyr
1 5

<210> 130
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 130

Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 131

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 132

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Arg Thr
1 5

<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 133

Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Ala Phe His
1 5 10

<210> 134
<211> 19
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 134

Arg Ile Arg Ser Lys Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 135

Thr Arg Gln Gly Pro Ser Tyr Gly Gly Ile Asn
1 5 10

<210> 136
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 136

Lys Ser Ser Gln Thr Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 137
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 137

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 138

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Gln Thr
1 5

<210> 139
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 139

Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met Thr
1 5 10

<210> 140
<211> 19
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 140

His Ile Lys Thr Arg Ile Glu Gly Ala Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Glu Gly

<210> 141
<211> 6
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 141

Ser Thr Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 142
<211> 16
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 142

Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 143

Lys Val Ser Lys Arg Asp Pro
1 5

<210> 144
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 144

Met Gln Gly Ser Leu Trp Pro Arg Tyr Thr
1 5 10

<210> 145
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 145

Gly Tyr Asn Phe Pro Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 146
<211> 24
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 146

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly His Val Thr Ile Ser Ser Asp
20

<210> 147
<211> 14
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 147

Ala Arg Val Glu Arg Pro Asp Lys Gly Gly Trp Phe Gly Pro
1 5 10

<210> 148
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 148

Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Thr Ser Asn Asn Gln Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 149

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Tyr
1 5

<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 150

Gln Gln Tyr Tyr Asn Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 151
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 151

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 152

His Ile Thr Gly Ser Gly Thr Pro Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 153
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 153

Val Arg Gly Thr Val Asp Tyr
1 5

<210> 154
<211> 13
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 154

Ser Gly Asn Ser Asn Asn Val Gly Asn Gln Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 155

Glu Asn Ile Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 156
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 156

Ser Ala Trp Asp Gly His Leu Asn Ala Trp Val
1 5 10

<210> 157
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 157

Gly Tyr Ser Phe Ile Ser Tyr Trp Val Gly
1 5 10

<210> 158
<211> 24
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 158

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Glu
1 5 10 15

Gly Gln Val Ser Ile Ser Ala Asp
20

<210> 159
<211> 15

<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 159

His Trp Gly Pro Ala Ala Val Thr Asp Ser Pro Trp Phe Gly Pro
1 5 10 15

<210> 160
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 160

Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Thr Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 161
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 161

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 162

Gln His Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 163
<211> 10
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 163

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Phe Phe Met His
1 5 10

<210> 164
<211> 17
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 164

Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ala Thr Lys Tyr Ala His Asn Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 165
<211> 8
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 165

Gly Met Ala Val Thr Gly Asn Phe
1 5

<210> 166
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 166

Ser Gly Asp Val Leu Ala Glu Thr Tyr Ala Arg
1 5 10

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 167

Arg Asp Arg Glu Arg Pro Ala
1 5

<210> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 168

His Ser Val Ala Asp Asn Asn Leu Asp Trp Val
1 5 10

<210> 169
<211> 360
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 169

gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc ccggggagtc tctgaagatc
60

tcctgcaagg catttggata cagttttacc aacttctgga tcggctgggt gcgccaggtg
120

cccgggaaag gcctggagtg ggtgggaatc atctatcctg gtgactctga caccagatac
180

agtccgtcct tccaaggcca ggtcaccatt tcagccgaca agtccattga caccgcctac
240

ctacagtggg gccacctgaa ggcctcggac agcgccatgt atttctgtgc cagacggggt
300

ttttggactg gaagtcaaat tgaatactgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcctcg
360

