(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

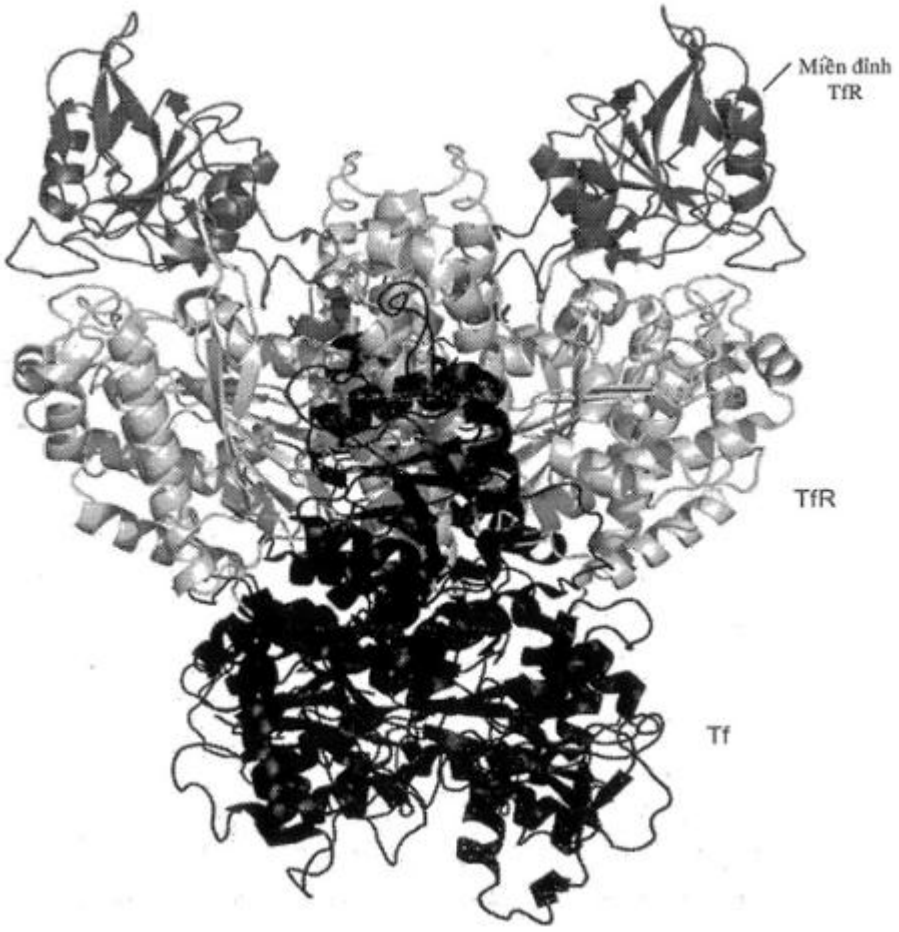
(11) **1-0029071**

(51)[7] **C07K 16/28**; C07K 16/40; A61K 39/395 (13) **B**

(21) 1-2015-04332
(22) 20/05/2014
(86) PCT/US2014/038847 20/05/2014
(87) WO 2014/189973 27/11/2014
(30) 61/825,477 20/05/2013 US
(45) 25/08/2021 401
(43) 25/03/2016 336A
(73) Genentech, Inc. (US)
1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, United States of America
(72) ZHANG, Yin (CN); ZUCHERO, Joy Yu (US); ATWAL, Jasvinder (CA); COUCH, Jessica (US); DENNIS, Mark (US); ERNST, James (US); WATTS, Ryan (US); LAZAR, Gregory A. (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG THỤ THỂ TRANSFERRIN, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY, TẾ BÀO CHỦ CHỨA AXIT NUCLEIC NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ, CHẾ PHẨM, DƯỢC PHẨM VÀ THUỐC CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng thụ thể transferrin và dược phẩm chứa kháng thể này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể, tế bào chủ bao gồm axit nucleic, phương pháp sản xuất kháng thể, chế phẩm và thuốc chứa kháng thể này.


Miền đỉnh
TfR
TfR
Tf

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng thụ thể transferrin và dược phẩm chứa kháng thể này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể, tế bào chủ bao gồm axit nucleic, phương pháp sản xuất kháng thể, chế phẩm và thuốc chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc thấm vào não của các thuốc phân tử lớn bị hạn chế rất nhiều bởi hàng rào máu-não (BBB) gần như là không thấm. Trong số nhiều phương pháp nhằm khắc phục hạn chế này, một phương pháp là sử dụng các đường vận chuyển qua tế bào của các thụ thể nội sinh được biểu hiện ở nội mô mạch máu não. Các protein tái tổ hợp như các kháng thể đơn dòng đã được thiết kế kháng lại các thụ thể này để tạo điều kiện vận chuyển qua trung gian thụ thể các phân tử lớn vào não. Các phương pháp tối đa hoá sự hấp thụ vào não trong khi giảm thiểu sự vận chuyển ngược từ tế bào vào máu, và đồng thời cũng tối đa hoá mức độ tích luỹ sau khi sử dụng thuốc trị liệu dựa vào khám phá là các kháng thể có ái lực thấp với các thụ thể BBB sẽ có khả năng tăng đáng kể việc vận chuyển BBB và giữ lại trong hệ thần kinh trung ương (CNS) các gốc/phân tử trị liệu được kết hợp, so với các kháng thể có ái lực cao thông thường với các thụ thể này (*Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011) của Atwal et al; *Sci. Transl. Med.* 25/5/2011: Vol. 3, Issue 84, p. 84ra44 của Yu et al). Tuy nhiên, các kháng thể này không gắn kết đặc hiệu với TfR của người và động vật linh trưởng.

Các kháng thể đơn dòng có tiềm năng trị liệu to lớn để điều trị các bệnh thần kinh hoặc của hệ thần kinh trung ương (CNS), nhưng việc vận chuyển chúng vào não bị hạn chế bởi hàng rào máu-não (BBB). Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy là một tỷ lệ phần trăm rất nhỏ (khoảng 0,1%) IgG tuần hoàn trong máu đi qua BBB vào CNS (Klin. Wschr. 52: 1158-1164 (1974) của Felgenhauer), khi đó nồng độ kháng thể trong CNS có thể sẽ là không đủ để cho tác dụng mạnh. Trước đây đã khám phá ra là % kháng thể phân bố vào CNS có thể được cải thiện bằng cách khai thác các thụ thể BBB (nghĩa là, thụ thể transferrin, thụ thể insulin và thụ thể tương tự) (xem, ví dụ,

WO9502421). Ví dụ, có thể tạo ra kháng thể kháng thụ thể BBB đa hiệu để nhằm đích một hoặc nhiều kháng nguyên mong muốn trong CNS, hoặc một hoặc nhiều các phân tử khác loại có thể được ngẫu hợp với kháng thể kháng thụ thể BBB; trong một trong hai trường hợp, kháng thể kháng thụ thể BBB có thể hỗ trợ vận chuyển phân tử trị liệu vào CNS đi qua BBB.

Tuy nhiên, việc nhằm đích thụ thể BBB bằng kháng thể ái lực cao đặc hiệu truyền thống nói chung thường dẫn đến sự gia tăng vận chuyển qua BBB một cách hạn chế. Sau này các tác giả sáng chế đã nhận thấy là mức độ hấp thụ kháng thể vào và phân bố trong CNS là tỷ lệ nghịch với ái lực gắn kết đối với thụ thể BBB trong số các kháng thể kháng thụ thể BBB đã nghiên cứu. Ví dụ, kháng thể ái lực thấp với thụ thể transferrin (TfR) được cho dùng ở các mức liều dùng để điều trị bệnh cải thiện đáng kể việc vận chuyển qua BBB và giữ lại trong CNS của kháng thể kháng TfR so với kháng thể kháng TfR ái lực cao hơn, và làm cho kháng thể này có thể dễ dàng đạt đến nồng độ trị liệu trong CNS (*Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011) của Atwal và các đồng tác giả). Bằng chứng của việc vận chuyển qua BBB này thu được bằng cách sử dụng kháng thể lưỡng hiệu gắn kết cả TfR và enzym phân giải protein tiền chất amyloit (APP), β-secretaza (BACE1). Liều duy nhất tác dụng toàn thân của kháng thể kháng TfR/BACE1 lưỡng hiệu được chế tạo bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế không chỉ cho mức hấp thụ đáng kể trong não, mà còn giảm đáng kể nồng độ $A\beta_{1-40}$ trong não so với kháng thể kháng BACE1 đơn hiệu đơn độc, gợi ý là việc thấm qua BBB có ảnh hưởng đến độ hiệu nghiệm của kháng BACE1. (*Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011) của Atwal và các đồng tác giả; *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra44 (2011) của Yu và các đồng tác giả).

Các dữ liệu và thử nghiệm đó đã nêu bật một vài cơ chế nguyên nhân đằng sau việc gia tăng hấp thụ kháng thể vào CNS bằng cách sử dụng phương pháp kháng thể ái lực thấp. Trước tiên, các kháng thể kháng thụ thể BBB (BBB-R) ái lực cao (ví dụ, kháng TfR^A theo Atwal và các đồng tác giả và Yu và các đồng tác giả, nêu trên) hạn chế sự hấp thụ vào não bằng cách nhanh chóng làm bão hoà BBB-R trong hệ mạch não, nhờ đó giảm lượng kháng thể tổng cộng hấp thụ vào não và cũng hạn chế phân bố kháng thể này vào hệ mạch. Đáng ngạc nhiên là, việc làm giảm ái lực đối với BBB-R cải thiện sự hấp thụ và phân bố vào não, với sự dịch chuyển mạnh nhận thấy khu trú từ hệ mạch đến các nơron và vùng kết thần kinh kèm theo được phân bố trong CNS. Thứ

hai là, ái lực thấp của kháng thể đối với BBB-R được đề xuất làm giảm khả năng kháng thể này quay trở lại phía mạch máu của BBB qua BBB-R từ phía CNS của màng do ái lực tổng thể của kháng thể đối với BBB-R là thấp và nồng độ tại chỗ của kháng thể ở phía CNS của BBB là không bão hoà do sự phân tán nhanh kháng thể này vào khoang CNS. Thứ ba là, *in vivo*, và như nhận thấy được đối với hệ TfR, các kháng thể với ái lực với BBB-R thấp hơn không được thanh thải khỏi cơ thể một cách hiệu quả như các kháng thể với ái lực cao hơn với BBB-R, và do đó vẫn ở nồng độ trong máu cao hơn là kháng thể đối ứng có ái lực cao hơn của chúng. Điều này là có lợi do nồng độ kháng thể trong máu của kháng thể ái lực thấp được duy trì ở nồng độ trị liệu trong thời gian kéo dài hơn so với kháng thể ái lực cao hơn, do đó cải thiện sự hấp thụ của kháng thể vào não trong thời gian lâu hơn. Ngoài ra, việc cải thiện này ở cả nồng độ trong huyết tương và não có thể làm giảm tần suất sử dụng trên lâm sàng, đây sẽ là lợi ích tiềm năng không chỉ cho sự tuân thủ và thuận tiện cho bệnh nhân, mà còn giảm bớt các tác dụng phụ tiềm ẩn hoặc các tác dụng không mong muốn của kháng thể và/hoặc hợp chất trị liệu được ngẫu hợp với nó.

Các kháng thể BBB-R ái lực thấp được mô tả ở trên được chọn lọc/chế tạo để tránh có ảnh hưởng gây nhiễu khả năng gắn kết tự nhiên giữa transferrin và TfR, và do đó tránh được các tác dụng phụ liên quan đến việc vận chuyển sắt có thể có. Tuy nhiên, khi sử dụng một số kháng thể này ở chuột, nhận thấy được một vài tác dụng phụ rõ rệt. Chuột thể hiện đáp ứng nguyên phát suy kiệt mạnh số lượng hồng cầu lưới kèm theo các triệu chứng lâm sàng cấp tính khởi phát nhanh. Mặc dù chuột có hồi phục khỏi các triệu chứng lâm sàng cấp tính cũng như mức hồng cầu lưới giảm đi sau một thời gian nhất định, rõ ràng là mong muốn tránh hoặc nói cách khác là giảm nhẹ tác động này lên hồng cầu lưới của kháng thể kháng TfR để có thể sử dụng kháng thể này làm phân tử trị liệu một cách an toàn. Đã phát hiện thấy là đáp ứng nguyên phát với việc sử dụng kháng TfR này (suy kiệt mạnh số lượng hồng cầu lưới và các dấu hiệu lâm sàng cấp tính) phần lớn được điều khiển bởi hoạt tính độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) của kháng thể này, đồng thời tác động gây suy kiệt hồng cầu lưới tồn lưu là qua trung gian con đường bổ thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các nghiên cứu trước đây đã sử dụng các kháng thể của chuột gắn kết đặc hiệu với TfR của chuột, nhưng chúng không nhận biết đặc hiệu TfR của động vật linh trưởng hoặc người.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất các kháng thể và phần chức năng hoạt động của chúng mà nhận biết đặc hiệu TfR của động vật linh trưởng hoặc người, để tạo thuận lợi cho các nghiên cứu về tính an toàn và độ hiệu lực ở các động vật linh trưởng bằng các kháng thể này trước khi ứng dụng điều trị hoặc chẩn đoán cho người. Các nghiên cứu in vitro bằng cách sử dụng dòng tế bào nguyên hồng cầu của người và các tế bào tuỷ xương nguyên phát được điều trị bằng các kháng thể kháng TfR của người theo sáng chế đã cho thấy có suy kiệt mạnh các tế bào hồng cầu dương tính TfR ở các hệ tế bào của người/động vật linh trưởng cũng như ở chuột (xem, ví dụ, Ví dụ 4). Do đó, sáng chế cũng đề cập đến trong bản mô tả này các cải biến đối với các kháng thể theo sáng chế để làm giảm đáng kể hoặc loại trừ việc giảm không mong muốn số lượng hồng cầu lưới biểu hiện TfR khi sử dụng kháng TfR đồng thời vẫn tạo điều kiện tăng cường vận chuyển qua BBB, tăng cường phân bố trong CNS và lưu giữ trong CNS bởi các kháng thể kháng TfR của người/động vật linh trưởng được sử dụng ở nồng độ trị liệu. Một vài phương pháp chung để làm giảm nhẹ tác dụng đã nhận thấy của các kháng thể kháng TfR theo sáng chế lên sự suy kiệt hồng cầu lưới nguyên phát và tồn lưu được đề cập trong bản mô tả này, và có thể được sử dụng đơn độc hoặc phối hợp.

Theo một phương án, chức năng hiệu ứng của kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus là giảm đi hoặc bị loại bỏ để giảm thiểu hoặc loại bỏ hoạt tính ADCC. Theo một phương án khác, ái lực của kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus đối với TfR của người hoặc động vật linh trưởng còn được làm giảm tiếp sao cho các tương tác của kháng thể này với các tế bào hồng cầu lưới là ít gây tổn hại đối với các tế bào này. Phương án thứ ba là nhằm làm giảm lượng kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus có trong huyết tương nhằm giảm phơi nhiễm các tế bào hồng cầu lưới với nồng độ có thể gây hại của kháng thể. Phương án thứ tư nhằm bảo vệ, làm ổn định và/hoặc bổ sung số lượng hồng cầu lưới sao cho phòng tránh được, giảm bớt hoặc giảm nhẹ bất kỳ sự suy kiệt tiềm ẩn các tế bào hồng cầu lưới trong máu hoặc trong tuỷ xương do sử dụng kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus.

Sự giảm thiểu hoặc loại bỏ chức năng hiệu ứng, như mô tả trong bản mô tả này, có thể đạt được bằng cách: (i) giảm thiểu hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hoá kháng thể kiểu dại của động vật có vú, (ví dụ, bằng cách sản xuất kháng thể này trong môi trường sao cho quá trình glycosyl hoá này không thể diễn ra, bằng cách gây đột biến một hoặc nhiều điểm gắn kết hydrat cacbon sao cho kháng thể này không thể được glycosyl hoá, hoặc bằng cách loại bỏ bằng hoá chất hoặc enzym một hoặc nhiều hydrat cacbon từ kháng thể này sau khi nó đã được glycosyl hoá); (ii) bằng cách giảm thiểu hoặc loại bỏ khả năng gắn kết thụ thể Fc của kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus (ví dụ, bằng cách gây đột biến vùng Fc, bằng cách khuyết đoạn trong vùng Fc hoặc loại bỏ vùng Fc); hoặc (iii) bằng cách sử dụng lớp kháng thể đã biết có chức năng hiệu ứng tối thiểu hoặc không có chức năng này (có nghĩa là, bao gồm, không chỉ giới hạn ở IgG4).

Việc giảm hoạt hoá bổ thể của kháng thể, như mô tả trong bản mô tả này, có thể đạt được bằng cách giảm thiểu hoặc loại bỏ khả năng gắn kết C1q của kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus (ví dụ, bằng cách gây đột biến, khuyết đoạn trong vùng Fc hoặc loại bỏ vùng Fc, hoặc bằng cách cải biến phần không phải Fc của kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus), hoặc bằng cách khác ức chế sự hoạt hoá hoặc hoạt tính của hệ thống bổ thể (ví dụ, bằng cách sử dụng đồng thời một hoặc nhiều chất ức chế hoạt hoá con đường bổ thể hoặc hoạt tính con đường bổ thể).

Khi gắn kết kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus với TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus trên hồng cầu lưới hoặc các loại tế bào khác biểu hiện TfR ở mức cao, sẽ khơi mào sự suy kiệt các tế bào này, như đối với các kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus được lấy ví dụ trong bản mô tả này,sự giảm thiểu gắn kết của các kháng thể với TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus trên hồng cầu lưới hoặc các loại tế bào khác sẽ tương ứng làm giảm mức suy kiệt hồng cầu lưới hoặc loại tế bào khác trong máu hoặc trong tuỷ xương được nhận thấy khi sử dụng kháng thể. Ái lực của kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus đối với TfR của động vật linh trưởng hoặc người có thể được cải biến bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này và thể hiện trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Có thể giảm thiểu lượng kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus có trong huyết tương để giảm thiểu sự phơi nhiễm của các tế bào hồng cầu lưới với các

nồng độ có thể gây hại của kháng thể theo một vài phương pháp. Một phương pháp đơn giản là giảm liều dùng kháng thể, đồng thời có thể tăng tần suất sử dụng, sao cho nồng độ tối đa trong huyết tương giảm thấp nhưng vẫn duy trì nồng độ trong huyết thanh đủ để có hiệu lực, đồng thời vẫn thấp hơn ngưỡng gây tác dụng phụ suy kiệt tế bào. Một phương pháp khác, có thể kết hợp với việc điều chỉnh liều dùng, là chọn lọc hoặc chế tạo kháng thể kháng TfR có khả năng gắn kết nhạy độ pH với TfR sao cho kháng thể này gắn kết với TfR ở bề mặt tế bào trong huyết tương ở độ pH là 7,4 với ái lực thấp mong muốn như mô tả trong bản mô tả này, nhưng khi nhập nội vào thành khoang nội bào, việc gắn kết với TfR này giảm đi nhanh chóng và đáng kể ở độ pH tương đối thấp của khoang này (pH 5,5-6,0). Sự phân ly này có thể bảo vệ kháng thể khỏi bị thanh thải qua trung gian kháng nguyên, hoặc gia tăng lượng kháng thể được vận chuyển đến CNS hoặc tái chế kháng thể quay ngược trở lại đi qua BBB – trong cả hai trường hợp, nồng độ hữu hiệu của kháng thể tăng lên so với kháng thể kháng TfR không có độ nhạy độ pH này, mà không làm tăng liều được sử dụng của kháng thể, và do đó có thể cho phép liều dùng của kháng thể thấp hơn đồng thời kèm theo ít nguy cơ có tác dụng phụ hơn.