<210> 170
<211> 360
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 170
gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc ccggggagtc tctgaagatc
60

tcctgcaagg catttggata cagttttacc aacttctgga tcggctgggt gcgccaggtg
120

cccgggaaag gcctggagtg ggtgggaatc atctatcctg gtgactctga caccagatac
180

agtccgtcct tccaaggcca ggtcaccatt tcagccgaca agtccattga caccgcctac
240

ctacagtggg gccacctgaa ggcctcggac agcgccatgt atttctgtgc cagacggggt
300

ttttggactg gaagtcaaat tgaatactgg ggccagggca cccaggtcac cgtctcctcg
360

<210> 171
<211> 333
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 171
cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacactc agtcaccatc
60

tcctgcactg gaactagtag tgacgttggt aattatagtt ttgtctcctg gtatcaacag
120

tatcccggca aagcccccaa agtcatcatt tatgacgtca gtaagcggtc ctcaggggtc
180

cctgatcgct tctttggctc caagtctgcc aacacggcct ccctgaccgt ctctggggtc
240

caggaagagg atgaggctga ctatttttgc agctcatacg gaggcagcaa atatccgtgg
300

gtgtttggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctt
333

<210> 172
<211> 375
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 172
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagagtc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatgaca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcggtt atatggtttg atggaagtaa tgaattctat
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaccta
300

ggggcctcag tgactacttc caacgctgaa aacttccacc actggggcca gggcaccctg
360

gtcaccgtct cctcg
375

<210> 173
<211> 375
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 173
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagagtc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatgaca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcggtt atatggtttg atggaagtaa tgaattctat
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaccta
300

ggggcctcag tgactacttc caacgctgaa aacttccacc actggggcca gggcaccctg
360

gtcaccgtct cctcg
375

<210> 174
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 174
tcctatgagc tgactcagcc accctcggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc
60

acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaga tatgtttatt ggtaccagca gaagtcaggc
120

caggcccctg tgctggtcat ctatgaggac agcaaacgac cctccgggat ccctgagaca
180

ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtagag
240

gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcaatg gtcatcattg ggtgttcggc
300

ggagggacca agctgaccgt ccta
324

<210> 175
<211> 363
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 175
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cgacttcagc ggctatagca tggcctgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcgtat attagcggca cttatgttag tggtggtaca
180

ggcacgatgt attatttaga ctctgtgaag ggccgattct tcatctccag agacgatgcc
240

accagttcac tgtatctgca aatggacagc ctgagggacg aggacacggc tgtgtattac
300

tgtgcgagag tttatgacta cggtgaagac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc
360

tcg
363

<210> 176
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 176
gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagccg gagtgtctta tacagctcca acagtaagaa ctacttagct
120

tggtatcagc agaaacccgg acagcctcct aagttgctca tttactgggc atctacgcgg
180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagaatt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggcg gtttattact gtcagcaata ttatggtact
300

cctcgcacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa
339

<210> 177
<211> 372
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 177
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag gcactagatt cacctttagc acctatgcca tgggctgggt ccgccaggct
120

ccagggaggg ggctggagtg ggtctcggct attggtggta gtggtgatag cacatcctac
180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaaggggtt
300

tatgattacc tttgggggag ttatcggctc tttgactact ggggccaggg aaccctggtc
360

accgtctcct cg
372

<210> 178
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 178
tcctatgtgc tgactcagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccagattt
60

acctgtgggg gaaacaacat tgcaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc
120

caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcacggat ccctgagcga
180

ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg
240

gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtacta gtgatcatgt ggtattcggc
300

ggagggacca agctgaccgt ccta
324

<210> 179
<211> 342
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 179
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttccc aactatgtca tgacgtgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacagactac
180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggccttgt attactgtgc gaagggctca
300

ggtggtatcc ggggccaagg gacaatggtc accgtctctt cg
342

<210> 180
<211> 330
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 180
cagtctgccc tgactcagcc tcgctcagtg tccgggtctc ctggacagtc agtcaccatc
60

tcctgcactg gaaccagcag tgatgttggt ggttataact atgtctcctg gcaccagcag
120

cacccaggca aagcccccaa actcctgatt tatgatgtca ctaagcggcc ctcaggggtc
180

cctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggccg ccctgaccat ctctgggctc
240

caggctgagg atgaggctga ttattactgc cactcatatg taggcagcta cactttggta
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc
330