Có thể bảo vệ, làm ổn định và/hoặc bổ sung số lượng hồng cầu lưới bằng cách sử dụng các phương pháp dược lý hoặc vật lý. Ngoài kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus, có thể đồng sử dụng ít nhất một chất trị liệu khác nữa (theo cách đồng thời hoặc tuần tự) mà làm giảm nhẹ các tác dụng phụ bất lợi của kháng thể lên số lượng hồng cầu lưới. Ví dụ về các chất trị liệu này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, erythropoietin (EPO), chất bổ sung sắt, vitamin C, axit folic, và vitamin B12. Việc thay thế tự nhiên các tế bào hồng cầu (nghĩa là, hồng cầu lưới) cũng có thể bằng cách, ví dụ, truyền máu các tế bào tương tự, có thể từ một cá thể khác có cùng nhóm máu hoặc có thể trước đó đã được lấy từ đối tượng mà được cho dùng kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được là tổ hợp bất kỳ của các phương pháp nêu trên có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể (và/hoặc chế độ liều lượng đối với kháng thể) với sự cân bằng tối ưu giữa (i) ái lực thấp mong muốn đối với TfR của động vật linh trưởng hoặc người mà sẽ tối đa hóa sự vận chuyển của kháng thể và các hợp chất được tiếp hợp bất kỳ vào CNS; (ii) ái lực của hợp chất được tiếp hợp (bao gồm như một ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, tính đặc

hiệu gắn kết kháng nguyên thứ hai hoặc tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên khác trong kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus) đối với kháng nguyên CNS của nó, do việc này liên quan đến lượng hợp chất cần có trong CNS để có tác dụng trị liệu; (iii) tốc độ thanh thải của kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus; (iv) tính không bền của hợp chất kháng TfR/được tiếp hợp ở độ pH thấp để tạo điều kiện cho việc giải phóng hợp chất được tiếp hợp ở phía CNS/não của BBB, và (v) sự tác động lên quần thể hồng cầu lưới.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ biết được là tác dụng gây suy kiệt hồng cầu lưới được nhận biết trong bản mô tả này khi sử dụng kháng thể kháng TfR có thể hữu ích trong việc điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ, trong đó việc tăng sinh hồng cầu lưới là có vấn đề. Ví dụ, trong chứng đa hồng cầu bẩm sinh hoặc chứng đa hồng cầu nguyên phát khối u, số lượng tế bào hồng cầu tăng lên do sự tăng sinh của, ví dụ, hồng cầu lưới, dẫn đến việc làm máu đặc lại và các triệu chứng sinh lý kèm theo. Việc sử dụng kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus theo sáng chế, trong đó ít nhất một phần chức năng hiệu ứng của kháng thể được bảo toàn sẽ cho phép loại bỏ có chọn lọc các quần thể hồng cầu lưới chưa trưởng thành mà không tác động đến quá trình vận chuyển transferrin bình thường vào CNS. Việc định liều kháng thể này có thể điều chỉnh sao cho có thể giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính (có nghĩa là, bằng cách định liều ở liều dùng rất thấp hoặc các khoảng thời gian dùng cách quãng xa), như đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Kháng TfR/BACE1 và kháng TfR/Abeta là các ứng cử viên mới và có nhiều hứa hẹn làm chất trị liệu để điều trị bệnh Alzheimer. Ngoài ra, công nghệ hướng đích lưỡng hiệu dựa trên sự vận chuyển qua trung gian thụ thể (RMT) bộc lộ ra nhiều chất trị liệu tiềm năng cho các bệnh ở CNS. Sáng chế đề xuất các phương pháp chế tạo các chất trị liệu thấm qua BBB mà cải thiện đáng kể việc vận chuyển đi qua BBB và sự phân bố trong CNS của chất trị liệu này mà không làm suy kiệt hồng cầu lưới.

Do đó, theo phương án thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập gắn kết với thụ thể transferrin của người (TfR) và TfR của động vật linh trưởng, trong đó kháng thể này không ức chế sự gắn kết của transferrin với TfR. Theo một khía cạnh, sự gắn kết này là gắn kết đặc hiệu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này cũng không ức chế sự gắn kết của protein nhiễm sắc tố sắt mô của người ("HFE") với TfR. Theo một khía cạnh, sự gắn kết này là gắn kết đặc hiệu. Theo một khía cạnh, kháng thể

này là kháng thể đơn dòng. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là kháng thể của người. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là kháng thể được nhân tính hóa. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là kháng thể khảm. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là mảnh kháng thể gắn kết TfR của người và TfR của động vật linh trưởng. Theo một khía cạnh khác, TfR của động vật linh trưởng là từ khỉ Cynomolgous.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:39. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 và SEQ ID NO:44. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:65 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 và SEQ ID NO:70. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên,

kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75 và SEQ ID NO:76. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81 và SEQ ID NO:82. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:83 và SEQ ID NO:84. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:90. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95 và SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101 và SEQ ID NO:102. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:156 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:157 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:55

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3, tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:39. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:43

và SEQ ID NO:44. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:65 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:69 và SEQ ID NO:70. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75 và SEQ ID NO:76. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 và SEQ ID NO:82. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:83 và SEQ ID NO:84. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:90. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:95 và SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101 và SEQ ID NO:102. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự

axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:156 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:157 và SEQ ID NO:55.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:36. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:42. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:46. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57 và SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 và SEQ ID NO:62. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:64 và SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67 và SEQ ID NO:68. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 và SEQ ID NO:73. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 và SEQ ID NO:79. Theo một khía cạnh

khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 và SEQ ID NO:87. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 và SEQ ID NO:93. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:127. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:155.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31 và HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3, tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:36 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:39. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:36 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:42 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:43 và SEQ ID NO:44. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và

HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:46 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 và SEQ ID NO:62 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:64 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:65 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67 và SEQ ID NO:68 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:69 và SEQ ID NO:70. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 và SEQ ID NO:73 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75 và SEQ ID NO:76. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 và SEQ ID NO:79 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 và SEQ ID NO:82. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 và SEQ ID NO:79, và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin

của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:83 và SEQ ID NO:84. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 và SEQ ID NO:87 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:90. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 và SEQ ID NO:93 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:95 và SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101 và SEQ ID NO:102. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:127 và HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:156 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:157 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:155 và HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:55.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm ít nhất một trình tự HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, hoặc HVR-L3 được chọn từ nhóm trình tự gồm trình tự HVR-H1 của SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:53, hoặc SEQ ID NO:100; trình tự HVR-H2 của SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:69, SEQ ID

NO:101, SEQ ID NO:156 hoặc SEQ ID NO:157; trình tự HVR-H3 của SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:76, hoặc SEQ ID NO:102; trình tự HVR-L1 của SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:66 hoặc SEQ ID NO:97; trình tự HVR-L2 của SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:67 hoặc SEQ ID NO:98; và trình tự HVR-L3 của SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:68 hoặc SEQ ID NO:102.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm (a) trình tự VH có mức tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin của các SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 20, 25, 26, 27, 28, 108, 114, 120, 126, 153 hoặc 154; (b) trình tự VL có mức tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 19, 21, 22, 23, 24, 105, 111, 117, 123 hoặc 151; hoặc (c) trình tự VH như trình tự của mục (a) và trình tự VL như trình tự của mục (b). Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:4 và trình tự VH của SEQ ID NO:7. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:5 và trình tự VH của SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:5 và trình tự VH của SEQ ID NO:9. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:6 và trình tự VH của SEQ ID NO:10. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:11 và trình tự VH của SEQ ID NO:15. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:12 và trình tự VH của SEQ ID NO:16. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:13 và trình tự VH của SEQ ID NO:17. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:14 và trình tự VH của SEQ ID NO:18. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:19 và trình tự VH của SEQ ID NO:20. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:21 và trình tự VH của SEQ ID NO:25. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:22 và trình tự VH của SEQ ID NO:26. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:23 và trình tự VH của SEQ ID NO:27. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:24 và trình tự VH của SEQ ID NO:28. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:105 và trình tự VH của SEQ ID NO:108. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:111 và trình tự VH của SEQ ID NO:114. Theo một khía

cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:117 và trình tự VH của SEQ ID NO:120. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:123 và trình tự VH của SEQ ID NO:126. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:105 và trình tự VH của SEQ ID NO:153. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:105 và trình tự VH của SEQ ID NO:154. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:151 và trình tự VH của SEQ ID NO:108. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VH của (a) SEQ ID NO:108, (b) SEQ ID NO:114, (c) SEQ ID NO:120 hoặc (d) SEQ ID NO:126. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của (a) SEQ ID NO:105, (b) SEQ ID NO:111, (c) SEQ ID NO:117, hoặc (d) SEQ ID NO:123.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này được chọn từ nhóm gồm các kháng thể 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12, và 13D4. Theo một khía cạnh, kháng thể này là 7A4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 8A2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15D2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 10D11. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7B10. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16G5. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 13C3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16G4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7G7. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 4C2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 1B12. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 13D4.

Theo một khía cạnh bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể này còn được làm trưởng thành ái lực hơn nữa. Theo một khía cạnh, kháng thể này được chọn từ nhóm gồm 15G11.v1, 15G11.v2, 15G11.v3, 15G11.v4, 15G11.v5, 7A4.v1; 7A4.v2, 7A4.v3, 7A4.v4, 7A4.v5, 7A4.v6, 7A4.v7, 7A4.v8, 7A4.v9, 7A4.v10, 7A4.v11, 7A4.v12, 7A4.v13, 7A4.v14, 7A4.v15, 7G7.v1, 16F6.v1, 16F6.v2, 16F6.v3, 16F6.v4, 15G11.N52A, 15G11.T53A và 15G11.W92A. Theo một khía cạnh, kháng thể này là 15G11.v1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v5. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v2.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v5. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v6. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v7. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v8. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v9. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v10. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v11. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v12. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v13. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v14. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v15. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7G7.v1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.N52A. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.T53A. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.W92A.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này được cải biến ở một hoặc nhiều vị trí axit amin trong VH hoặc VL thành axit amin được chỉ định cho vị trí đó trong Fig.4E-1 và Fig.4E-2. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm một trình tự hoặc một hoặc nhiều trình tự HVR tương ứng với trình tự của một hoặc nhiều trình tự đã nêu cho dòng bất kỳ trong số các dòng trên Fig.3 và Fig.4 và Fig.4E-1 và Fig.4E-2. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm trình tự VH hoặc VL tương ứng với trình tự đã nêu cho dòng bất kỳ trong số các dòng trên Fig.3 và Fig.4 và Fig.4E-1 và Fig.4E-2. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm một hoặc nhiều trình tự HVR tương ứng với một hoặc nhiều trình tự đã nêu cho dòng bất kỳ trong số các dòng trên Fig.3 và Fig.4 và Fig.4E-1 và Fig.4E-2.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất trị liệu. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này được ngẫu hợp với chất tạo hình ảnh hoặc chất đánh dấu. Theo một khía cạnh, kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu và hợp chất trị liệu tuỳ ý tạo thành một phần của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một khía cạnh, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết TfR và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết kháng nguyên não. Theo một khía cạnh, kháng nguyên não được chọn từ nhóm

gồm: beta-secretaza 1 (BACE1), Abeta, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì của người 2 (HER2), tau, apolipoprotein E (ApoE), alpha-synuclein, CD20, huntingtin, prion protein (PrP), kinaza đoạn lặp giàu lơxin 2 (LRRK2), parkin, presenilin 1, presenilin 2, gamma secretaza, thụ thể chết 6 (DR6), protein tiền chất amyloit (APP), thụ thể neurotrophin p75 (p75NTR), và caspaza 6. Theo một khía cạnh khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả hai TfR và BACE1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và Abeta. Theo một khía cạnh khác, hợp chất trị liệu là thuốc rối loạn thần kinh.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm axit nucleic này. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên bao gồm việc nuôi cấy tế bào vật chủ này sao cho kháng thể này được sản sinh và tuỳ ý còn bao gồm việc thu hồi kháng thể này từ tế bào vật chủ.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên và chất mang dược dụng.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng làm thuốc. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sản xuất thuốc nhằm điều trị rối loạn thần kinh. Theo một khía cạnh, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm gồm rối loạn bệnh lý thần kinh, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh lý ở mắt, rối loạn động kinh, bệnh ứ đọng ty lạp thể, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh do virut hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm nhiễm CNS.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng trong điều trị rối loạn thần kinh. Theo một khía cạnh, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm gồm rối loạn bệnh lý thần kinh, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh lý ở mắt, rối loạn động kinh, bệnh ứ đọng ty lạp thể, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh do virut hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm nhiễm CNS.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng nhằm vận chuyển một hoặc nhiều hợp chất đi qua BBB. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sản xuất thuốc nhằm vận chuyển một hoặc nhiều các hợp chất đi qua BBB.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề cập đến phương pháp vận chuyển hợp chất đi qua BBB ở một đối tượng, bao gồm việc cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ngẫu hợp với nó đi qua BBB. Theo một khía cạnh khác, BBB là ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng này về dấu hiệu suy kiệt tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, việc sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề cập đến phương pháp làm gia tăng sự tiếp xúc của hợp chất với CNS của một đối tượng, bao gồm việc cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ngẫu hợp với nó đi qua BBB. Theo một khía cạnh khác, BBB là ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng này về dấu hiệu suy kiệt các tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề cập đến phương pháp làm gia tăng sự lưu giữ hợp chất được sử dụng cho một đối tượng trong CNS, bao gồm việc cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho sự

lưu giữ của hợp chất này trong CNS gia tăng. Theo một khía cạnh khác, BBB là ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng nêu trên về dấu hiệu suy kiệt các tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn thần kinh ở động vật có vú, bao gồm việc điều trị đối tượng có vú này bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một khía cạnh, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm gồm rối loạn bệnh lý thần kinh, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh lý ở mắt, rối loạn động kinh, bệnh ứ đọng ty lạp thể, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh do virut hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm nhiễm CNS. Theo một khía cạnh khác, rối loạn thần kinh là ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng nêu trên về dấu hiệu suy kiệt các tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà gắn kết với TfR của người và TfR của động vật linh trưởng, trong đó kháng thể này không ức chế sự gắn kết của transferrin với TfR, và trong đó một hoặc nhiều tính chất của kháng thể đã được cải biến để giảm thiểu hoặc loại bỏ tác động của kháng thể lên hồng cầu lưới và/hoặc giảm mức độ nghiêm trọng hoặc sự xuất hiện các triệu chứng lâm sàng cấp tính ở một đối tượng hoặc động vật có vú được điều trị bằng kháng thể này. Theo một khía cạnh, sự gắn kết này là gắn kết đặc hiệu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này còn không ức chế sự gắn kết của HFE với TfR. Theo một khía cạnh,

kháng thể này là kháng thể đơn dòng. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là kháng thể của người. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là kháng thể được nhân tính hóa. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là kháng thể khảm. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là mảnh kháng thể gắn kết TfR của người và TfR của động vật linh trưởng. Theo một khía cạnh khác, TfR của động vật linh trưởng là từ khỉ Cynomolgous.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:39. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 và SEQ ID NO:44. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:65 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69 và SEQ ID NO:70. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên,

kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:75 và SEQ ID NO:76. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81 và SEQ ID NO:82. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:83 và SEQ ID NO:84. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:90. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95 và SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:101 và SEQ ID NO:102. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L3, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3, tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:39. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:43 và SEQ ID NO:44. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 và SEQ

ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:65 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:69 và SEQ ID NO:70. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75 và SEQ ID NO:76. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 và SEQ ID NO:82. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:83 và SEQ ID NO:84. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:90. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:95 và SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101 và SEQ ID NO:102.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:36. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:42. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-

L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:46. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57 và SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 và SEQ ID NO:62. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:64 và SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67 và SEQ ID NO:68. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 và SEQ ID NO:73. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 và SEQ ID NO:79. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 và SEQ ID NO:87. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 và SEQ ID NO:93. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:127.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID

NO:30 và SEQ ID NO:31 và HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3, tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:36 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38 và SEQ ID NO:39. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:36 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:40 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:42 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:43 và SEQ ID NO:44. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:46 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48 và SEQ ID NO:49. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:58 và SEQ ID NO:59. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 và SEQ ID NO:62 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:55. Theo

một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:64 và SEQ ID NO:52 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:65 và SEQ ID NO:55. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67 và SEQ ID NO:68 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:69 và SEQ ID NO:70. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72 và SEQ ID NO:73 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75 và SEQ ID NO:76. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 và SEQ ID NO:79 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 và SEQ ID NO:82. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 và SEQ ID NO:79, và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:83 và SEQ ID NO:84. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86 và SEQ ID NO:87 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 và SEQ ID NO:90. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 và SEQ ID NO:93 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:95 và SEQ ID NO:96. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98 và SEQ ID NO:99 và HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101 và SEQ ID NO:102. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29, SEQ ID

NO:30 và SEQ ID NO:127 và HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 tương ứng có trình tự axit amin của SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33 và SEQ ID NO:34.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm ít nhất một trình tự HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, hoặc HVR-L3 được chọn từ nhóm trình tự gồm trình tự HVR-H1 của SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:53, hoặc SEQ ID NO:100; trình tự HVR-H2 của SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:69, hoặc SEQ ID NO:101; trình tự HVR-H3 của SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:76, hoặc SEQ ID NO:102; trình tự HVR-L1 của SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:66 hoặc SEQ ID NO:97; trình tự HVR-L2 của SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:67 hoặc SEQ ID NO:98; và trình tự HVR-L3 của SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:68 hoặc SEQ ID NO:102.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm (a) trình tự VH có mức tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin của các SEQ ID NO:7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 20, 25, 26, 27, 28, 108, 114, 120 hoặc 126; (b) trình tự VL có mức tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin của các SEQ ID NO:4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 19, 21, 22, 23, 24, 105, 111, 117 hoặc 123; hoặc (c) trình tự VH như trình tự của mục (a) và trình tự VL như trình tự của mục (b). Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:4 và trình tự VH của SEQ ID NO:7. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:5 và trình tự VH của SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:5 và trình tự VH của SEQ ID NO:9. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:6 và trình tự VH của SEQ ID NO:10. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:11 và trình tự VH của SEQ ID NO:15. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:12 và trình tự VH của SEQ ID NO:16. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:13 và trình tự VH của SEQ ID NO:17. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:14 và trình tự VH của SEQ ID NO:18. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:19 và trình tự VH của SEQ ID NO:20. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:21 và trình tự VH của SEQ ID NO:25. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:22 và trình tự VH của SEQ ID NO:26. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:23 và

trình tự VH của SEQ ID NO:27. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:24 và trình tự VH của SEQ ID NO:28. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:105 và trình tự VH của SEQ ID NO:108. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:111 và trình tự VH của SEQ ID NO:114. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:117 và trình tự VH của SEQ ID NO:120. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO:123 và trình tự VH của SEQ ID NO:126. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VH của (a) SEQ ID NO:108, (b) SEQ ID NO:114, (c) SEQ ID NO:120 hoặc (d) SEQ ID NO:126. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này bao gồm trình tự VL của (a) SEQ ID NO:105, (b) SEQ ID NO:111, (c) SEQ ID NO:117, hoặc (d) SEQ ID NO:123.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này được chọn từ nhóm gồm các kháng thể 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12, và 13D4. Theo một khía cạnh, kháng thể này là 7A4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 8A2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15D2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 10D11. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7B10. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16G5. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 13C3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16G4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7G7. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 4C2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 1B12. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 13D4.

Theo một khía cạnh bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể này còn được làm trưởng thành ái lực hơn nữa. Theo một khía cạnh, kháng thể này được chọn từ nhóm gồm 15G11.v1, 15G11.v2, 15G11.v3, 15G11.v4, 15G11.v5, 7A4.v1; 7A4.v2, 7A4.v3, 7A4.v4, 7A4.v5, 7A4.v6, 7A4.v7, 7A4.v8, 7A4.v9, 7A4.v10, 7A4.v11, 7A4.v12, 7A4.v13, 7A4.v14, 7A4.v15, 7G7.v1, 16F6.v1, 16F6.v2, 16F6.v3 và 16F6.v4. Theo một khía cạnh, kháng thể này là 15G11.v1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.v5. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v1. Theo

một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v5. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v6. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v7. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v8. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v9. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v10. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v11. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v12. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v13. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v14. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7A4.v15. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 7G7.v1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v2. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v3. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.N52A. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.T53A. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v4. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 15G11.W92A. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là 16F6.v4.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này được cải biến ở một hoặc nhiều vị trí axit amin trong VH hoặc VL thành axit amin được chỉ định cho vị trí đó trong Fig.4E-1 và Fig.4E-2. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm một trình tự hoặc một hoặc nhiều trình tự HVR tương ứng với trình tự của một hoặc nhiều trình tự đã nêu cho dòng bất kỳ trong số các dòng trên Fig.3 và Fig.4 và Fig.4E-1 và Fig.4E-2. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm trình tự VH hoặc VL tương ứng với trình tự đã nêu cho dòng bất kỳ trong số các dòng trên Fig.3 và Fig.4 và các Fig.4E-1 và Fig.4E-2. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này bao gồm một hoặc nhiều trình tự HVR tương ứng với một hoặc nhiều trình tự đã nêu cho dòng bất kỳ trong số các dòng trên Fig.3 và Fig.4 và Fig.4E-1 và Fig.4E-2.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, một hoặc nhiều tính chất của kháng thể được chọn từ chức năng hiệu ứng của vùng Fc của kháng thể, chức năng hoạt hoá bổ thể của kháng thể và ái lực của kháng thể đối với TfR. Theo một khía cạnh, tính chất này là chức năng hiệu ứng của vùng Fc của kháng thể. Theo một khía cạnh khác, tính chất này là chức năng hoạt hoá bổ thể của kháng thể. Theo một khía

cạnh khác, tính chất này là ái lực của kháng thể đối với TfR. Theo một khía cạnh, chức năng hiệu ứng hoặc chức năng hoạt hoá bổ thể đã được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ so với kháng thể kiểu dại có cùng lớp kháng thể. Theo một khía cạnh, chức năng hiệu ứng được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ bằng phương pháp được chọn từ sự giảm glycosyl hoá kháng thể, sự cải biến lớp kháng thể của kháng thể thành lớp kháng thể có chức năng hiệu ứng giảm đi hoặc bị loại bỏ một cách tự nhiên, và sự cải biến vùng Fc.

Theo một khía cạnh, chức năng hiệu ứng được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ bằng cách giảm glycosyl hoá kháng thể. Theo một khía cạnh, sự glycosyl hoá kháng thể được làm giảm đi bằng phương pháp được chọn từ: sản xuất kháng thể trong môi trường không cho phép glycosyl hoá kiểu dại; loại bỏ các nhóm hydrat cacbon đã có trên kháng thể này; và cải biến kháng thể sao cho sự glycosyl hoá kiểu dại không xảy ra. Theo một khía cạnh, sự glycosyl hoá kháng thể được làm giảm đi bằng cách sản xuất kháng thể trong môi trường không cho phép glycosyl hoá kiểu dại, như sản xuất trong hệ sản xuất tế bào không phải của động vật có vú hoặc trường hợp sản xuất kháng thể bằng cách tổng hợp. Theo một khía cạnh, kháng thể này được sản xuất trong hệ sản xuất tế bào không phải của động vật có vú. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được sản xuất bằng cách tổng hợp. Theo một khía cạnh khác, sự glycosyl hoá của kháng thể được làm giảm đi bằng cách cải biến kháng thể sao cho sự glycosyl hoá kiểu dại không xảy ra, như trong vùng Fc của kháng thể bao gồm đột biến ở vị trí 297 sao cho gốc asparagin kiểu dại ở vị trí đó được thay thế bằng một axit amin khác gây ảnh hưởng đến sự glycosyl hoá ở vị trí đó.

Theo một khía cạnh khác, chức năng hiệu ứng được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ bằng ít nhất một cải biến vùng Fc. Theo một khía cạnh, chức năng hiệu ứng hoặc chức năng hoạt hoá bổ thể được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ bằng cách khuyết đoạn toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc, hoặc bằng cách chế tạo kháng thể này sao cho nó không bao gồm vùng Fc hoặc vùng không phải Fc có khả năng có chức năng hiệu ứng hoặc chức năng hoạt hoá bổ thể. Theo một khía cạnh khác, ít nhất một cải biến vùng Fc được chọn từ: đột biến điểm của vùng Fc làm yếu sự gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc được chọn từ các vị trí sau đây: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, và 439; đột biến điểm của vùng Fc làm yếu sự gắn kết với C1q được chọn từ các vị trí sau

đây: 270, 322, 329, và 321; loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng Fc, và đột biến điểm ở vị trí 132 của miền CH1. Theo một khía cạnh, cải biến này là đột biến điểm của vùng Fc làm yếu sự gắn kết với C1q được chọn từ các vị trí sau đây: 270, 322, 329, và 321. Theo một khía cạnh khác, cải biến này là loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng Fc. Theo một khía cạnh khác, chức năng khơi mào bổ thể được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ bằng cách khuyết đoạn toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc, hoặc bằng cách chế tạo kháng thể này sao cho nó không bao gồm vùng Fc mà có tham gia vào con đường bổ thể. Theo một khía cạnh, kháng thể này được chọn từ Fab hoặc kháng thể đơn chuỗi. Theo một khía cạnh khác, vùng không phải Fc của kháng thể được cải biến để giảm thiểu hoặc loại bỏ sự hoạt hoá con đường bổ thể bằng kháng thể này. Theo một khía cạnh, cải biến này là đột biến điểm của vùng CH1 làm yếu sự gắn kết với C3. Theo một khía cạnh, đột biến điểm này là ở vị trí 132 (xem, ví dụ, J. Biol. Chem. 276(41): 38217-38223 (2001) của Vidarte và các đồng tác giả).

Theo một khía cạnh, thời gian bán thải của kháng thể được làm gia tăng bằng cách cải biến trong vùng gắn kết. Theo một khía cạnh, cải biến này là thay thế một axit amin được chọn từ các vị trí sau đây: 251 256, 285, 290, 308, 314, 385, 389, 428, 434, 436, 238, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434. Theo một khía cạnh cải biến này là thay thế được chọn từ các thay thế sau đây: M252Y, S254T, T256E, N434A và Y436I.

Theo một khía cạnh, kháng thể này được kết hợp với hợp chất khác mà giảm nhẹ hoặc góp phần giảm thiểu sự tác động lên số lượng hồng cầu lưới hoặc các triệu chứng lâm sàng cấp tính. Theo một khía cạnh, hợp chất khác bảo vệ hồng cầu lưới khỏi bị suy kiệt có liên quan đến kháng thể hoặc hỗ trợ sự tăng trưởng, phát triển, hoặc tái tạo hồng cầu lưới. Theo một khía cạnh khác, hợp chất khác được chọn từ erythropoietin (EPO), chất bổ sung sắt, vitamin C, axit folic, và vitamin B12, hoặc là các tế bào hồng cầu hoặc hồng cầu lưới.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, ái lực của kháng thể đối với TfR giảm đi, như được xác định so với kháng thể kiểu dại có cùng lớp kháng thể không có ái lực giảm đi đối với TfR. Theo một khía cạnh, kháng thể này có KD hoặc IC50 đối với TfR bằng khoảng từ 1pM đến khoảng 100μM. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng của kháng thể được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất trị liệu. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, kháng thể này được ngẫu hợp với chất tạo hình ảnh hoặc chất đánh dấu. Theo một khía cạnh, kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu và hợp chất trị liệu tuỳ ý tạo thành một phần của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một khía cạnh, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết TfR và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết kháng nguyên não. Theo một khía cạnh, kháng nguyên não được chọn từ nhóm gồm: beta-secretaza 1 (BACE1), Abeta, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì của người 2 (HER2), tau, apolipoprotein E (ApoE), alpha-synuclein, CD20, huntingtin, prion protein (PrP), kinaza đoạn lặp giàu loxin 2 (LRRK2), parkin, presenilin 1, presenilin 2, gamma secretaza, thụ thể chết 6 (DR6), protein tiền chất amyloit (APP), thụ thể neurotrophin p75 (p75NTR), và caspaza 6. Theo một khía cạnh khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và BACE1. Theo một khía cạnh khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và Abeta. Theo một khía cạnh khác, hợp chất trị liệu là thuốc rối loạn thần kinh.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm axit nucleic này. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên bao gồm việc nuôi cấy tế bào vật chủ này sao cho kháng thể này được sản sinh và tuỳ ý còn bao gồm việc thu hồi kháng thể này từ tế bào vật chủ.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên và chất mang dược dụng.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng làm thuốc. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sản xuất thuốc nhằm điều trị rối loạn thần kinh. Theo một khía cạnh, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm gồm rối loạn bệnh lý thần kinh, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh lý ở mắt, rối loạn động kinh, bệnh ứ đọng ty lạp thể, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh do virut hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm nhiễm CNS.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng trong điều trị rối loạn thần kinh. Theo một khía cạnh, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm gồm rối loạn bệnh lý thần kinh, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh lý ở mắt, rối loạn động kinh, bệnh ứ đọng ty lạp thể, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh do virut hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm nhiễm CNS.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng nhằm vận chuyển một hoặc nhiều hợp chất đi qua BBB. Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sản xuất thuốc nhằm vận chuyển một hoặc nhiều hợp chất đi qua BBB.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề cập đến phương pháp vận chuyển hợp chất đi qua BBB ở một đối tượng, bao gồm việc cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ngẫu hợp với nó đi qua BBB. Theo một khía cạnh khác, BBB là ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng nêu trên về dấu hiệu suy kiệt các tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, việc sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề cập đến phương pháp làm gia tăng sự tiếp xúc của hợp chất với CNS của một đối tượng, bao gồm việc cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ngẫu hợp với nó đi qua BBB. Theo một khía cạnh khác, BBB là ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng nêu trên về dấu hiệu suy kiệt các tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng

để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, việc sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề cập đến phương pháp làm gia tăng sự lưu giữ hợp chất trong CNS được sử dụng cho một đối tượng, bao gồm việc cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho sự lưu giữ của hợp chất này trong CNS gia tăng. Theo một khía cạnh khác, BBB ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng nêu trên về dấu hiệu suy kiệt các tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, việc sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn thần kinh ở động vật có vú, bao gồm việc điều trị đối tượng có vú này bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một khía cạnh, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm gồm rối loạn bệnh lý thần kinh, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh lý ở mắt, rối loạn động kinh, bệnh ứ đọng ty lạp thể, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh do virut hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm nhiễm CNS. Theo một khía cạnh khác, rối loạn thần kinh ở đối tượng là con người. Theo một khía cạnh khác, liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được điều chỉnh để làm giảm nồng độ của kháng thể mà các tế bào hồng cầu tiếp xúc với. Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước theo dõi đối tượng nêu trên về dấu hiệu suy kiệt các tế bào hồng cầu. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất này được sử dụng ở liều dùng để điều trị bệnh. Theo một khía cạnh, liều dùng để điều trị bệnh là làm bão hoà TfR. Theo một khía cạnh khác, việc sử dụng kháng thể là ở liều dùng và/hoặc tần suất sử dụng được chuẩn hoá để giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính của việc sử dụng kháng thể.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà gắn kết với cùng một epitop trên TfR như kháng thể được chọn từ nhóm gồm các kháng thể 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12, 13D4, 15G11.v1, 15G11.v2, 15G11.v3, 15G11.v4, 15G11.v5, 7A4.v1; 7A4.v2, 7A4.v3, 7A4.v4, 7A4.v5, 7A4.v6, 7A4.v7, 7A4.v8, 7A4.v9, 7A4.v10, 7A4.v11, 7A4.v12, 7A4.v13, 7A4.v14, 7A4.v15, 7G7.v1, 16F6.v1, 16F6.v2, 16F6.v3, 16F6.v4 15G11.N52A, 15G11.T53A và 15G11W92A.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm độ thanh thải của hợp chất được sử dụng cho một đối tượng, trong đó hợp chất được ngẫu hợp với kháng thể mà gắn kết với ái lực thấp với TfR, sao cho độ thanh thải của hợp chất giảm đi, và trong đó sự giảm số lượng tế bào hồng cầu ở đối tượng này khi sử dụng kháng thể được ngẫu hợp với hợp chất cho đối tượng này bị giảm đi hoặc loại trừ.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp tối ưu hoá dược động học và/hoặc dược lực học của hợp chất để có hiệu quả ở CNS ở một đối tượng, trong đó hợp chất này được ngẫu hợp với kháng thể mà gắn kết với ái lực thấp với TfR, và kháng thể này được chọn lọc sao cho ái lực đối với TfR của nó sau khi ngẫu hợp với hợp chất dẫn đến mức độ vận chuyển kháng thể được tiếp hợp với hợp chất đi qua BBB mà tối ưu hoá dược động học và/hoặc dược lực học của hợp chất trong CNS, trong đó sự giảm số lượng tế bào hồng cầu ở đối tượng này khi sử dụng kháng thể được ngẫu hợp với hợp chất cho đối tượng này bị giảm đi hoặc loại trừ.

Nên hiểu là phương pháp và chế phẩm bất kỳ trong số các phương pháp và chế phẩm nêu trên của sáng chế có thể kết hợp với nhau và/hoặc với các khía cạnh khác nữa của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện cấu trúc tinh thể ba chiều của đime TfR tạo phức hợp với Tf, dựa trên tệp dữ liệu pdb 3SM9. Vùng đỉnh không gắn kết Tf của TfR được đánh dấu.

Fig.2A và Fig.2B thể hiện kết quả phân tích FACS của các dịch nổi dòng tế bào lai gốc của chuột gắn kết với TfR của người và khỉ Cynomolgus được biểu hiện nhất thời trong các tế bào 293 với sự có mặt của 1μM holo-Tf của người. Trừ khi có quy định khác, đường đồ thị có màu ghi là mức nền phát hiện kháng thể, đường màu ghi đậm là sự gắn kết với các tế bào 293 biểu hiện nội sinh các mức cơ bản TfR của người,

đường màu đen thể hiện sự gắn kết với TfR của người được biểu hiện nhất thời và đường màu ghi nhạt thể hiện sự gắn kết với TfR của khỉ Cynomolgous được biểu hiện nhất thời.

Fig.2C thể hiện các kết quả thử nghiệm cạnh tranh kháng thể phản ứng chéo của người/khỉ Cynomolgous như được mô tả trong Ví dụ 1. Chín trong số mười bốn dòng được xác định là ức chế sự gắn kết của kháng thể gắn kết đỉnh được bộc lộ trên thực khuẩn thể.

Fig.3A-1, Fig.3A-2, Fig.3B-1, Fig.3B-2, Fig.3C-1, Fig.3C-2, Fig.3D-1 và Fig.3D-2 thể hiện các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng tế bào lai mà gắn kết với các vùng đỉnh và không phải là đỉnh của TfR. Các trình tự này có thể được chia nhỏ tiếp theo epitop và độ tương tự trình tự thành lớp I-III (chất gắn kết phần đỉnh) và lớp IV (chất gắn kết không phải phần đỉnh). Các HVR theo Kabat được ký hiệu gạch dưới.

Fig.4A-1, Fig.4A-2, Fig.4B-1, Fig.4B-2, Fig.4C-1, Fig.4C-2, Fig.4D-1 và Fig.4D-2 thể hiện sắp xếp thẳng hàng các trình tự được nhân tính hóa cho (A) 15G11, (B) 7A4/8A2, (C) 7G7 và (D) 16F6. Mỗi trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (dòng thứ hai) được sắp xếp thẳng hàng theo miền biến đổi dòng tế bào mầm gần nhất của người hoặc miền biến đổi đồng thuận (dòng thứ nhất). Phiên bản được nhân tính hóa cho từng kháng thể được thể hiện ở dòng cuối cùng (dòng thứ ba). Sự khác biệt so với các trình tự dòng tế bào mầm của người hoặc trình tự đồng thuận được in bóng mờ. Trình tự HVR mà đã ghép vào khung của người được đóng khung. Các định nghĩa CDR theo Kabat được chỉ dẫn.

Fig.4E-1 và Fig.4E-2 thể hiện các nhóm lớp I-III của kháng thể, các dạng biến thể của kháng thể với các cải biến ở một hoặc nhiều gốc của FR vẫn giữ được ái lực và tính đặc hiệu gắn kết.

Fig.5 thể hiện sự gắn kết của hu7A4.v15, hu15G11.v5 và hu7G7.v1 với huTfR với sự có mặt của 6,3μM holo-Tf. Mức gắn kết kháng thể với huTfR (thụ thể transferrin của người) đã được cố định được thể hiện khi có mặt (biểu tượng rỗng và vạch đứt) hoặc khi không có mặt (biểu tượng đặc và nét liền) 6,3μM holo-Tf.

Fig.6A và Fig.6B thể hiện các kết quả về sự gắn kết HFE – HuTfR và thử nghiệm phong bế HFE được mô tả trong Ví dụ 1. Fig.6A thể hiện sự gắn kết của kháng

thể với các nồng độ gia tăng của huTfR được bắt giữ qua HFE đã được cố định. Fig.6B thể hiện sự gắn kết của huTfR với HFE đã được cố định với sự có mặt của nồng độ gia tăng của kháng thể.

Fig.7A và Fig.7B thể hiện các kết quả phân tích sự gắn kết của các biến thể 15G11.v5 và 7A4.v5 IgG và Fab Ala lên TfR của khỉ và TfR của người, chứng tỏ các tác động lên ái lực của đột biến Ala trong CDR-L3 và CDR-H3 của từng kháng thể được đánh giá như IgG bằng cách gắn kết ELISA và IgG hoặc Fab bằng cách phân tích SPR với TfR đã được cố định của người hoặc khỉ Cynomolgus, như được mô tả trong Ví dụ 2.

Fig.8A-Fig.B và Fig.9A-Fig.B thể hiện các kết quả của các thí nghiệm đánh giá tác động của tình trạng chức năng hiệu ứng lên hoạt tính ADCC của các kháng thể kháng TfR của người ("kháng hTFR") trong các tế bào đơn nhân tuỷ xương của người nguyên phát hoặc trong dòng tế bào nguyên hồng cầu của người, như được mô tả trong Ví dụ 4.

Fig.10 thể hiện phác đồ định liều và chọn mẫu cho nghiên cứu trên động vật linh trưởng được mô tả trong Ví dụ 5.

Fig.11A và Fig.11B thể hiện các kết quả về dược động học của các thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 5, cụ thể là các nồng độ huyết thanh của kháng TfR^1/BACE1, kháng TfR^2/BACE1 và kháng gD của từng con khỉ và trung bình của nhóm khỉ trong huyết thanh (Fig.11A) và trong CSF (Fig.11B) theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch liều duy nhất liều dùng 30mg/kg ở khỉ Cynomolgus.