<210> 181
<211> 354
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 181
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgaaactc
60

tcctgtgcag cctctgggtt cacattcagt ggctctgcta tgcactgggt ccgccaggct
120

tccgggaaag ggctggagtg ggttggccgt attagaagca aagctaatag ttatgcgaca
180

gcatatgctg cgtcggtgaa aggcaggttc accatctcca gagatgattc aaagaacacg
240

gcgtatctac aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtactagc
300

cctacggtga ctaccgaggt ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcg
354

<210> 182
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 182
gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagga ctacttagct
120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctacccgg
180

gaatccgggg tctctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtgtattact gtcagcaata ttatagtacc
300

ccgatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaaa
339

<210> 183
<211> 366
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 183
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggggggtc cctgagactg
60

tcctgtatag gctcctctgg aatgaccttc agtagttatg ccttcaactg ggtccgccag
120

actccaggga aggggctgga gtgggtttca tccatcagtc gtttcggttc gaccgtggac
180

tacacagact cggtgcgggg ccgatttacc atctccagag acgatggcca gaggtcactg
240

tatctgcaaa tgaacagcct gagagtcgaa gacacggctg tttattattg tgtcagatcg
300

acggcttctg gttcgcggtc ccccggaatt atctggggcc aggggaccac ggtcaccgtc
360

tcctcg
366

<210> 184
<211> 321
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 184
gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgtc gggcgagtca gggcattgtc aataatttag cctggtttca gcagaagcca
120

gggaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaggtgg ggtcccatca
180

aaattcagcg gcagtgcgtc tgggacagat ttcagtctca ccatcagcaa cctgcagcct
240

gaagactttg caacttattt ctgccaacag tataatagtt acccttggac gttcggccaa
300

gggaccaagg tggagatcaa a
321

<210> 185
<211> 378
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 185
gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc
60

tcctgtaagg gttctggata caggtttacc acctactgga tcggctgggt gcgccagatg
120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac
180

agcccgtcct accaaggcca ggtcaccatt tcagccgaca agtccatcag taccgcctac
240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accggcatgt attactgtgc gagagtggca
300

ggggatattg gctacgagaa ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc
360

acggtcaccg tctcctcg
378

<210> 186
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 186
gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tatggctcca acaataagaa ctacttagct
120

tggtaccagc agaaactagg acagtctcct aaactgctca tttactgggc atctgcccgg
180

gaatccgggg tccctgaccg attcggtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtctattact gtcagcaata ttacagtact
300

ccgtggacgt tcggccaggg gaccaaggtg gaaatcaaa
339

<210> 187
<211> 354
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 187
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cgtctggatt cacgttcact agatatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaactaa taaatattat
180

gcagactcac tgcagggccg attcaccatc tccagagaca cttccacgaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acggcctgag agtcgaggac agggctgtat attactgtgc gagagagggg
300

tttcagggag cgatcgacta ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcg
354

<210> 188
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 188
gaaattgtga tgactcagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtcaagcca gaatatttta tacagctccg acaataagaa ctacttagct
120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaactactca tttactgggc atctacccgg
180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtatt
300

cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gagatcaaa
339

<210> 189
<211> 360
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 189
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgaaactc
60

tcctgtgcag cctctgggtt cagtttcagt gactctgctt tccactgggc ccgccaggct
120

tccgggaaag ggctggagtg ggttggccgt attagaagta aaggtaataa ttacgcgaca
180

gcatatgctg cgtcggtgaa aggcaggttc accgtctcca gagatgattc aaagaacacg
240

acgtatctac agatgaacag cctgaaaacc gacgacacgg ccatatatta ctgtactaga
300

cagggcccct cctacggtgg tattaattgg ggcctgggca ccctggtcac cgtctcctcg
360

<210> 190
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 190
gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagcca gactatttta tacagttcca acaataagaa ctacttagct
120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcca aagctgctca tttactgggc atctacccgg
180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcgggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagttct
300