Fig.12A-Fig.12E thể hiện các kết quả dược lực học của các thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 5, cụ thể là các nồng độ của kháng TfR^1/BACE1, kháng TfR^2/BACE1 và kháng gD của từng con và trung bình của nhóm các con khỉ trong huyết tương (A) hoặc CSF (B-E) theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch liều duy nhất ở 30mg/kg ở khỉ Cynomolgus. Đồ thị phía trên thể hiện nồng độ Abeta1-40 trong huyết tương (Fig.12A) và CSF (Fig.12B), trong khi các đồ thị phía dưới thể hiện nồng độ APPα hoà tan (Fig.12C), nồng độ APPβ hoà tan (Fig.12D), và tỷ lệ APPβ hoà tan/APPα hoà tan (Fig.12E) theo thời gian.

Fig.13A-Fig.13D thể hiện các kết quả xét nghiệm mẫu máu được tiến hành trong các nghiên cứu được mô tả trong Ví dụ 5. Ở mỗi thời điểm chỉ định, xác định

tổng số lượng hồng cầu lưới (Fig.13A), số lượng tế bào hồng cầu (Fig.13B), nồng độ hemoglobin (Fig.13D) và tỷ lệ % hồng cầu lưới chưa trưởng thành trên tổng số lượng gộp hồng cầu lưới (Fig.13C) bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn.

Fig.14 thể hiện phác đồ định liều và chọn mẫu cho nghiên cứu trên động vật linh trưởng được mô tả trong Ví dụ 6.

Fig.15A-Fig.15B thể hiện các kết quả dược lực học (A) và các nồng độ kháng thể trong não (B) của các thí nghiệm được mô tả trong Ví dụ 6. Cụ thể là, Fig.15A thể hiện tỷ lệ APPβ hoà tan/APPα hoà tan của kháng TfR^1/BACE1, kháng TfR^2/BACE1, kháng gD, và kháng BACE1 của từng con và trung bình của nhóm các con khỉ trong CSF theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch liều duy nhất ở 30mg/kg ở khỉ Cynomolgus. Fig.15B thể hiện các nồng độ của kháng thể kháng TfR^1/BACE1, kháng TfR^2/BACE1, kháng gD, và kháng BACE1 ở các vùng khác nhau của não ở 24 giờ sau khi tiêm thuốc.

Fig.16A-Fig.B thể hiện các trình tự axit amin chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng BACE1 dòng YW412.8 thu được từ bộ chưa quen thí nghiệm của thư viện biểu hiện thực khuẩn thể đa dạng có trong tự nhiên và các dạng được làm trưởng thành bằng ái lực của YW412.8. Fig.16A thể hiện sắp xếp thẳng hàng trình tự chuỗi nhẹ biến đổi (VL) (SEQ ID NO.132- SEQ ID NO.137). Fig.16B thể hiện sắp xếp thẳng hàng trình tự chuỗi nặng biến đổi (SEQ ID No.138- SEQ ID No.139). Trong cả hai hình vẽ này, trình tự HVR cho mỗi dòng được chỉ ra bằng các vùng được đóng khung, trong đó khung thứ nhất chỉ HVR-L1 (Fig.16A) hoặc HVR-H1 (Fig.16B), khung thứ hai chỉ HVR-L2 (Fig.16A) hoặc HVR-H2 (Fig.16B), và khung thứ ba chỉ HVR-L3 (Fig.16A) hoặc HVR-H3 (Fig.16B).

Fig.17A-Fig.B thể hiện các trình tự axit amin chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của dòng kháng thể kháng BACE1 Fab 12 thu được từ bộ chưa quen thí nghiệm của thư viện biểu hiện thực khuẩn thể đa đạng tổng hợp và các dạng được làm trưởng thành bằng ái lực của Fab 12. Fig.17A thể hiện sắp xếp thẳng hàng trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO.140- SEQ ID NO.143). Fig.17B thể hiện sắp xếp thẳng hàng trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO. 144). Trên cả hai hình vẽ này, trình tự HVR cho mỗi dòng được chỉ ra bằng các vùng được đóng khung, trong đó hộp thứ nhất chỉ HVR-L1 (Fig.17A) hoặc

HVR-H1 (Fig.17B), hộp thứ hai chỉ HVR-L2 (Fig.17A) hoặc HVR-H2 (Fig.17B), và hộp thứ ba chỉ HVR-L3 (Fig.17A) hoặc HVR-H3 (Fig.17B).

Fig.18A-Fig.18B thể hiện chuỗi nặng (Fig.18A; SEQ ID NO:145) và chuỗi nhẹ (Fig.18B; SEQ ID NO:146) của kháng thể kháng Abeta được lấy làm ví dụ.

Fig.19 thể hiện các tính chất dược động học của kháng TfR^{1}/BACE1, kháng TfR^{52A}/BACE1 và kháng TfR^{53A}/BACE1 như được mô tả trong Ví dụ 5.

Fig.20 thể hiện các tính chất dược động học của các kháng thể IgG2a kháng TfR^{D}/BACE1 và kháng gD của chuột với các đột biến LALAPG ở chức năng hiệu ứng Fc như được mô tả trong Ví dụ 7.

Fig.21 thể hiện số lượng hồng cầu lưới toàn phần và số lượng hồng cầu lưới chưa trưởng thành ở chuột 24 giờ sau khi sử dụng liều dùng 50mg/kg các kháng thể IgG2a kháng TfR^{D}/BACE1 và kháng gD của chuột với các đột biến LALAPG ở chức năng hiệu ứng Fc như được mô tả trong Ví dụ 7.

Fig.22 thể hiện số lượng hồng cầu lưới toàn phần ở chuột 24 giờ sau khi sử dụng liều dùng 50mg/kg các kháng thể kháng TfR^{52A}/BACE1 (N297G), kháng TfR^{52A}/BACE1 (LALAPG), kháng TfR^{52}A/BACE1 (LALAPG/YTE), TfR^{52}A/BACE1 (LALAPG/AI) ở chuột được cài gen thụ thể transferrin của người như được mô tả trong Ví dụ 8.

Fig.23 thể hiện các kết quả của các thí nghiệm đánh giá tác động của tình trạng chức năng hiệu ứng lên hoạt tính ADCC của các kháng thể kháng TfR/gD, kháng TfR/BACE1 (N297G), kháng TfR/BACE1 (LALAPG), kháng TfR/BACE1 (N297G/434A/436I) và kháng TfR/BACE1 (LALAPG/YTE) trong các tế bào đơn nhân tuỷ xương của người nguyên phát hoặc trong dòng tế bào nguyên hồng cầu của người, như được mô tả trong Ví dụ 8.

Fig.24 thể hiện các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 1511Gv.5 (chuỗi nhẹ - SEQ ID NO:105 và chuỗi nặng – SEQ ID NO:108) và các biến thể ái lực 15G11.52A (chuỗi nhẹ – SEQ ID NO:105 và chuỗi nặng – SEQ ID NO:153), 15G11.53A (chuỗi nhẹ – SEQ ID NO:105 và chuỗi nặng – SEQ ID NO:154) và 15G11.92A (chuỗi nhẹ – SEQ ID NO:151 và chuỗi nặng – SEQ ID NO:108). Các HVR theo Kabat được gạch chân.

Fig.25 thể hiện thử nghiệm cạnh tranh giữa 15G11v.5 và kháng TfR^{C12} như được mô tả trong Ví dụ 1.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Định nghĩa

"Ái lực" chỉ cường độ tổng cộng các tương tác không phải cộng hoá trị giữa vị trí gắn kết duy nhất của một phân tử (ví dụ, và kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả này, "ái lực gắn kết" chỉ ái lực gắn kết nội tại phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của một cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tác Y của nó thường có thể được biểu thị bằng hằng số phân ly (KD, là tỷ số giữa tốc độ phân ly của X khỏi Y (kd hoặc Koff) so với tốc độ kết hợp của X với Y (ka hoặc kon)). Một chỉ số dùng thay thế cho ái lực của một hoặc nhiều kháng thể đối với đích của nó là nồng độ ức chế tối đa 50% (IC50), chỉ số xác định mức kháng thể là cần thiết để ức chế sự gắn kết của phối tử đã biết với đích kháng thể này ở mức 50%. Ái lực có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Các phương án minh hoạ cụ thể và được lấy làm ví dụ để xác định ái lực gắn kết được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "hàng rào máu-não" hoặc "BBB" chỉ hàng rào sinh lý giữa máu ngoại vi và não và tuỷ sống (có nghĩa là, CNS) được tạo thành bởi các chỗ giao nhau không thấm trong các màng huyết tương nội mô mạch máu của não, tạo ra một hàng rào không thấm mà hạn chế sự vận chuyển của các phân tử vào não, thậm chí các các phân tử rất nhỏ như ure (60 Dalton). Hàng rào máu-não trong não, hàng rào máu-tuỷ sống trong tuỷ sống, và hàng rào máu-võng mạc trong võng mạch là các hàng rào mạch máu tiếp giáp trong CNS, và được gọi chung trong bản mô tả này là hàng rào máu-não hoặc BBB. BBB cũng bao hàm hàng rào máu-CSF (dây đám rối màng mạch), trong đó hàng rào này bao gồm các tế bào màng não thất chứ không phải là các tế bào nội mô mạch máu.

Các thuật ngữ "amyloit beta," "beta-amyloit," "Abeta," "amyloit β," và "Aβ", được sử dụng thay thế lẫn nhau, để chỉ mảnh protein tiền chất amyloit ("APP") được sản sinh khi phân giải APP bằng β-secretaza 1 ("BACE1"), cũng như các cải biến, các

mảnh và chất tương đương về chức năng bất kỳ của chúng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Aâ$_{1-40}$, và Aβ$_{1-42}$. Aβ đã biết là tồn tại dưới dạng monome, cũng như kết hợp để tạo thành các oligome và các cấu trúc sợi, mà có thể xác định như là các thành viên cấu tạo của các mảng bám amyloit. Cấu trúc và trình tự của các peptit Aβ này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này và các phương pháp sản xuất các peptit này hoặc phương pháp chiết xuất chúng từ não và các mô khác được mô tả, ví dụ, trong Glenner and Wong, Biochem Biophys Res. Comm. 129: 885-890 (1984). Ngoài ra, các peptit Aβ cũng có bán sẵn ở nhiều dạng khác nhau.

"Globulin miễn dịch kháng Abeta," "kháng thể kháng Abeta," và "kháng thể gắn kết Abeta" là được sử dụng thay thế lẫn nhau, và chỉ kháng thể gắn kết đặc hiệu với Abeta của người. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về kháng thể kháng Abeta là crenezumab. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các kháng thể kháng Abeta là solanezumab, bapineuzumab, gantenerumab, aducanumab, ponezumab và các kháng thể kháng Abeta bất kỳ được đề cập trong: WO2000162801, WO2002046237, WO2002003911, WO2003016466, WO2003016467, WO2003077858, WO2004029629, WO2004032868, WO2004032868, WO2004108895, WO2005028511, WO2006039470, WO2006036291, WO2006066089, WO2006066171, WO2006066049, WO2006095041, WO2009027105.

Các thuật ngữ "crenezumab" và "MABT5102A" được sử dụng thay thế lẫn nhau, và chỉ kháng thể kháng Abeta đặc hiệu mà gắn kết với các dạng monome, oligome, và dạng sợi của Abeta, và có số đăng ký CAS là 1095207. Theo một phương án, kháng thể này bao gồm các trình tự nêu trong trên Fig.18A và Fig.18B.

"Chất mang apolipoprotein E4" hoặc "chất mang ApoE4," được sử dụng thay thế lẫn nhau với "apolipoprotein E4 +" hoặc "ApoE4 +," chỉ cá thể có ít nhất một alen apolipoprotein E4 (hoặc "ApoE4"). Cá thể không có các alen ApoE4 trong bản mô tả này được gọi là "ApoE4 -" hoặc "chất không mang ApoE4." Xem tài liệu *Am. J Pathol.* 148:2083−95 1996, của Prekumar, *et al.*.

Thuật ngữ "phù não căn nguyên mạch máu" được dùng để chỉ sự tích luỹ quá mức chất lỏng hoặc protein trong mạch trong các khoang nội bào hoặc ngoại bào của não. Sự phù não căn nguyên mạch máu có thể được phát hiện bằng, ví dụ, chụp cộng

hưởng từ (MRI) não, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, MRI FLAIR, và có thể không có triệu chứng ("phù căn nguyên mạch không biểu hiện triệu chứng") hoặc kết hợp với triệu chứng thần kinh, như lẫn, chóng mặt, nôn, và hôn mê ("phù căn nguyên mạch có biểu hiện triệu chứng") (xem *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011 của *Sperling et al.*).

Thuật ngữ "xuất huyết não vùng lớn" được dùng để chỉ sự xuất huyết trong não, hoặc sự chảy máu trong não, ở vùng có đường kính khoảng > 1cm. Sự xuất huyết não vùng lớn có thể phát hiện bằng, ví dụ, MRI não, bao gồm nhưng không giới hạn ở, T2*-GRE MRI, và có thể không biểu hiện triệu chứng ("xuất huyết vùng lớn không biểu hiện triệu chứng") hoặc kèm theo các triệu chứng như thiểu năng vận động hoặc thiểu năng cảm giác tiêu điểm thoáng qua hoặc vĩnh viễn, mất điều hoà, mất ngôn ngữ, và chứng loạn cận ngôn ("xuất huyết vùng lớn có biểu hiện triệu chứng") (xem, ví dụ, *J. Expert Rev. Neurother*. 2004 4:267, 2004 của Chalela JA, Gomes và *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011 của Sperling *et al.*).

Thuật ngữ "xuất huyết não vùng nhỏ" được dùng để chỉ sự xuất huyết trong sọ não, hoặc chảy máu trong não, vùng có đường kính khoảng < 1cm. Sự xuất huyết não vùng nhỏ có thể phát hiện bằng, ví dụ, MRI não, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, T2*-GRE MRI, và có thể không biểu hiện triệu chứng ("xuất huyết vùng nhỏ không biểu hiện triệu chứng") hoặc có thể kèm theo các triệu chứng như thiểu năng vận động hoặc thiểu năng cảm giác tiêu điểm thoáng qua hoặc vĩnh viễn, mất điều hoà, mất ngôn ngữ, và chứng loạn cận ngôn ("xuất huyết vùng nhỏ biểu hiện triệu chứng"). Xem, ví dụ, *Lancet Neurol*. 8:165−74 2009 của Greenberg, *et al.*.

Thuật ngữ "tràn dịch rãnh não" được dùng để chỉ sự tràn dịch ở nếp gấp hoặc rãnh của não. Sự tràn dịch rãnh não này có thể phát hiện bằng, ví dụ, MRI não, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, FLAIR MRI. Xem *Alzheimer's & Dementia*, 7:367, 2011 của Sperling *et al.*.

Thuật ngữ "nhiễm sắt bề mặt của hệ thần kinh trung ương" được dùng để chỉ sự chảy máu hoặc xuất huyết vào khoang dưới màng nhện của não và có thể phát hiện bằng, ví dụ, MRI não, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, T2*-GRE MRI. Các triệu chứng biểu hiện sự nhiễm sắt bề mặt hệ thần kinh trung ương bao gồm điếc thần kinh

cảm giác, mất điều hoà tiểu não, và các dấu hiệu ngoại tháp. Xem, *Am J Neuroradiol*. 31:5, 2010 của Kumara-N.

Thuật ngữ "chứng thoái hoá dạng tinh bột," như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ nhóm các bệnh và rối loạn bệnh do hoặc có liên quan đến các protein amyloit hoặc tương tự amyloit và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bệnh và rối loạn bệnh do sự có mặt hoặc hoạt tính của các protein tương tự amyloit ở trạng thái monome, sợi, hoặc polyme, hoặc dạng tổ hợp bất kỳ của ba trạng thái này, kể cả các mảng bám amyloit. Các bệnh này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và chứng thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi tác, như các bệnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer ("AD"), bệnh hoặc tình trạng bệnh đặc trưng bởi sự mất trí nhớ, ví dụ, chứng thiểu năng nhận thức nhẹ (MCI), chứng mất trí nhớ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền kèm theo chứng thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch), tổ hợp bệnh mất trí nhớ-Parkinson Guam và các bệnh khác có căn nguyên hoặc có liên quan đến các protein tương tự amyloit như bệnh liệt trên nhân tiến triển, bệnh đa xơ cứng, bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, chứng mất trí nhớ có liên quan đến HIV, bệnh ALS (bệnh xơ cứng teo cơ cột bên), bệnh viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường khởi phát ở người trưởng thành, khối u nội tiết và chứng thoái hoá dạng tinh bột do tim mạch ở người già, và các bệnh về mắt khác nhau bao gồm chứng thoái hoá điểm vàng, bệnh thần kinh nhãn khoa có liên quan đến điểm vàng, chứng tăng nhãn áp, và chứng đục thuỷ tinh thể do kết lắng beta-amyloit.

Chứng tăng nhãn áp là nhóm các bệnh của thần kinh thị giác liên quan đến việc mất các tế bào hạch võng mạc (RGC) theo kiểu đặc trưng của bệnh thần kinh thị giác. Các RGC là các tế bào thần kinh truyền tín hiệu thị giác từ mắt đến não. Caspaza-3 và Caspaza-8, hai enzym chính trong quá trình chết tế bào theo chương trình, bị hoạt hoá trong quá trình này dẫn đến sự chết tế bào theo chương trình của các RGC. Caspaza-3 phân giải protein tiền chất amyloit (APP) để tạo ra các mảnh độc tính thần kinh, kể cả Abeta. Khi không có tác dụng bảo vệ của APP, sự tích luỹ Abeta trong lớp tế bào hạch võng mạc dẫn đến sự chết các RGC và sự mất thị lực không hồi phục được.

Chứng tăng nhãn áp thường kèm theo, nhưng không phải trong mọi trường hợp, sự tăng áp lực trong mắt, mà có thể là hậu quả của việc phong bế tuần hoàn của nước hoặc dẫn lưu nước. Mặc dù áp lực trong nhãn cầu là yếu tố nguy cơ đáng kể làm phát

triển chứng tăng nhãn áp, không thể xác định được ngưỡng áp lực trong nhãn cầu mà có tính quyết định gây ra chứng tăng nhãn áp. Cũng có thể gây ra sự hư hại do sự cung cấp máu đến các dây thần kinh thị giác kém, cấu trúc thần kinh yếu, và/hoặc sức khoẻ của bản thân các dây thần kinh này có vấn đề. Chứng tăng nhãn áp không được điều trị dẫn đến sự hư hại vĩnh viễn thần kinh thị giác và mất thị trường kéo theo, có thể tiến triển thành bị mù.

Thuật ngữ "bệnh Alzheimer thể nhẹ" hoặc "bệnh AD thể nhẹ" như được sử dụng trong bản mô tả này (ví dụ, "bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh AD thể nhẹ") được dùng để chỉ một giai đoạn của AD đặc trưng bởi điểm đánh giá tâm thần tối thiểu (MMSE) nằm trong khoảng từ 20 đến 26.

Thuật ngữ "bệnh Alzheimer thể nhẹ đến trung bình" hoặc "bệnh AD thể nhẹ đến trung bình" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm cả bệnh AD thể nhẹ và bệnh AD thể trung bình, và được đặc trưng bởi điểm MMSE nằm trong khoảng từ 18 đến 26.

Thuật ngữ "bệnh Alzheimer thể trung bình" hoặc "bệnh AD thể trung bình" như được sử dụng trong bản mô tả này (ví dụ, "bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh AD thể trung bình") được dùng để chỉ một giai đoạn của AD đặc trưng bởi điểm MMSE nằm trong khoảng từ 18 đến 19.

"Hệ thần kinh trung ương" hoặc "CNS" được dùng để chỉ phức hợp các mô thần kinh kiểm soát chức năng của cơ thể, và bao gồm não và tuỷ sống.

"Thụ thể hàng rào máu-não" (viết tắt là "BBB-R" trong bản mô tả này) là protein thụ thể xuyên màng được biểu hiện trên các tế bào nội mô não có khả năng vận chuyển các phân tử đi qua hàng rào máu-não. Ví dụ về BBB-R bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thụ thể transferrin (TfR), thụ thể insulin, thụ thể yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF-R), các thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein có liên quan đến thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp 1 (LRP1) và protein có liên quan đến thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp 8 (LRP8), chất vận chuyển glucoza 1 (Glut1) và thụ thể yếu tố tăng trưởng giống yếu tố tăng trưởng biểu bì gắn kết heparin (HB-EGF). BBB-R được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này là thụ thể transferrin (TfR).

Thuật ngữ "thụ thể transferrin" hoặc "TfR", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ TfR nguyên thuỷ bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như các động vật linh trưởng (ví dụ, người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm TfR chưa được xử lý "có độ dài đầy đủ," cũng như dạng TfR bất kỳ thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể xuất hiện trong tự nhiên của TfR, ví dụ, các biến thể ghép hoặc các biến thể alen. TfR là glycoprotein xuyên màng (với phân tử lượng khoảng 180000) gồm có hai cấu trúc dưới phân tử được liên kết bằng đisulfua (mỗi cấu trúc có phân tử lượng khoảng 90000) tham gia vào quá trình hấp thụ sắt ở các động vật có xương sống. Theo một phương án, TfR trong bản mô tả này là TfR của người ("hTfR") bao gồm trình tự axit amin như Schneider et al. nêu trong tài liệu: *Nature* 311: 675 - 678 (1984), ví dụ (SEQ ID NO:1). Theo một phương án khác, TfR trong bản mô tả này là TfR của động vật linh trưởng ("pTfR") bao gồm trình tự axit amin như nêu trong Ngân hàng gen số tham chiếu AFD18260.1 (SEQ ID NO:2). Để so sánh, trình tự TfR của chuột có thể tìm thấy trong Ngân hàng gen số tham chiếu AAH54522.1 (SEQ ID NO:3).

"Rối loạn thần kinh" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ bệnh hoặc rối loạn bệnh lý tác động đến CNS và/hoặc có căn nguyên ở CNS. Ví dụ về các bệnh hoặc rối loạn bệnh lý CNS bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh thần kinh, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh ung thư, bệnh hoặc rối loạn bệnh lý ở mắt, bệnh nhiễm virut hoặc vi khuẩn, bệnh viêm nhiễm, chứng thiếu máu cục bộ, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh động kinh, các rối loạn hành vi, và bệnh ứ đọng ty lạp thể. Trong bản mô tả này, CNS sẽ được hiểu là bao gồm mắt, thường tách biệt khỏi phần còn lại của cơ thể bằng hàng rào máu-võng mạc. Ví dụ cụ thể về các rối loạn thần kinh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bệnh thoái hoá thần kinh (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh thể Lewy, hội chứng sau khi bị bệnh bại liệt, hội chứng Shy-Draeger, bệnh teo trám cầu tiểu não, bệnh Parkinson, chứng teo đa hệ thống, chứng thoái hoá thể vân chất đen, các bệnh do protein tau (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Alzheimer và bệnh liệt trên nhân), các bệnh prion (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh bò điên, bệnh thần kinh ở cừu dê, hội chứng Creutzfeldt-Jakob, bệnh run, bệnh Gerstmann-Straussler-Scheinker, bệnh suy mòn mãn tính, và chứng mất ngủ di truyền gây tử vong), chứng liệt hành tuỷ, bệnh nơron vận động, và rối loạn bệnh lý dị thoái

hoá hệ thần kinh (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Canavan, bệnh Huntington, bệnh thoái hoá tích luỹ lipofuscin ở tế bào thần kinh, bệnh Alexander, hội chứng Tourette, hội chứng tóc cứng Menkes, hội chứng Cockayne, hội chứng Halervorden-Spatz, bệnh Lafora, hội chứng Rett, chứng thoái hoá gan nhân đậu, hội chứng Lesch-Nyhan, và hội chứng Unverricht-Lundborg), bệnh mất trí nhớ (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh Pick, và chứng mất điều hoà tuỷ sống tiểu não), bệnh ung thư (ví dụ, bệnh ung thư CNS, kể cả di căn não do bệnh ung thư ở chỗ khác trong cơ thể).

"Thuốc rối loạn thần kinh" là thuốc hoặc chất trị liệu điều trị một hoặc nhiều rối loạn thần kinh. Thuốc rối loạn thần kinh theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể, các peptit, các protein, các phối tử tự nhiên của một hoặc nhiều đích CNS, các phiên bản được cải biến của các phối tử tự nhiên của một hoặc nhiều đích CNS, các aptame, các axit nucleic ức chế (có nghĩa là, các ARN ức chế kích thước nhỏ (siRNA) và các ARN cấu trúc kẹp tóc mạch ngắn (shRNA)), các ribozym, và các phân tử nhỏ, hoặc các mảnh có hoạt tính bất kỳ trong số các phân tử nêu trên. Các thuốc rối loạn thần kinh theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các kháng thể, các aptame, các protein, các peptit, các axit nucleic ức chế và các phân tử nhỏ và các mảnh có hoạt tính bất kỳ trong số các phân tử nêu trên mà bản thân chúng hoặc nhận biết đặc hiệu và/hoặc tác động lên (có nghĩa là, ức chế, hoạt hoá, hoặc phát hiện) kháng nguyên CNS hoặc phân tử đích như, không chỉ giới hạn ở, protein tiền chất amyloit hoặc các phần của nó, amyloit beta, beta-secretaza, gamma-secretaza, tau, alpha-synuclein, parkin, huntingtin, DR6, presenilin, ApoE, các chất đánh dấu u thần kinh đệm hoặc bệnh ung thư CNS khác, và các neurotrophin. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các thuốc rối loạn thần kinh và các rối loạn bệnh lý mà chúng có thể được sử dụng để điều trị được đề cập trong Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các thuốc rối loạn thần kinh và các rối loạn bệnh lý tương ứng mà chúng có thể được sử dụng để điều trị

Thuốc	Rối loạn thần kinh
Kháng thể kháng BACE1	Bệnh Alzheimer, tổn thương não cấp và mãn tính, bệnh đột quỵ

Kháng thể kháng Abeta	Bệnh Alzheimer
Kháng thể kháng Tau	Bệnh Alzheimer, các bệnh do protein tau
Neurotrophin	Bệnh đột quỵ, tổn thương não cấp tính, tổn thương tuỷ sống
Yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 2 (FGF-2)	Tổn thương não mãn tính (phát sinh thần kinh)
Kháng thể kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR)	Bệnh ung thư não
Yếu tố thần kinh nguồn gốc dòng tế bào thần kinh đệm (GDNF)	Bệnh Parkinson
Yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF)	Bệnh xơ cứng teo cơ cột bên, bệnh trầm cảm
Enzym tiêu thể	Các rối loạn bệnh lý dự trữ tiêu thể của não
Yếu tố dinh dưỡng thần kinh lông tiết (CNTF)	Bệnh xơ cứng teo cơ cột bên
Neuregulin-1	Bệnh tâm thần phân liệt
Kháng thể kháng HER2 (ví dụ trastuzumab, pertuzumab, v.v.)	Di căn não do bệnh ung thư dương tính với HER2
Kháng thể kháng VEGF (ví dụ, bevacizumab)	U nguyên bào đệm tái phát hoặc mới chẩn đoán, u thần kinh đệm ác tính tái phát, di căn não

"Chất tạo hình ảnh" là hợp chất có một hoặc nhiều tính chất mà cho phép sự có mặt và/hoặc vị trí của nó có thể được phát hiện trực tiếp hoặc gián tiếp. Các ví dụ về các chất tạo hình ảnh bao gồm các protein và các hợp chất phân tử nhỏ kết hợp với gốc được đánh dấu cho phép phát hiện nó.

"Kháng nguyên CNS" hoặc "kháng nguyên não" là kháng nguyên được biểu hiện trong CNS, bao gồm não, mà có thể được hướng đích bằng kháng thể hoặc phân tử nhỏ. Các ví dụ về các kháng nguyên này bao gồm không giới hạn ở: beta-secretaza 1 (BACE1), amyloit beta (Abeta), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì của người 2 (HER2), tau, apolipoprotein E4 (ApoE4), alpha-synuclein, CD20, huntingtin, protein prion (PrP), kinaza đoạn lặp giàu lơxin 2 (LRRK2), parkin, presenilin 1, presenilin 2, gamma secretaza, thụ thể chết 6 (DR6), protein tiền chất amyloit (APP), thụ thể neurotrophin p75 (p75NTR), thụ thể intơlơkin 6 (IL6R), TNF thụ thể 1 (TNFR1), intơlơkin 1 beta (IL1β), và caspaza 6. Theo một phương án, kháng nguyên là BACE1.

Thuật ngữ "BACE1," như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ beta-secretaza 1 nguyên thuỷ bất kỳ (còn được gọi là enzym phân giải protein tiền chất amyloit vị trí β 1, aspartic proteaza kết hợp màng 2, memapsin 2, aspartyl proteaza 2 hoặc Asp2) từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, kể cả các động vật có vú, như các động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm BACE1 chưa được xử lý "có độ dài đầy đủ," cũng như dạng bất kỳ của BACE1 thu được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể xuất hiện trong tự nhiên của BACE1, ví dụ, các biến thể ghép hoặc các biến thể alen. Trình tự axit amin của polypeptit BACE1 được lấy làm ví dụ là trình tự cho BACE1 của người, đồng dạng A được *Vassar et al.* báo cáo trong: *Science* 286:735-741 (1999), được viện dẫn ở đây để tham khảo. Một vài đồng dạng khác của BACE1 của người tồn tại bao gồm các đồng dạng B, C và D. Xem: UniProtKB/Swiss-Prot Entry P56817, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng beta-secretaza", "kháng thể kháng BACE1", "kháng thể gắn kết với beta-secretaza" và "kháng thể gắn kết với BACE1" được dùng để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết BACE1 với ái lực đủ mạnh sao cho kháng thể này hữu ích để làm chất chẩn đoán và/hoặc chất trị liệu để hướng đích BACE1. Theo

một phương án, mức độ gắn kết của kháng thể kháng BACE1 với protein không phải BACE1 không liên quan là ít hơn khoảng 10% mức độ gắn kết của kháng thể này với BACE1 như được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể gắn kết với BACE1 có hằng số phân ly (Kd) là $\leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0,1nM$, $\leq 0,01nM$, hoặc $\leq 0,001nM$ (ví dụ, $10^{-8}M$ hoặc ít hơn, ví dụ, từ $10^{-8}M$ đến $10^{-13}M$, ví dụ, từ $10^{-9}M$ đến $10^{-13}M$). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng BACE1 gắn kết với epitop của BACE1 mà được bảo toàn giữa các BACE1 từ các loài khác nhau và các đồng dạng BACE1. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với epitop trên BACE1 mà được gắn kết bởi kháng thể kháng BACE1 YW412.8.31. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với vị trí gắn kết phụ trong BACE1 nằm ở miền xúc tác của BACE1. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể cạnh tranh với các peptit được Kornacker *et al.* xác định trong: *Biochem.* 44:11567-11573 (2005), được viện dẫn ở đây để tham khảo, (có nghĩa là, các peptit 1, 2, 3, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 2-12, 3-12, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 4, 5, 6, 5-10, 5-9, hỗn hợp, Y5A, P6A, Y7A, F8A, I9A, P10A và L11A) để gắn kết với BACE1. Các trình tự kháng thể BACE1 được lấy làm ví dụ được thể hiện trên Fig.15A-Fig.B và Fig.16A-Fig.B. Ví dụ về một kháng thể trong bản mô tả này bao gồm các miền biến đổi của kháng thể YW412.8.31 (ví dụ như trên Fig.15A-Fig.B).

Protein "trình tự nguyên thuỷ" trong bản mô tả này được dùng để chỉ protein bao gồm trình tự axit amin của protein tìm thấy trong tự nhiên, kể cả các biến thể xuất hiện trong tự nhiên của protein này. Thuật ngữ như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm protein như được phân lập từ nguồn tự nhiên của nó hoặc được sản xuất bằng cách tái tổ hợp.

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả này theo nghĩa rộng nhất và bao gồm nhiều cấu trúc kháng thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu (*ví dụ* các kháng thể lưỡng đặc hiệu), và các mảnh kháng thể miễn là chúng thể hiện hoạt tính gắn kết-kháng nguyên mong muốn.

"Mảnh kháng thể" được dùng để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn gắn kết với. Các ví dụ về các mảnh kháng thể là đã biết trong lĩnh vực này

(xem, ví dụ, Nelson, MAbs (2010) 2(1): 77-83) và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, và Fv; các kháng thể thể đôi; các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể đơn chuỗi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các mảnh biến đổi đơn chuỗi (scFv), các thể dung hợp của các miền gắn kết kháng nguyên chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng có kèm theo hoặc không kèm theo liên kết (và tuỳ ý ở dạng 'xe đạp đôi'); và các phân tử gắn kết kháng nguyên đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể (bao gồm, nhưng không giới hạn ở các kháng thể đa đặc hiệu được cấu trúc từ nhiều miền biến đổi mà thiếu vùng Fc).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ kháng thể thu được từ tập hợp các kháng thể về cơ bản đồng nhất, có nghĩa là, các kháng thể cá thể cấu thành tập hợp này là giống nhau và/hoặc gắn kết với cùng một epitop, ngoại trừ các biến thể có thể có, ví dụ, có chứa các đột biến xuất hiện trong tự nhiên hoặc có thể phát sinh trong quá trình sản xuất kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng nhỏ. Trái ngược với các chế phẩm kháng thể đa dòng, thường bao gồm các kháng thể kháng nhau nhằm kháng lại các phần quyết định tính kháng nguyên khác nhau (các epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng nhằm kháng lại phần quyết định tính kháng nguyên duy nhất trên kháng nguyên. Từ bổ nghĩa "đơn dòng" được dùng để chỉ đặc tính của kháng thể như thu được từ tập hợp cơ bản là đồng nhất của các kháng thể, và không được hiểu là yêu cầu sản xuất kháng thể theo phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng sẽ sử dụng theo sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp tế bào lai (xem, ví dụ, *Nature*, 256:495 (1975) của Kohler *et al.*), các phương pháp ADN tái tổ hợp (xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 4816567), các phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể (ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật được Clackson *et al.,* mô tả trong *Nature,* 352:624-628 (1991) và *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) của Marks *et al.*), và các phương pháp sử dụng động vật chuyển gen có mang tất cả hoặc một phần locus của globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp ví dụ khác để điều chế các kháng thể đơn dòng được mô tả trong bản mô tả này. Các ví dụ cụ thể về các kháng thể đơn dòng bao gồm các kháng thể khảm, các kháng thể được nhân tính hóa, và các kháng thể của người, kể cả các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Các kháng thể đơn dòng trong bản mô tả này cụ thể bao gồm các kháng thể "khảm" (các globulin miễn dịch), trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ một loài cụ thể hoặc thuộc về một lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là giống với hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ một loài khác hoặc thuộc nhóm hoặc phân nhóm kháng thể khác, cũng như các mảnh của các kháng thể này, sao cho chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn (Bằng sáng chế Mỹ số 4816567; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984) của Morrison *et al.*).

"Khung tiếp nhận của người" là vùng khung bao gồm trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) thu được từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung đồng thuận của người, như được xác định dưới đây. Một khung tiếp nhận của người "thu được từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung đồng thuận của người có thể bao gồm cùng một trình tự axit amin của nó, hoặc có thể có chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một vài phương án, số lượng các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một vài phương án, khung tiếp nhận VL của người là tương đồng trình tự với trình tự khung VL globulin miễn dịch của người hoặc trình tự khung đồng thuận của người.

"Khung đồng thuận của người" là khung thể hiện các gốc axit amin hay gặp nhất trong bộ chọn lọc các trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Nói chung, việc chọn lọc các trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm các trình tự miền biến đổi. Nói chung, phân nhóm các trình tự là phân nhóm do Kabat et al., mô tả trong: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), các tập 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm I theo Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm là phân nhóm III theo Kabat et al., nêu trên.

Các dạng "được nhân tính hóa" của các kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) là các kháng thể khảm có chứa trình tự tối thiểu thu được từ các kháng thể không phải của người. Phần lớn là, các kháng thể được nhân tính hóa là các kháng thể

của người (kháng thể nhận), trong đó các gốc của vùng siêu biến đổi của kháng thể nhận được thay thế bằng các gốc từ vùng siêu biến đổi của loài không phải là người (kháng thể cho) như chuột, chuột cống, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải là người có tính đặc hiệu, ái lực, và khả năng mong muốn. Ví dụ, theo các phương án nhất định, kháng thể được nhân tính hóa sẽ bao gồm gần như tất cả ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các HVR (ví dụ, các CDR) tương ứng với các miền này của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc gần như tất cả vùng khung (các FR) tương ứng với các vùng này của kháng thể của người. Trong một vài trường hợp, các gốc FR của globulin miễn dịch của người được thay bằng các gốc không phải của người tương ứng. Hơn nữa, các kháng thể được nhân tính hóa có thể bao gồm các gốc không tìm thấy trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Các cải biến này được thực hiện để tinh chế tính chất kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể được nhân tính hóa sẽ bao gồm gần như tất cả ít nhất một, và thông thường là hai miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vùng siêu biến đổi tương ứng với các vùng này của kháng thể không phải của người và tất cả hoặc gần như tất cả các FR là các vùng của kháng thể của người, ngoại trừ các thay thế FR như nêu trên. Kháng thể được nhân tính hóa tuỳ ý cũng sẽ bao gồm ít nhất một phần của vùng cố định kháng thể, thường là vùng này của kháng thể của người. "Dạng được nhân tính hóa" của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, chỉ kháng thể đã được làm tương thích với người. Xem chi tiết trong: *Nature* 321:522-525 (1986) của Jones *et al.*; *Nature* 332:323-329 (1988) của Riechmann *et al.*; và *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992) của Presta.

"Kháng thể của người" trong bản mô tả này là kháng thể bao gồm cấu trúc trình tự axit amin tương ứng với cấu trúc trình tự axit amin của kháng thể được sản sinh bởi con người hoặc tế bào của người hoặc thu được từ nguồn không phải của người mà sử dụng tập hợp kháng thể của người hoặc các trình tự mã hoá kháng thể của người. Định nghĩa về kháng thể của người này loại trừ một cách cụ thể kháng thể được nhân tính hóa bao gồm các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người. Các kháng thể này có thể được nhận biết hoặc điều chế bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: sản xuất bằng các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột) có khả năng, khi gây miễn dịch, sản xuất các kháng thể của người khi không có sự sản xuất globulin miễn dịch nội sinh (xem, ví dụ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993) của Jakobovits *et al.*;

Nature, 362:255-258 (1993) của Jakobovits *et al.*; *Year in Immuno.*, 7:33 (1993) của Bruggermann *et al.*; và các bằng sáng chế Mỹ số 5591669, 5589369 và 5545807)); việc chọn lọc từ thư viện biểu hiện thực khuẩn thể biểu hiện các kháng thể của người hoặc các mảnh kháng thể của người (xem, ví dụ, *Nature* 348:552-553 (1990) của McCafferty *et al.*; *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993) của Johnson *et al.*; *Nature*, 352:624-628 (1991) của Clackson *et al.*; *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) của Marks *et al.*; *EMBO J.* 12:725-734 (1993) của Griffith *et al.*; các bằng sáng chế Mỹ số 5565332 và 5573905); sự hình thành thông qua tế bào B được hoạt hoá *in vitro* (xem các bằng sáng chế Mỹ số 5567610 và 5229275); và sự phân lập từ các tế bào lai sản xuất kháng thể của người.