cctcaaacgt tcggccaggg gaccaaggtg gaaatcaaa
339

<210> 191
<211> 345
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 191
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttcgtgaggc cgggggggtc cattacactg
60

tcctgtgcaa cctctggatt tactttcact aaagcctgga tgacctgggt ccgccaggct
120

ccagtgaagg ggctggagtg gattggccat attaaaacca gaattgaagg tgcgacaaca
180

gactacgctg cgcccgtgga aggccgattc accatttcaa gagacgattc aaaaaatatg
240

gtatatcttc aaatgaacag cctgaagacc gaagactcag gcatttatta ctgttccaca
300

gactttgact attggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctcg
345

<210> 192
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 192
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc
60

atctcctgca cgtctagtca aagcctccta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg
120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaatgt ataaggtttc taagcgggac
180

cctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgagcatc
240

agcagggtgg aggctgagga tgttggcgtt tattactgca tgcaaggttc actctggcct
300

cggtacactt ttggccaggg gaccaaggtg gagatcaaa
339

<210> 193
<211> 363
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 193
gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagaa gtgaaaaagc ccggggactc tctgaggatc
60

tcctgtaagg cttctggata caactttccc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg
120

cccgggaaag gcctggagtg gatgggaatc atctaccctg gtgactctga tatcagatac
180

agcccgtcct tccagggaca cgtcaccatc tccagtgaca agtccatcac caccgcctat
240

ctccagtgga ccagtctgaa ggtcgcggac agcgccatgt attattgtgc gagagtggaa
300

aggcctgaca agggggggctg gttcggcccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc
360

tcg
363

<210> 194
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 194
gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagcca gactcttttg tacacgtcca ataatcagaa ctatttagct
120

tggtaccaac acaaaccggg acagcctcct aaggtgctca tatactgggc atctacccgg
180

gaatatgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg gaacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcagcctga agatgtggct gtttattact gtcagcaata ttataatagt
300

ccctacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa
339

<210> 195
<211> 342
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 195
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gcatatggca tgaactgggt ccgccaggct
120

ccaggaaagg ggctggagtg ggttgcacac attactggta gtggcactcc catcttctac
180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atgccaagag ttccctatat
240

ctgcaaatga acagcctgag aaacgatgac acggctctat atttctgtgt gagaggtacc
300

gttgactact ggggccaggg caccctggtc accgtctcct cg
342

<210> 196
<211> 330
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 196
caggctggtc tgactcagcc accctcggtg tccaaggact tgagacagac cgccacactc
60

acctgcagtg ggaacagcaa caatgtcggc aaccaaggag cagcttggct gcagcagttc
120

ccgggccacc ctcccaaact cctcttctac gaaaatatca accggccctc aggaatttca
180

gagagattct ctgcatccag gtcaggaaac acagcttccc tgaccattac tggactccag
240

cctgaggacg aggctgacta ttactgctca gcgtgggacg gccacctcaa tgcttgggtg
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 197
<211> 372
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 197
gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc
60

tcctgtaagg cttctggata tagttttatc agctactggg tcggctgggt gcgccagatg
120

cccgggaaag gcctggagtg gatgggcatc atctatcccg gtgactctga caccagatac
180

agcccgtcct tcgaaggcca ggtcagcatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac
240

ctccagtgga ccagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacattgg
300

gggccggcag cagtgacgga ttctccctgg ttcggcccct ggggccaggg aaccctggtc
360

accgtctcct cg
372

<210> 198
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 198
gatattgtga tgacccagag tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagcca gactgtttta tatacctcca acaataagaa ctacttagct
120

tggtaccagc agaagccagg acagcctcct aagttactca tttactgggc atctacccgg
180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcacta ttatagtact
300

ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa
339

<210> 199
<211> 351
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 199
gaggtgcagc tggtggagtc tggggctgag gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggata catctttacc gccttcttta tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag gccttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtggtgc cacaaagtat
180

gcacacaact ttcagggcag ggttaccatg accagggaca cgtccatcag cacagccttc
240

atggagctga gtggactgaa gtctgacgac acgggcgtat attactgtgc gacgggtatg
300

gcagtgactg gtaacttctg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc g
351

<210> 200
<211> 351
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 200
caggtgcagc tggtgcaatc tggggctgag gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggata catctttacc gccttcttta tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag gccttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtggtgc cacaaagtat
180

gcacacaact ttcagggcag ggttaccatg accagggaca cgtccatcag cacagccttc
240

atggagctga gtggactgaa gtctgacgac acgggcgtat attactgtgc gacgggtatg
300

gcagtgactg gtaacttctg gggccagggc accctggtca ccgtctcctc g
351

<210> 201
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 201
ctgcctgtgc tgactcagcc accctcagtg tcagtgtctc cgggacagac agccaggatc
60

acctgctcag gagatgtact ggcagaaaca tatgctcggt ggttccagca gaagccaggc
120

caggcccctg tgttggtgat gtatagagac cgtgagcggc ccgcagggat ccctgagcga
180

ttctccggct ccagctcagg gaacacagtc accttgacca tcagcggggc ccaggctgag
240

gatgaggctg tctatcattg tcactctgtg gctgacaaca atctagattg ggtgttcggc
300

ggagggacca aactgaccgt ccta
324

<210> 202
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 202
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tcagtgtctc cgggacagac agccaggatc
60

acctgctcag gagatgtact ggcagaaaca tatgctcggt ggttccagca gaagccaggc
120

caggcccctg tgttggtgat gtatagagac cgtgagcggc ccgcagggat ccctgagcga
180

ttctccggct ccagctcagg gaacacagtc accttgacca tcagcggggc ccaggctgag
240

gatgaggctg tctatcattg tcactctgtg gctgacaaca atctagattg ggtgttcggc
300

ggagggacca aactgaccgt ccta
324

<210> 203
<211> 450
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 203

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 Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
130 135 140

```
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser
            180                 185                 190

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
        195                 200                 205

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile
    210                 215                 220

Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
            260                 265                 270

Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
        275                 280                 285

Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
    290                 295                 300

Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
305                 310                 315                 320

Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335

Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
        355                 360                 365

Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
    370                 375                 380
```

Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
405 410 415

Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 204
<211> 217
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 204

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asn Tyr
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile
35 40 45

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

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val
145 150 155 160

Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg
180 185 190

His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
210 215

<210> 205
<211> 455
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 205

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe
100 105 110

```
His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
        115                 120                 125

Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr
    130                 135                 140

Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
                165                 170                 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn
        195                 200                 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro
    210                 215                 220

Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys
                245                 250                 255

Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val
            260                 265                 270

Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
        275                 280                 285

Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
    290                 295                 300

Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
305                 310                 315                 320

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg
            340                 345                 350
```

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp
370 375 380

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
420 425 430

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
435 440 445

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455

<210> 206
<211> 213
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 206

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

Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Arg Tyr Val Tyr
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu
35 40 45

Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Thr Phe Ser Gly Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu Asp
65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Asn Gly His His Trp
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser
100 105 110

Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Glu Thr
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Val
130 135 140

Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val Thr Gln Gly Met
145 150 155 160

Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Met Ala Ser
165 170 175

Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg His Ser Ser Tyr
180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu Lys Ser Leu Ser
195 200 205

Arg Ala Asp Cys Ser
210

<210> 207
<211> 444
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 207

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Arg Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val
115 120 125

Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
145 150 155 160

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln
180 185 190

Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile
260 265 270

Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr
275 280 285

His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro
290 295 300

Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

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

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

Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp
355 360 365

Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
370 375 380

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

Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
405 410 415

Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430

His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440

<210> 208
<211> 444
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 208

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val
115 120 125

Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
145 150 155 160

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln
180 185 190

Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile
260 265 270

Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr
275 280 285

His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro
290 295 300

Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

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

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

Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp
355 360 365

Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
370 375 380

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

Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
405 410 415

Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His
420 425 430

His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
435 440

<210> 209
<211> 216
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 209

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Val Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val Thr
145 150 155 160

Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg His
180 185 190

Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
210 215

<210> 210
<211> 452
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 210

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Gly Ser Ser Gly Met Thr Phe Ser Ser
20 25 30

Tyr Ala Phe Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

```
Val Ser Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ser Thr Val Asp Tyr Thr Asp Ser
    50                  55                  60

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Val Arg Ser Thr Ala Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Ile Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro
        115                 120                 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser
    130                 135                 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
            180                 185                 190

Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His
        195                 200                 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro
    210                 215                 220

Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu
225                 230                 235                 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
                245                 250                 255

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
            260                 265                 270

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
        275                 280                 285

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
```

290 295 300

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
305 310 315 320

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val
355 360 365

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
370 375 380

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
405 410 415

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
420 425 430

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
435 440 445

Thr Pro Gly Lys
450

<210> 211
<211> 214
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 211

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Val Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 212
<211> 217
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 212

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile
35 40 45

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

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val
145 150 155 160

Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg
180 185 190

His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
210 215

<210> 213
<211> 450
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 213

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Glu Gly Thr Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Lys Ala Arg Ala Phe Ala Ser Gly Gln Arg Ser Thr Ser Thr Val
100 105 110

Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys
115 120 125

Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln
130 135 140

Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser
180 185 190

Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys
195 200 205

Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val
210 215 220

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val
225 230 235 240

Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile
245 250 255

Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His
275 280 285

Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp
370 375 380

Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile
385 390 395 400

Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln
405 410 415

Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His
420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 214
<211> 445
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 214

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gln Ile Ser
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 215
<211> 449
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 215

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe
100 105 110

His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
115 120 125

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
130 135 140

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
195 200 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
210 215 220

```
Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
                245                 250                 255

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
        275                 280                 285

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Phe Arg Ser
    290                 295                 300

Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
    370                 375                 380

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
385                 390                 395                 400

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys
                405                 410                 415

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
            420                 425                 430

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

<210> 216
<211> 444
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 216

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 Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
195 200 205

```
Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
    210                 215                 220

Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
225                 230                 235                 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
                245                 250                 255

Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
            260                 265                 270

Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
        275                 280                 285

Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
    290                 295                 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
305                 310                 315                 320

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
                325                 330                 335

Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
            340                 345                 350

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
        355                 360                 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
    370                 375                 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
385                 390                 395                 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
                405                 410                 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
            420                 425                 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
        435                 440
```

<210> 217
<211> 217
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 217

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

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

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val
145 150 155 160

Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg
180 185 190

His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
210 215

<210> 218
<211> 458
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 218

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

```
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
        195                 200                 205

Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
    210                 215                 220

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

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

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
            260                 265                 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gln Ser Ala Leu Thr
435 440 445

Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly
450 455

<210> 219
<211> 216
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 219

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Val Gly Ser
85 90 95

Tyr Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 220
<211> 114
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 220

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Asn Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 221
<211> 111
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cá mập ma

<400> 221

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile
35 40 45

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

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 222
<211> 111
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cá mập ma

<400> 222

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val
35 40 45

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

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 223
<211> 339
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 223
gatattgtta tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtcaagcca gaatatttta tacagctccg acaataagaa ctacttagct
120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaactactca tttactgggc atctacccgg
180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtatt
300

cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gagatcaaa
339

<210> 224
<211> 14
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 224

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr Ser Phe Val Ser
1 5 10