"Kháng thể đa đặc hiệu" trong bản mô tả này là kháng thể có các tính đặc hiệu gắn kết với ít nhất hai epitop khác nhau. Các kháng thể đa đặc hiệu ví dụ có thể gắn kết cả TfR và kháng nguyên não. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể được điều chế như các kháng thể có độ dài đầy đủ hoặc các mảnh kháng thể (*ví dụ* các kháng thể lưỡng đặc hiệu $F(ab')_2$). Các kháng thể được chế tạo với hai, ba, hoặc nhiều hơn (ví dụ bốn) vị trí gắn kết kháng nguyên hoạt động cũng được dự định (xem, ví dụ, US 2002/0004587 A1 của Miller *et al.*). Các kháng thể đa đặc hiệu có thể được điều chế như các kháng thể có độ dài đầy đủ hoặc như các mảnh kháng thể.

Các kháng thể trong bản mô tả này bao gồm "các biến thể trình tự axit amin" với hoạt tính gắn kết kháng nguyên hoặc sinh học đã được làm thay đổi. Ví dụ về các thay đổi axit amin này bao gồm các kháng thể có ái lực tăng cường với kháng nguyên (ví dụ, các kháng thể "được làm trưởng thành ái lực"), và các kháng thể với vùng Fc biến đổi, nếu có, ví dụ, có độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (gia tăng hoặc giảm đi) (ADCC) và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) (xem, ví dụ, WO 00/42072 của Presta, L. và WO 99/51642 của Iduosogie et al.); và/hoặc thời gian bán thải huyết thanh gia tăng hoặc giảm đi (xem, ví dụ, WO00/42072, Presta, L.).

"Biến thể được cải biến ái lực" có một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến đổi hoặc vùng khung của kháng thể gốc được thay thế (ví dụ, kháng thể khảm gốc, kháng thể được nhân tính hóa, hoặc kháng thể của người) làm thay đổi (gia tăng hoặc giảm thiểu) ái lực. Cách thuận tiện để tạo ra các biến thể thay thế này là sử dụng sự biểu hiện thực khuẩn thể. Vắn tắt là, một vài vị trí vùng siêu biến đổi (ví dụ, các vị trí 6-7) được gây đột biến để tạo ra tất cả các thay thế axit amin có thể có ở mỗi vị trí. Các kháng thể

biến thể này được tạo ra bằng cách này được bộc lộ theo phương thức hoá trị một từ các hạt thực khuẩn thể dạng sợi như các thể dung hợp với sản phẩm của gen III của M13 được bao gói trong mỗi hạt này. Các biến thể được biểu hiện thực khuẩn thể sau đó được sàng lọc hoạt tính sinh học (ví dụ, ái lực gắn kết). Để xác định các vị trí vùng siêu biến đổi ứng cử để cải biến, có thể tiến hành gây đột biến quét alanin để nhận biết các gốc vùng siêu biến đổi góp phần đáng kể vào khả năng gắn kết kháng nguyên. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể có lợi nếu phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để xác đinh các điểm tiếp xúc giữa kháng thể này và đích của nó. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận là các gốc ứng cử để thay thế theo các kỹ thuật nêu trong bản mô tả này. Khi các biến thể này được tạo ra, một nhóm các biến thể được sàng lọc và các kháng thể có ái lực đã thay đổi có thể được chọn lọc để phát triển tiếp.

"Kháng thể biến thể nhạy độ pH" là biến thể kháng thể có ái lực gắn kết khi gắn kết kháng nguyên đích ở độ pH ban đầu khác với khi gắn kết kháng nguyên đích ở độ pH khác. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, là kháng thể kháng TfR theo sáng chế có thể được chọn lọc hoặc chế tạo để có khả năng gắn kết với TfR nhạy độ pH sao cho kháng thể này gắn kết với ái lực thấp mong muốn (như mô tả trong bản mô tả này) với TfR bề mặt tế bào trong huyết tương ở độ pH là 7,4, nhưng khi nhập nội vào khoang nội bào, nhanh chóng phân ly khỏi TfR ở độ pH tương đối thấp (pH 5,5-6,0); sự phân ly này có thể bảo vệ kháng thể này không bị thanh thải qua trung gian kháng nguyên, và gia tăng lượng kháng thể được vận chuyển đến CNS hoặc được tái sử dụng lại đi qua BBB – trong cả hai trường hợp, nồng độ hữu hiệu của kháng thể tăng lên so với kháng thể kháng TfR không có tính nhạy độ pH này (xem, ví dụ, J. Biol. Chem. 287(14): 11090-11097 của Chaparro-Riggers et al.; Nature Biotechnol. 28(11): 1203-1208 của Igawa et al.). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định tổ hợp các ái lực mong muốn ở pH của huyết thanh và pH khoang nội bào với TfR và hợp chất được tiếp hợp.

Kháng thể trong bản mô tả này có thể được tiếp hợp với "phân tử khác loại" ví dụ để gia tăng thời gian bán thải hoặc độ ổn định hoặc theo cách khác cải thiện kháng thể này. Ví dụ, kháng thể này có thể được liên kết với một trong số nhiều loại polyme không phải protein, ví dụ, polyetylen glycol (PEG), polypropylen glycol, polyoxyalkylen, hoặc các đồng polyme polyetylen glycol và polypropylen glycol. Các

mảnh kháng thể, như Fab', được liên kết với một hoặc nhiều phân tử PEG là một phương án ví dụ của sáng chế. Theo một ví dụ khác, phân tử khác loại là hợp chất trị liệu hoặc chất hiện hình (có nghĩa là, chất đánh dấu có thể phát hiện được), và kháng thể này được sử dụng để vận chuyển phân tử khác loại này đi qua BBB. Các ví dụ về các phân tử khác loại bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hoá chất, peptit, polyme, lipit, axit nucleic, và protein.

Kháng thể trong bản mô tả này có thể là "biến thể glycosyl hoá" sao cho hyđrat cacbon bất kỳ gắn với vùng Fc, nếu có, được biến đổi, cải biến có/không có, hoặc được cải biến về loại kháng thể. Ví dụ, các kháng thể với cấu trúc hyđrat cacbon trưởng thành không có fucoza gắn với vùng Fc của kháng thể là được mô tả trong US 2003/0157108 (Presta, L.). Cũng xem US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các kháng thể với N-axetylglucosamin phân cắt (GlcNAc) trong hyđrat cacbon gắn với vùng Fc của kháng thể được đề cập trong: WO 2003/011878, của Jean-Mairet *et al.* và bằng sáng chế Mỹ số 6,602,684, của Umana *et al.*. Các kháng thể với ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit gắn với vùng Fc của kháng thể được đề cập trong WO 1997/30087, của Patel *et al.*. Cũng xem, WO 1998/58964 (Raju, S.) và WO 1999/22764 (Raju, S.) đều cập đến các kháng thể với hyđrat cacbon được biến đổi gắn với vùng Fc của nó. Cũng xem US 2005/0123546 (Umana *et al.*) mô tả các kháng thể với glycosyl hoá được cải biến. Đột biến trình tự glycosyl hoá đồng thuận trong vùng Fc (Asn-X-Ser/Thr ở các vị trí 297-299, trong đó X không thể là prolin), ví dụ, bằng cách gây đột biến Asn của trình tự này thành axit amin khác bất kỳ, bằng cách cho Pro vào vị trí 298, hoặc bằng cách cải biến vị trí 299 thành axit amin bất kỳ không phải là Ser hoặc Thr sẽ loại bỏ sự glycosyl hoá ở vị trí đó (xem, ví dụ, Clin. Cancer Res. (2007) 13:5519s-5527s của Fares Al-Ejeh et al.; Biochemistry (1991) 30(18): 4374-4380 của Imperiali và Shannon; Biochem J. (1997) 323(Pt 2): 415-419 của Katsuri; J. Biol. Chem. (1996) 271: 6363-6366 của Shakin-Eshleman et al.,).

Thuật ngữ "vùng siêu biến đổi" hoặc "HVR" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ từng vùng miền siêu biến đổi về trình tự của kháng thể ("các vùng quyết định bổ thể" hoặc "các CDR") và/hoặc tạo thành quai xác định cấu trúc ("các quai siêu biến đổi") và/hoặc có chứa gốc tiếp xúc kháng nguyên ("tiếp xúc kháng nguyên"). Nói chung, các kháng thể bao gồm 6 HVR: 3 trong VH (H1, H2, H3), và 3 trong VL (L1, L2, L3). Các HVR ví dụ trong bản mô tả này bao gồm:

(a) các quai siêu biến đổi ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) của Chothia và Lesk);

(b) các CDR ở các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) các gốc tiếp xúc kháng nguyên ở các gốc axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), và 93-101 (H3) (*J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996) của MacCallum et al.); và

(d) tổ hợp các gốc của mục (a), (b), và/hoặc (c), kể cả các gốc axit amin HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), và 94-102 (H3).

Theo một phương án, các gốc HVR bao gồm các gốc được xác định trong Fig.3A-Fig.3D hoặc Fig.4A-Fig.4D, Bảng 4 hoặc Bảng 5 hoặc ở phần khác trong bản mô tả này.

Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) được đánh số theo Kabat et al., nêu trên.

Các gốc "khung" hoặc "FR" là các gốc miền biến đổi không phải là các gốc vùng siêu biến đổi như được xác định trong bản mô tả này. FR của miền biến đổi nói chung gồm có 4 miền FR: FR1, FR2, FR3 và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR nói chung xuất hiện theo thứ tự sau đây trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc FR có thể được cải biến để điều chỉnh độ ổn định của kháng thể hoặc để điều chỉnh vị trí theo không gian ba chiều của một hoặc nhiều HVR của kháng thể để, ví dụ, tăng cường khả năng gắn kết.

"Kháng thể có độ dài đầy đủ" là kháng thể bao gồm một vùng biến đổi gắn kết kháng nguyên cũng như các miền cố định chuỗi nhẹ (CL) và miền cố định chuỗi nặng, CH1, CH2 và CH3. Các miền cố định có thể là các miền cố định trình tự nguyên thuỷ

(ví dụ các miền cố định trình tự nguyên thuỷ) hoặc các biến thể trình tự axit amin của chúng.

Các thuật ngữ "kháng thể có độ dài đầy đủ," "kháng thể nguyên vẹn," và "kháng thể toàn vẹn" được sử dụng thay thế nhau trong bản mô tả này để chỉ kháng thể có cấu trúc cơ bản tương tự với cấu trúc kháng thể nguyên vẹn hoặc có các chuỗi nặng có chứa vùng Fc như được xác định trong bản mô tả này.

"Kháng thể trần" chỉ kháng thể không được tiếp hợp với phần tử khác loại (ví dụ, phần tử độc tính tế bào hoặc chất đánh dấu phóng xạ). Kháng thể trần có thể ở trong dược phẩm.

"Các kháng thể nguyên thuỷ" chỉ các phân tử globulin miễn dịch xuất hiện trong tự nhiên với các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, các kháng thể IgG nguyên thuỷ là các glycoprotein dị tetrame khoảng 150000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau được liên kết bằng liên kết đisulfua. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, tiếp đó là 3 miền ổn định (CH1, CH2 và CH3). Tương tự, từ đầu tận cùng-N đến đầu cận cùng-C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn gọi là miền nhẹ thay đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp đó là miền nhẹ ổn định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể thuộc một trong hai loại, gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin miền cố định của nó.

"Chức năng hiệu ứng" của kháng thể chỉ các hoạt tính sinh học của kháng thể dẫn đến sự hoạt hoá hệ miễn dịch khác với sự hoạt hoá con đường bổ thể. Các hoạt tính này phần lớn xác định được trong vùng Fc (vùng Fc trình tự nguyên thuỷ hoặc vùng Fc biến thể trình tự axit amin) của một kháng thể. Các ví dụ về các chức năng hiệu ứng kháng thể bao gồm, ví dụ, sự gắn kết thụ thể Fc và độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Theo một phương án, kháng thể trong bản mô tả này gần như không có chức năng hiệu ứng. Theo một phương án khác, kháng thể này trong bản mô tả này giữ lại chức năng hiệu ứng tối thiểu. Các phương pháp để cải biến hoặc loại bỏ chức năng hiệu ứng là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, loại bỏ toàn bộ hoặc một phần vùng Fc chịu trách nhiệm về chức năng hiệu ứng (có nghĩa là, bằng cách sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo kiểu không có toàn bộ hoặc một phần vùng Fc như, không chỉ giới hạn ở, mảnh Fab, kháng thể đơn chuỗi, và kháng thể

tương tự như mô tả trong bản mô tả này và đã biết trong lĩnh vực này; cải biến vùng Fc ở một hoặc nhiều vị trí axit amin để loại bỏ chức năng hiệu ứng (ảnh hưởng đến khả năng gắn kết Fc: các vị trí 238, 239, 248, 249, 252, 254, 256, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 311, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 436, 437, 438, và 439; và cải biến mức glycosyl hoá của kháng thể (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc sản xuất kháng thể này trong môi trường không cho phép quá trình glycosyl hoá kiểu dại của động vật có vú, loại bỏ một hoặc nhiều nhóm hyđrat cacbon từ kháng thể đã glycosyl hoá, và cải biến kháng thể này ở một hoặc nhiều vị trí axit amin để loại bỏ khả năng được glycosyl hoá của kháng thể ở các vị trí đó (bao gồm, nhưng không giới hạn ở N297G và N297A và D265A).

Các chức năng "hoạt hoá bổ thể" của kháng thể, hoặc các tính chất của kháng thể tạo điều kiện hoặc khơi mào "hoạt hoá con đường bổ thể" được sử dụng thay thế lẫn nhau, và chỉ các hoạt tính sinh học của kháng thể tham gia hoặc kích thích con đường bổ thể của hệ miễn dịch ở một đối tượng. Các hoạt tính này bao gồm, ví dụ, sự gắn kết C1q và độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và có thể qua trung gian cả phần Fc và phần không phải Fc của kháng thể. Các phương pháp cải biến hoặc loại bỏ chức năng hoạt hoá bổ thể là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, loại bỏ toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc có vai trò hoạt hoá bổ thể (có nghĩa là, bằng cách sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo kiểu không có toàn bộ hoặc một phần vùng Fc như, không chỉ giới hạn ở, mảnh Fab, kháng thể đơn chuỗi, và kháng thể tương tự như mô tả trong bản mô tả này và đã biết trong lĩnh vực này, hoặc cải biến vùng Fc ở một hoặc nhiều vị trí axit amin để loại bỏ hoặc giảm bớt các tương tác với cấu phần bổ thể hoặc khả năng hoạt hoá các cấu phần bổ thể, như các vị trí 270, 322, 329 và 321, đã biết là tham gia vào sự gắn kết C1q), và cải biến hoặc loại bỏ một phần vùng không phải Fc có vai trò hoạt hoá bổ thể (có nghĩa là, cải biến vùng CH1 ở vị trí 132 (xem, ví dụ, J. Biol. Chem. 276(41): 38217-38223), (2001) của Vidarte et al.).

Tuỳ thuộc vào trình tự axit amin của miền cố định của các chuỗi nặng của chúng, các kháng thể có độ dài đầy đủ có thể được phân vào "các lớp khác nhau". Có 5 lớp chính các kháng thể có độ dài đầy đủ: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp này có thể chia tiếp vào "các phân lớp" (các lớp kháng thể), ví dụ, IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, và IgA2. Các miền cố định chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của các kháng

thể tương ứng được gọi là alpha, delta, epsilon, gamma, và mu. Các cấu trúc dưới phân tử và cấu hình ba chiều của các lớp globulin miễn dịch khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ kháng thể (ví dụ, kháng thể khảm, kháng thể được nhân tính hóa, hoặc kháng thể của người hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng) được biểu hiện bởi tế bào vật chủ tái tổ hợp bao gồm axit nucleic mã hoá kháng thể này.

Các thuật ngữ "tế bào vật chủ," "dòng tế bào vật chủ," và "dịch nuôi cấy tế bào vật chủ" được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, kể cả thế hệ tế bào con cháu của các tế bào này. Các tế bào vật chủ bao gồm "thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp," bao gồm các tế bào được biến nạp cấp một và thế hệ tế bào con cháu thu được từ các tế bào này bất kể số lần cấy chuyển. Thế hệ tế bào con cháu có thể không hoàn toàn có hàm lượng nucleic giống hệt tế bào gốc, nhưng có thể có chứa các đột biến. Thế hệ tế bào con cháu đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm trong bản mô tả này. Các ví dụ về "các tế bào vật chủ" để sản xuất các kháng thể tái tổ hợp bao gồm: (1) các tế bào động vật có vú, ví dụ, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO), các tế bào dòng tế bào tương tự nguyên bào sợi (COS), các tế bào tuỷ (kể cả các tế bào Y0 và NS0), các tế bào thận chuột đồng con (BHK), các tế bào Hela và Vero; (2) các tế bào côn trùng, ví dụ, sf9, sf21 và Tn5; (3) các tế bào thực vật, ví dụ thực vật thuộc giống *Nicotiana* (ví dụ, *Nicotiana tabacum*); (4) các tế bào nấm men, ví dụ, các tế bào thuộc chủng *Saccharomyces* (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*) hoặc chủng *Aspergillus* (ví dụ, *Aspergillus niger*); (5) các tế bào vi khuẩn, ví dụ, các tế bào *Escherichia coli* hoặc các tế bào *Bacillus subtilis*, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc hiệu với" được dùng để chỉ kháng thể gắn kết chọn lọc hoặc ưu tiên với kháng nguyên. Ái lực gắn kết nói chung được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm tiêu chuẩn, như phân tích Scatchard, hoặc kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, sử dụng BIACORE®).

"Kháng thể gắn kết với cùng epitop" như kháng thể tham chiếu được dùng để chỉ kháng thể phong bế sự gắn kết của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên của nó

trong thử nghiệm cạnh tranh ở mức 50% hoặc cao hơn, và ngược lại, kháng thể tham chiếu phong bế sự gắn kết của kháng thể với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh ở mức 50% hoặc cao hơn. Theo một phương án, kháng thể kháng BACE1 tạo ra một trong số các kháng thể lưỡng đặc hiệu hoặc các kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế gắn kết với epitop BACE1 mà được gắn kết bởi YW412.8.31. Thử nghiệm cạnh tranh được lấy làm ví dụ được đề cập trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá huỷ tế bào. Chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đồng vị phóng xạ (ví dụ, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu); chất hoá trị liệu hoặc thuốc (ví dụ, methotrexat, adriamicin, alkaloit dừa cạn (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomyxin C, clorambuxil, daunorubixin hoặc các chất xen vào giữa khác); các chất ức chế tăng trưởng; các enzym và các mảnh của chúng như các enzym phân giải axit nucleic; các kháng sinh; các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, kể cả các mảnh và/hoặc biến thể của chúng; và nhiều chất chống khối u hoặc chống bệnh ung thư được đề cập trong bản mô tả này.

"Lượng hữu hiệu" của chất, ví dụ, dược phẩm, được dùng để chỉ lượng hữu hiệu, ở mức liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được hiệu quả điều trị bệnh hoặc phòng bệnh mong muốn.

Thuật ngữ "vùng Fc" trong bản mô tả này được dùng để chỉ vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, có chứa ít nhất một phần vùng cố định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự nguyên thuỷ và các vùng Fc biến thể. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận cùng C (Lys447) của vùng Fc có thể không có. Trừ khi có quy định khác, cách đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng cố định là theo hệ đánh số của Châu Âu, còn được gọi là chỉ số EU, như được Kabat et al. mô tả trong: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Thuật ngữ "thụ thể FcRn" hoặc "FcRn" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ thụ thể Fc ("n" chỉ thụ thể mới sinh) đã biết là tham gia vào việc vận chuyển các IgG của mẹ cho thai nhi qua nhau thai của người hoặc động vật linh trưởng, hoặc túi noãn hoàng (thỏ) và cho thai nhi từ sữa non qua ruột non. Cũng đã biết là FcRn tham gia vào việc duy trì nồng độ IgG trong huyết thanh hằng định bằng cách gắn kết các phân tử IgG và tái chế chúng vào huyết thanh. "Vùng gắn kết FcRn" hoặc "vùng gắn kết thụ thể FcRn" được dùng để chỉ phần kháng thể tương tác với thụ thể FcRn. Một vài cải biến nhất định trong vùng gắn kết của kháng thể gia tăng ái lực của kháng thể hoặc mảnh của nó, đối với FcRn, và cũng gia tăng thời gian bán thải in vivo của phân tử này. Các thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vị trí axit amin sau đây: 251 256, 285, 290, 308, 314, 385, 389, 428, 434 và 436 làm tăng sự tương tác của kháng thể với thụ thể FcRn. Thay thế ở các vị trí sau đây cũng làm tăng sự tương tác của kháng thể với thụ thể FcRn 238, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, thay thế trong bằng sáng chế Mỹ số 7371826.

"Thể tiếp hợp miễn dịch" là kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đánh dấu hoặc chất gây độc tế bào. Tuỳ ý, thể tiếp hợp này là qua một liên kết.

"Liên kết" như được sử dụng trong bản mô tả này là cấu trúc liên kết cộng hoá trị hoặc không phải cộng hoá trị kháng thể kháng TfR với phân tử khác loại. Theo các phương án nhất định, liên kết này là peptit. Theo các phương án khác, liên kết này là liên kết hoá học.

"Chất đánh dấu" là chất đánh dấu ngẫu hợp với kháng thể trong bản mô tả này và được sử dụng để phát hiện hoặc chụp hình. Các ví dụ về chất đánh dấu này bao gồm: chất đánh dấu phóng xạ, chất huỳnh quang, chất có màu, hoặc nhãn ái lực. Theo một phương án, chất đánh dấu là chất đánh dấu được sử dụng để chụp hình y học, ví dụ, tc99m hoặc I123, hoặc chất đánh dấu spin để chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn gọi là chụp cộng hưởng từ, mri), như iôt-123, iôt -131, iôt -111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan, sắt, v.v..

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vật nuôi (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), các động vật

linh trưởng (ví dụ, người và các động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo các phương án nhất định, các thể hoặc đối tượng là con người.

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể được tách khỏi các thành phần môi trường tự nhiên của nó. Theo một vài phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết > 95% hoặc 99% như được xác định bởi, ví dụ, các phương pháp điện di (ví dụ, SDS-PAGE, tâm đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo). Xem tổng kết các phương pháp để đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, ví dụ, trong: *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007) của Flatman et al.,.

"Axit nucleic được phân lập" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic đã được tách khỏi thành phần môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic trong các tế bào thông thường có chứa phân tử axit nucleic, nhưng phân tử axit nucleic có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí trên nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

"Axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể kháng TfR" được dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hoá các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc mảnh của chúng), bao gồm các phân tử axit nucleic trong vectơ đơn nhất hoặc các vectơ tách biệt, và các phân tử axit nucleic này có ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào vật chủ.

"Tờ hướng dẫn sử dụng" là các hướng dẫn sử dụng thường đi kèm trong bao gói thương phẩm của các sản phẩm trị liệu, có chứa các thông tin về chỉ định, cách dùng, liều dùng, đường dùng, liệu pháp kết hợp, chống chị định, và/hoặc cảnh báo về việc sử dụng sản phẩm trị liệu này.

"Tỷ lệ phần trăm (%) tương đồng trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit tham chiếu là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự thử nghiệm mà giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp xếp thẳng hàng các trình tự và đưa vào các khe trống, nếu cần, để thu được tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự tối đa, và không coi các thay thế bảo toàn là một phần của sự tương đồng trình tự. Sắp xếp thẳng hàng để xác định tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự axit amin có thể thực hiện theo nhiều cách trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính sẵn có như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign

(DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định các tham số thích hợp để sắp xếp thẳng hàng các trình tự, bao gồm thuật toán cần thiết để có sự thẳng mạch tối đa trên toàn bộ chiều dài đầy đủ của các trình tự sẽ so sánh. Tuy nhiên, trong bản mô tả này, các giá trị % tương đồng trình tự axit amin được tạo ra có sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 là của Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp đơn tại Cục Bản Quyền của Mỹ, Washington D.C., 20559, số đăng ký U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể có được từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể biên soạn từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 phải được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các tham số so sánh trình tự là chương trình ALIGN-2 cài đặt và không thay đổi.

Trong các trường hợp khi sử dụng ALIGN-2 để so sánh trình tự axit amin, % tương đồng trình tự axit amin của một trình tự axit amin A đã cho với trình tự axit amin B (nói cách khác, trình tự axit amin A có % tương đồng trình tự axit amin với trình tự axit amin B) được tính như sau:

$$100 \times X/Y$$

trong đó X là số lượng các gốc axit amin được ghi điểm là cặp giống nhau theo chương trình sắp thẳng mạch trình tự ALIGN-2 khi sắp thẳng mạch A và B, và trong đó Y là tổng số các gốc axit amin của B. Nên hiểu là độ dài trình tự axit amin A không tương đương với độ dài trình tự axit amin B, % tương đồng trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % tương đồng trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có đề cập cụ thể khác, tất cả các giá trị % tương đồng trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả này như được mô tả ở đoạn trên đây sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "dược phẩm" được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng cho phép chứa trong đó hoạt tính sinh học của một thành phần hoạt tính để có hiệu quả, và không có chứa các thành phần bổ sung khác gây độc không chấp nhận được đối với đối tượng cho dùng chế phẩm này.

Thuật ngữ “chất mang dược dụng” được dùng để chỉ một thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, không độc đối với đối tượng. Chất

mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "điều trị" (và các biến thể ngữ pháp của nó) được dùng để chỉ sự can thiệp trên lâm sàng với nỗ lực làm thay đổi tiến trình tự nhiên của bệnh ở một cá thể đang được điều trị, và có thể được tiến hành để phòng ngừa hoặc trong tiến trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng mong muốn của việc điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, giảm nhẹ triệu chứng, giảm thiểu các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp của bệnh này, ngăn ngừa di căn, giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện, hoặc giảm nhẹ trạng thái bệnh, và sự thuyên giảm hoặc tiên lượng bệnh được cải thiện. Theo một vài phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để làm chậm sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm tiến triển xấu của bệnh.

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" được dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà tham gia vào quá trình gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (tương ứng là VH và VL) của một kháng thể nói chung là có cấu trúc tương tự nhau, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung bảo toàn (các FR) và ba vùng siêu biến đổi (các HVR). (Xem, ví dụ, Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman và Co., trang 91 (2007) của Kindt et al..) Miền VH hoặc VL đơn nhất có thể là đủ để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Ngoài ra, các kháng thể gắn kết một kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ một kháng thể gắn kết kháng nguyên để sàng lọc thư viện các miền VL hoặc VH bổ trợ tương ứng. Ví dụ, xem tài liệu: *J. Immunol.* 150:880-887 (1993) của Portolano et al.; *Nature* 352:624-628 (1991), của Clarkson et al..

Thuật ngữ "vectơ" như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân truyền một axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Thuật ngữ này bao gồm vectơ như là một cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như là vectơ được hợp nhất vào bộ gen của tế bào vật chủ mà nó được đưa vào. Các vectơ nhất định có khả năng điều khiển việc biểu hiện các axit nucleic mà được chúng liên kết với theo cách có điều khiển. Các plasmit này được gọi là "các plasmit biểu hiện."

2. Chế phẩm và phương pháp

A. Sản xuất các kháng thể kháng TfR và các dạng tiếp hợp của chúng

Theo một khía cạnh, sáng chế một phần dựa vào các kháng thể kháng TfR có thể được sử dụng để vận chuyển các phân tử mong muốn đi qua BBB. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết với TfR của người. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết với cả TfR của người và TfR của động vật linh trưởng. Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị các bệnh ảnh hưởng đến não và/hoặc CNS.

Các kháng thể kháng TfR được lấy làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết với TfR được phân lập. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng TfR theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với cả TfR của người và TfR của động vật linh trưởng. Theo các phương án này, kháng thể kháng TfR theo sáng chế không ức chế sự gắn kết của transferrin với TfR. Theo các phương án này, kháng thể kháng TfR theo sáng chế gắn kết với miền đỉnh của TfR. Theo phương án khác, kháng thể kháng TfR theo sáng chế gắn kết với miền không phải đỉnh của TfR. Theo các khía cạnh nhất định, các kháng thể kháng TfR có thể được sử dụng để vận chuyển một hoặc nhiều hợp chất chụp chiếu được tiếp hợp hoặc hợp chất trị liệu đi qua BBB.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:33; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:29; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:31. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 7A4, như được thể hiện trên Fig.3A và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:38; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:39; (d) HVR-L1 bao

gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:35; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:36. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 8A2, như được thể hiện trên Fig.3A và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:35; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:36. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 15D2, như được thể hiện trên Fig.3A và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:37; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:43; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:44; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:41; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:42. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 10D11, như được thể hiện trên Fig.3A và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:33; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:29; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:31. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 7B10, như được thể hiện trên Fig.3A và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:54; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:55; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:50; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:51; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 15G11, như được thể hiện trên Fig.3B và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVRs được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:58; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:59; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:56; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:57; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 16G5, như được thể hiện trên Fig.3B và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVRs được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:63; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:55; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:60; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:61; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:62. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 13C3, như được thể hiện trên Fig.3B và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:65; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:55; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:60; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin

của SEQ ID NO:64; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:52. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 16G4, như được thể hiện trên Fig.3B và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:74; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:75; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:76; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:71; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:72; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:73. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 16F6, như được thể hiện trên Fig.3C và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:80; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:81; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:82; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:77; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:78; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:79. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 7G7, như được thể hiện trên Fig.3D và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:80; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:83; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:84; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:77; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:78; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:79. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 4C2, như được thể hiện trên Fig.3D và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:88; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:89; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:90; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:85; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:86; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:87. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 1B12, như được thể hiện trên Fig.3D và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:95; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:96; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:91; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:92; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:93. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 13D4, như được thể hiện trên Fig.3D và Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:32; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:33; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:34; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:29; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:127. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này là dòng 7A4.v15, như được thể hiện trên Fig.4B và Bảng 4.

Các dòng nêu trên thuộc bốn nhóm bổ trợ, có sự tương tự trình tự với các HVR. Như được thể hiện trong Bảng 3, các trình tự đồng thuận dễ dàng thu được từ trình tự kháng thể đối với mỗi HVR. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các HVR đồng thuận của kháng thể lớp I như sau:

HVR-L1: Arg-Ala-Ser-Glu-Ser-Val-Asp-[Ser hoặc Asp]-Tyr-Gly-[Asn hoặc Pro]-Ser-Phe-Met-His (SEQ ID NO:45);

HVR-L2: Arg-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser (SEQ ID NO:30);

HVR-L3: Gln-[Gln hoặc His]-Ser-Asn-Glu-[Ala, Gly hoặc Asp]-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:46);

HVR-H1: Asp-Tyr-[Ala hoặc Gly]-Met-His (SEQ ID NO:47);

HVR-H2: [Gly hoặc Val]-Ile-Ser-[Thr, Phe hoặc Pro]-Tyr-[Phe hoặc Ser]-Gly-[Arg hoặc Lys]-Thr-Asn-Tyr-[Asn hoặc Ser]-Gln-[Lys hoặc Asn]-Phe-[Lys hoặc Met]-Gly (SEQ ID NO:48);

HVR-H3: Gly-Leu-Ser-Gly-Asn-[Tyr hoặc Phe]-Val-[Met hoặc Val]-Asp-[Tyr hoặc Phe] (SEQ ID NO:49). (xem Bảng 4). Các trình tự đồng thuận đối với lớp II và IV cùng được đề cập trong Bảng 3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:47; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:48; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:49; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:45; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:46. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:53; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:69; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:70; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:66; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:67; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:68. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:100; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:101; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:102; (d) HVR-L1

bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:97; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:98; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:99. Theo một khía cạnh, kháng thể này bao gồm tất cả sáu trình tự HVR nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR VH của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một phương án, kháng thể này bao gồm trình tự HVR-H3 của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một phương án khác, kháng thể này bao gồm các trình tự HVR-H3 và HVR-L3 của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một phương án khác, kháng thể này bao gồm các trình tự HVR-H3, HVR-L3 và HVR-H2 của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một phương án khác, kháng thể này bao gồm các trình tự HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR VL của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một phương án, kháng thể này bao gồm các trình tự HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3 của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế bao gồm (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR VH được chọn từ các trình tự HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3 của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR VL được chọn từ các trình tự HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3 của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên.

Theo phương án bất kỳ nêu trên, kháng thể kháng TfR được nhân tính hóa. Theo một phương án, kháng thể kháng TfR bao gồm các HVR theo phương án bất kỳ nêu trên, và còn bao gồm khung tiếp nhận của người, ví dụ, khung globulin miễn dịch của người hoặc khung đồng thuận của người. Theo một phương án khác, kháng thể kháng TfR bao gồm các HVR theo phương án bất kỳ nêu trên, và còn bao gồm VH hoặc VL bao gồm một hoặc nhiều thay thế axit amin ở một hoặc nhiều vùng FR. Theo Ví dụ 2 trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã tiến hành quét alanin trên một số các kháng thể nhất định được chọn từ các kháng thể nêu trên, và xác định được là thu được khả năng gắn kết tương tự hoặc được cải thiện mặc dù có các cải biến axit amin ở các vị trí FR đã chọn. Như thể hiện trong Fig.6-1 và Fig.6-2 và Ví dụ 2 trong bản mô

tả này, đối với các nhóm kháng thể lớp I-III, các dạng biến thể của kháng thể với các cải biến ở một hoặc nhiều gốc của FR vẫn giữ được ái lực và tính đặc hiệu gắn kết. Ví dụ, đối với kháng thể 15G11, các vị trí 43 và 48 trong chuỗi nhẹ FR2, vị trí 48 trong FR2 chuỗi nặng và các vị trí 67, 69, 71 và 73 trong FR3 chuỗi nặng có thể được cải biến như được thể hiện trên Fig.6-1 và Fig.6-2 và kháng thể thu được vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực gắn kết mạnh đối với TfR của người/động vật linh trưởng. Trong một ví dụ khác, đối với kháng thể 7A4, các vị trí 58 và 68 của FR3 chuỗi nhẹ, vị trí 24 trong FR1 chuỗi nặng và vị trí 71 trong FR3 chuỗi nặng có thể được cải biến như thể hiện trong Fig.6-1 và Fig.6-2 và kháng thể thu được vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực gắn kết mạnh đối với TfR của người/động vật linh trưởng. Trong ví dụ thứ ba, đối với kháng thể 16F6, các vị trí 43 và 44 của FR2 chuỗi nhẹ và các vị trí 71 và 78 của FR3 chuỗi nặng có thể được cải biến như thể hiện trên Fig.6-1 và Fig.6-2 và kháng thể thu được vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực gắn kết mạnh đối với TfR của người/động vật linh trưởng. Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng TfR bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có mức tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:7-10, 15-18, 20, 25-28, 108, 114, 120 và 126. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có mức tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% có chứa các thay thế (ví dụ, các thay thế bảo toàn), các cài xen, hoặc các khuyết đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng TfR bao gồm trình tự này vẫn giữ được khả năng gắn kết với TfR. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thay thế, được cài xen và/hoặc được khuyết đoạn trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:7-10, 15-18, 20, 25-28, 108, 114, 120 và 126. Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen, hoặc khuyết đoạn ở các vùng nằm ngoài các HVR (có nghĩa là, trong các FR). Tuỳ ý là, kháng thể kháng TfR bao gồm trình tự VH có trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:7-10, 15-18, 20 25-28, 108, 114, 120 và 126, kể cả các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo một phương án cụ thể, VH đối với một kháng thể cụ thể bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: các HVR nêu trên và trong Bảng 3 hoặc Bảng 4 đối với kháng thể cụ thể đó. Các trình tự VH đối với các kháng thể theo sáng chế được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4 của bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR, trong đó kháng thể này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có mức tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO:4-6, 11-14, 19, 21-24, 105, 111, 117, và 123. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có mức tương đồng trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% có chứa các thay thế (ví dụ, các thay thế bảo toàn), các cài xen, hoặc khuyết đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng TfR bao gồm trình tự vẫn giữ được khả năng gắn kết với TfR. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thay thế, được cài xen và/hoặc được khuyết đoạn trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự của SEQ ID NO:4-6, 11-14, 19, 21-24, 105, 111, 117, và 123. Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen, hoặc khuyết đoạn ở vùng nằm ngoài các HVR (có nghĩa là, trong các FR). Tuỳ ý, kháng thể kháng TfR bao gồm trình tự VL trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự của SEQ ID NO:4-6, 11-14, 19, 21-24, 105, 111, 117, và 123, kể cả các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo một phương án cụ thể, VL bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ các HVR nêu trên và trong Bảng 4 hoặc Bảng 5 đối với kháng thể cụ thể đó. Các trình tự VL đối với các kháng thể theo sáng chế được thể hiện trên Fig.3 và Fig.4 của bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR, trong đó kháng thể này bao gồm VH theo phương án bất kỳ nêu trên, và VL theo phương án bất kỳ nêu trên. Theo một phương án, kháng thể này bao gồm các trình tự VL và VH, tương ứng trong các trình tự của SEQ ID NO:4 và 7; 5 và 8; 5 và 9; 6 và 10; 4 và 7; 11 và 15; 12 và 16; 13 và 17; 14 và 18; 19 và 20; 21 và 25; 22 và 26; 23 và 27; 24 và 28; 105 và 108; 111 và 114; 117 và 120; và 123 và 126, kể cả các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với cùng một epitop như kháng thể kháng TfR được đề cập trong bản mô tả này. Ví dụ, theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với cùng một epitop như kháng thể kháng TfR bao gồm các trình tự VL và VH tương ứng của các trình tự SEQ ID NO:4 và 7; 5 và 8; 5 và 9; 6 và 10; 4 và 7; 11 và 15; 12 và 16; 13 và 17; 14 và 18; 19 và 20; 21 và 25; 22 và 26; 23 và 27; 24 và 28; 105 và 108; 111 và 114; 117 và 120; hoặc 123 và 126. Theo một khía cạnh, kháng thể này cạnh tranh với kháng thể bất kỳ

trong số các kháng thể trong lớp I (nghĩa là, các dòng 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, hoặc 7B10, hoặc các phiên bản được làm trưởng thành ái lực của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đó) về sự gắn kết với TfR. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này cạnh tranh với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trong lớp II (nghĩa là, các dòng 15G11, 16G5, 13C3 hoặc 16G, hoặc các phiên bản được làm trưởng thành ái lực của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đó) về sự gắn kết với TfR. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này cạnh tranh với dòng 16F6 hoặc các phiên bản được làm trưởng thành ái lực của nó về sự gắn kết với TfR. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này cạnh tranh với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trong lớp IV (nghĩa là, các dòng 7G7, 4C2, 1B12 hoặc 13D4, hoặc phiên bản được làm trưởng thành ái lực của nó) về sự gắn kết với TfR.

Theo một khía cạnh khác nữa của sáng chế, kháng thể kháng TfR theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể khảm, được nhân tính hóa hoặc kháng thể của người. Theo một phương án, kháng thể kháng TfR là mảnh kháng thể, ví dụ, Fv, Fab, Fab', scFv, kháng thể thể đôi, hoặc mảnh $F(ab')_2$. Theo một phương án khác, kháng thể này là kháng thể có độ dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 nguyên vẹn hoặc lớp kháng thể khác như được xác định trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng TfR theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể hợp nhất dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu, theo cách đơn độc hoặc kết hợp, như được mô tả trong các Mục 1-7 dưới đây:

a) Ái lực kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này có hằng số phân ly (Kd) là $\leq$ 1μM, $\leq$ 100nM, $\leq$ 10nM, $\leq$ 1nM, $\leq$ 0,1nM, $\leq$ 0,01nM, hoặc $\leq$ 0,001nM (ví dụ, 10^{-8}M hoặc ít hơn, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10^{-8}M đến 10^{-13}M, ví dụ, từ 10^{-9}M đến 10^{-13}M).

Theo các khía cạnh nhất định của sáng chế, kháng thể kháng TfR "ái lực thấp" theo sáng chế được chọn lọc dựa trên, ví dụ, các kết quả trong Ví dụ 5 và trong *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011) của Atwal et al., và *Sci. Transl. Med.* 25 May 2011: Vol. 3, Issue 84, p. 84ra44, của Yu et al., thể hiện các kháng thể ái lực thấp này với TfR thể hiện độ hấp thụ CNS (ví dụ, não) và/hoặc tính tồn lưu trong não/CNS được cải

thiện. Để xác định các kháng thể ái lực thấp này, nhiều thử nghiệm xác định ái lực kháng thể là có sẵn, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: thử nghiệm Scatchard và kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, bằng cách sử dụng BIACORE®). Theo một phương án của sáng chế, kháng thể này có ái lực đối với TfR của người hoặc động vật linh trưởng từ khoảng 5nM, hoặc từ khoảng 20nM, hoặc từ khoảng 100nM, đến khoảng 50μM, hoặc đến khoảng 30μM, hoặc đến khoảng 10μM, hoặc đến khoảng 1μM, hoặc đến khoảng 500nM. Do đó, ái lực có thể nằm trong khoảng từ 5nM đến 50μM, hoặc nằm trong khoảng từ 20nM đến 30 μM, hoặc nằm trong khoảng từ 30nM đến 30μM, hoặc nằm trong khoảng từ 50nM đến 1μM, hoặc nằm trong khoảng từ 100nM đến 500nM, ví dụ như được xác định bằng cách phân tích Scatchard hoặc BIACORE®. Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể này có thời gian bán thải phân ly từ TfR < 1 phút, < 2 phút, < 3 phút, < 4 phút, < 5 phút, hoặc < 10 phút đến khoảng 20 phút, hoặc đến khoảng 30 phút, như được xác định bằng cách phân tích gắn kết cạnh tranh hoặc BIACORE®.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể hữu ích để vận chuyển thuốc rối loạn thần kinh qua hàng rào máu-não bao gồm việc chọn lọc kháng thể từ một nhóm các kháng thể kháng TfR có ái lực với TfR nằm trong khoảng từ khoảng 5nM, hoặc từ khoảng 20nM, hoặc từ khoảng 100nM, đến khoảng 50μM, hoặc đến khoảng 30μM, hoặc đến khoảng 10μM, hoặc đến khoảng 1μM, hoặc đến khoảng 500mM. Do đó, ái lực có thể nằm trong khoảng từ 5nM đến 50μM, hoặc nằm trong khoảng từ 20nM đến 30μM, hoặc nằm trong khoảng từ 30nM đến 30μM, hoặc nằm trong khoảng từ 50nM đến 1μM, hoặc nằm trong khoảng từ 100nM đến 500nM, ví dụ như được xác định bằng cách phân tích Scatchard hoặc BIACORE®. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được là, sự tiếp hợp phân tử /hợp chất khác loại với kháng thể thường sẽ làm giảm ái lực của kháng thể với đích của nó do, ví dụ, cản trở về mặt không gian hoặc thậm chí loại bỏ một nhánh gắn kết nếu kháng thể này được chế tạo đa đặc hiệu với một hoặc nhiều nhánh gắn kết với kháng nguyên khác không phải là đích ban đầu của kháng thể này. Theo một phương án, ái lực kháng thể thấp theo sáng chế đặc hiệu đối với TfR được tiếp hợp với kháng BACE1 có Kd đối với TfR như được xác định bằng BIACORE là khoảng 30nM. Theo một phương án khác, kháng thể ái lực thấp theo sáng chế đặc hiệu đối với TfR được tiếp hợp với BACE1 có Kd đối với TfR như được xác định bằng BIACORE là khoảng 600nM.

Theo một phương án khác, kháng thể ái lực thấp theo sáng chế đặc hiệu đối với TfR được tiếp hợp với BACE1 có Kd đối với TfR như được xác định bằng BIACORE là khoảng 20μM. Theo một phương án khác, kháng thể ái lực thấp theo sáng chế đặc hiệu đối với TfR được tiếp hợp với BACE1 có Kd đối với TfR như được xác định bằng BIACORE là khoảng 30μM.

Theo một phương án, Kd được xác định bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên đánh dấu phóng xạ (RIA). Theo một phương án, tiến hành RIA với phiên bản Fab của kháng thể quan tâm và kháng nguyên của nó. Ví dụ, ái lực gắn kết trong dung dịch của các Fab đối với kháng nguyên được xác định bằng cách cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu-(^{125}I) với sự có mặt của một loạt dịch chuẩn độ kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó bắt giữ kháng nguyên đã gắn kết bằng đĩa có phủ kháng thể kháng Fab (xem, ví dụ, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999) của Chen et al.). Để thiết lập điều kiện cho thử nghiệm này, các đĩa nhiều lỗ MICROTITER® (Thermo Scientific) được phủ qua đêm bằng 5μg/ml kháng thể kháng Fab bắt giữ (Cappel Labs) trong dung dịch natri cacbonat 50mM (pH 9,6), và tiếp đó phong bế bằng albumin huyết thanh bò 2% (trọng lượng/thể tích) trong PBS trong khoảng thời gian từ 2 đến 5 giờ ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 23°C). Trong đĩa không hấp phụ (Nunc #269620), 100pM hoặc 26pM [^{125}I] kháng nguyên được trộn với các dịch pha loãng theo dãy của Fab quan tâm (ví dụ, phù hợp với cách đánh giá kháng thể kháng VEGF, Fab-12, của Presta et al. trong: *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Fab quan tâm tiếp đó được ủ qua đêm; tuy nhiên, có thể ủ lâu hơn (ví dụ, khoảng 65 giờ) để đảm bảo đạt đến cân bằng. Sau đó, chuyển hỗn hợp vào đĩa bắt giữ để ủ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, trong 1 giờ). Dung dịch tiếp đó được loại bỏ và rửa đĩa 8 lần bằng polysorbat 20 0,1% (TWEEN-20®) trong PBS. Khi các đĩa đã khô, thêm vào chất phát sáng với lượng 150μl/lỗ (MICROSCINT-20™; Packard), và các đĩa được đếm trên máy đọc gamma TOPCOUNT™ (Packard) trong 1 phút. Các nồng độ của mỗi Fab cho mức gắn kết < hoặc = 20% mức gắn kết tối đa được lựa chọn để sử dụng trong các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh.

Theo một khía cạnh, RIA là phân tích Scatchard. Ví dụ, kháng thể kháng TfR quan tâm có thể được iôt hoá bằng cách sử dụng phương pháp lactoperoxidaza (Bennett và Horuk, *Methods in Enzymology* 288 pg.134-148 (1997)). Kháng thể kháng TfR được đánh dấu phóng xạ được tinh chế từ ^{125}I-Na bằng cách lọc gel bằng cách sử

dụng cột NAP-5 và xác định hoạt tính đặc hiệu của nó. Các hỗn hợp phản ứng cạnh tranh gồm 50µL có chứa nồng độ cố định của kháng thể được iôt hoá và các nồng độ giảm dần của kháng thể không được đánh dấu được pha loãng theo dãy được cho vào các đĩa 96 lỗ. Các tế bào biểu hiện TfR tạm thời được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng, gồm có môi trường eagle được cải biến theo Dulbecco (DMEM) (Genentech) được bổ sung FBS 10%, L-glutamin 2mM và 1 × penixilin-streptomyxin ở nhiệt độ 37°C trong CO_2 5%. Tách các tế bào từ các đĩa bằng cách sử dụng dung dịch phân ly tế bào Sigma và rửa bằng dịch đệm gắn kết (DMEM với albumin huyết thanh bò 1%, HEPES 50mM, pH 7,2, và natri azit 0,2%). Các tế bào đã rửa được thêm vào ở mật độ khoảng 200000 tế bào trong 0,2mL dịch đệm gắn kết vào các đĩa 96 lỗ có chứa 50µL các hỗn hợp phản ứng cạnh tranh. Nồng độ cuối cùng của kháng thể không được đánh dấu trong phản ứng cạnh tranh với các tế bào được thay đổi, bắt đầu từ 1000nM và tiếp đó giảm dần độ pha loãng theo tỷ lệ 1:2 cho 10 nồng độ và kể cả mẫu chỉ có nồng độ dịch đệm bằng không. Các phản ứng cạnh tranh với các tế bào cho mỗi nồng độ của kháng thể không được đánh dấu được định lượng làm ba lần. Các phản ứng cạnh tranh với các tế bào được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ủ 2 giờ, các phản ứng cạnh tranh được chuyển vào đĩa lọc và rửa 4 lần bằng dịch đệm gắn kết để tách kháng thể được iôt hoá tự do khỏi kháng thể được iôt hoá đã gắn kết. Đếm các dịch lọc bằng thiết bị đếm gamma và đánh giá dữ liệu gắn kết sử dụng thuật toán của Munson và Rodbard (1980) để xác định ái lực gắn kết của kháng thể.

Phép phân tích BIACORE® ví dụ bằng cách sử dụng các chế phẩm theo sáng chế có thể tiến hành như sau. Kd như được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt có sử dụng BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ở nhiệt độ 25°C bằng cách sử dụng bộ kit kháng Fc của người (BiAcore Inc., Piscataway, NJ). Vắn tắt là, các chíp cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hoá (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hoá bằng *N*-etyl-*N'*- (3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysucxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng thể kháng Fc của người được pha loãng bằng natri axetat 10mM, pH 4,0, đến 50µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ chảy 5µl/phút để đạt được khoảng 10000 đơn vị đáp ứng (RU) của protein được ngẫu hợp. Sau khi tiêm kháng thể, etanolamin 1M được tiêm để phong bế các nhóm chưa phản ứng. Để xác định động học, biến thể kháng thể kháng TfR đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu được tiêm

trong HBS-P để đạt đến khoảng 220RU, tiếp đó các dịch pha loãng theo dãy hai lần của MuTfR-His (nằm trong khoảng từ 0,61nM đến 157nM) được tiêm trong HBS-P ở nhiệt độ 25°C ở tốc độ chảy khoảng 30µl/phút. Tốc độ kết hợp (kon) và tốc độ phân ly (koff) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một với một (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) theo cách đồng thời khớp đồ thị cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (Kd) được tính theo tỷ lệ koff/kon. Xem, ví dụ, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999) của Chen et al..

Theo một phương án khác, Kd được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt với thiết bị BIACORE®-2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ở nhiệt độ 25°C bằng cách sử dụng bộ kit kháng Fc của người (BiAcore Inc., Piscataway, NJ). Vắt tắt là, các chíp cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hoá (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hoá bằng *N*-etyl-*N'*-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysucxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng thể kháng Fc của người được pha loãng bằng natri axetat 10mM, pH 4,0, đến 50µg/ml trước khi tiêm ở tốc độ chảy 5µl/phút để đạt được khoảng 10000 đơn vị đáp ứng (RU) của protein được ngẫu hợp. Sau khi tiêm kháng thể, etanolamin 1M được tiêm để phong bế các nhóm chưa phản ứng. Để xác định động học, các biến thể kháng thể kháng TfR được tiêm trong HBS-P để đạt đến khoảng 220RU, tiếp đó các dịch pha loãng theo dãy hai lần của TfR-His (nằm trong khoảng từ 0,61nM đến 157nM) được tiêm trong HBS-P ở nhiệt độ 25°C ở tốc độ chảy khoảng 30µl/phút. Tốc độ kết hợp (kon) và tốc độ phân ly (koff) được tính bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir một với một (BIACORE ® Evaluation Software version 3.2) theo cách đồng thời khớp đồ thị cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (Kd) được tính theo tỷ lệ koff/kon. Xem, ví dụ, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999) của Chen et al..

Một vài phương pháp xác định IC50 đối với hợp chất đã cho là đã biết trong lĩnh vực; phương pháp chung là tiến hành thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, như thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này. Nói chung, IC50 cao cho thấy cần nhiều kháng thể hơn để ức chế sự gắn kết của phối tử đã biết, và do đó ái lực của kháng thể này với phối tử là tương đối thấp. Ngược lại, IC50 thấp cho thấy cần ít kháng thể để ức chế sự gắn kết của phối tử đã biết, và do đó ái lực của kháng thể này với phối tử là tương đối cao.

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh được lấy làm ví dụ để xác định IC50 là thử nghiệm mà trong đó nồng độ gia tăng của các kháng thể biến thể kháng TfR hoặc kháng TfR/kháng nguyên não (có nghĩa là, kháng TfR/BACE1, kháng TfR/Abeta và kháng thể tương tự) được sử dụng để cạnh tranh với kháng thể kháng TfR đã biết được biotin hoá về sự gắn kết với TfR. ELISA cạnh tranh kháng TfR được tiến hành trong các đĩa Maxisorp (Neptune, N.J.) được phủ bằng 2,5µg/ml miền ngoại bào TfR của chuột đã tinh chế trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phong bế bằng cách sử dụng dịch đệm phong bế Superblock trong PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Chuẩn độ từng kháng thể kháng TfR hoặc kháng TfR/kháng nguyên não riêng rẽ (có nghĩa là, kháng TfR/BACE1 hoặc kháng TfR/Abeta) (pha loãng theo dãy 1:3) kết hợp với kháng TfR đã biết được biotin hoá (nồng độ cuối cùng 0,5nM) và được thêm vào đĩa trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05%, và HRP-streptavidin (Southern Biotech, Birmingham) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05%, và kháng thể kháng TfR được biotin hoá đã gắn kết với đĩa được phát hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

b) Các mảnh kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, và scFv, và các mảnh khác đề cập dưới đây. Xem tổng kết về các mảnh kháng thể, trong *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) của Hudson et al.. Xem tổng kết về các mảnh scFv, ví dụ, trong, *The Pharmacology of Monoclona Antibodies*, vol. 113, của Pluckthün, Rosenburg và Moore biên tập, (Springer-Verlag, New York), các trang 269-315 (1994); cũng xem WO 93/16185; và các bằng sáng chế Mỹ số 5571894 và 5587458. Đối với các mảnh Fab và $F(ab')_2$ bao gồm các gốc epitop gắn kết cứu hộ và có thời gian bán thải in vivo gia tăng, xem bằng sáng chế Mỹ số 5869046.

Các kháng thể thể đôi là các mảnh kháng thể có 2 vị trí gắn kết kháng nguyên có thể có hoá trị hai hoặc lưỡng hiệu. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) của Hudson et al.; và *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-

6448 (1993) của Hollinger et al.. Các kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong *Nat. Med.* 9:129-134 (2003) của Hudson et al..

Các kháng thể miền đơn nhất là các mảnh kháng thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nặng hoặc toàn bộ hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn nhất là kháng thể miền đơn nhất của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 6248516 B1).

Các mảnh kháng thể có thể được điều chế bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kỹ thuật thuỷ phân protein kháng thể nguyên vẹn cũng như kỹ thuật sản xuất bằng tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ, *E. coli* hoặc thực khuẩn thể), như mô tả trong bản mô tả này.

c) Các kháng thể khảm và được nhân tính hóa

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế là kháng thể khảm. Các kháng thể khảm được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: US 4816567; và Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855 của Morrison, S.L., et al.. Trong một ví dụ, kháng thể khảm bao gồm vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi thu được từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải là người, như là khỉ) và vùng cố định của người. Các kháng thể khảm quan tâm trong bản mô tả này bao gồm các kháng thể "được làm tương thích với động vật linh trưởng" bao gồm các trình tự gắn kết miền biến đổi kháng nguyên thu được từ động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ Cựu thế giới, như khỉ đầu chó, khỉ nâu rhesus hoặc khỉ Cynomolgus) và các trình tự vùng cố định của người (Bằng sáng chế Mỹ 5693780). Trong một ví dụ khác, kháng thể khảm là kháng thể "đã chuyển lớp", trong đó lớp hoặc phân lớp đã được thay đổi so với lớp kháng thể gốc. Các kháng thể khảm bao gồm các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo các phương án nhất định, kháng thể khảm là kháng thể được nhân tính hóa. Thông thường, kháng thể không phải của người được nhân tính hóa để làm giảm tính sinh miễn dịch cho người, nhưng vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể gốc không phải của người. Nói chung, kháng thể được nhân tính hóa bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi, trong đó các HVR, ví dụ, các CDR, (hoặc các đoạn của chúng) là thu được từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các đoạn của

chúng) là thu được từ các trình tự kháng thể của người. Kháng thể được nhân tính hóa tuỳ ý còn bao gồm ít nhất một đoạn vùng cố định của người. Theo một vài phương án, một vài gốc FR trong kháng thể được nhân tính hóa được thay thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể nhờ đó thu được các gốc HVR), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được nhân tính hóa và các phương pháp điều chế chúng được tóm tắt, ví dụ, trong tài liệu: J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633 của Almagro, và Fransson, và còn được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Nature 332 (1988) 323-329 của Riechmann et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033 của Queen et al.; các bằng sáng chế Mỹ số US 5821337, US 7527791, US 6982321, và US 7087409; Methods 36 (2005) 25-34 của Kashmiri, et al. (mô tả cách ghép vùng xác định tính đặc hiệu (SDR)); Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 của Padlan, (mô tả "tái tạo bề mặt"); Methods 36 (2005) 43-60 của Dall'Acqua et al. (mô tả "cách xáo trộn FR"); Methods 36 (2005) 61-68 của Osbourn et al.; và Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 của Klimka et al. (mô tả phương pháp "chọn lọc định hướng" cho xáo trộn FR).

Các vùng khung của người có thể được sử dụng để làm tương thích với người bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các vùng khung được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (xem, ví dụ, J. Immunol. 151:2296 (1993) của Sims, et al.; các vùng khung thu được từ trình tự đồng thuận của các kháng thể của người thuộc phân nhóm cụ thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (xem, ví dụ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992) của Carter et al.; và J. Immunol. 151:2623 (1993) của Presta et al.); các vùng khung trưởng thành (được gây đột biến soma) hoặc các vùng khung dòng tế bào mầm của người (xem, ví dụ, J., Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) của Almagro và Fransson); và các vùng khung thu được từ quá trình sàng lọc các thư viện FR (xem, ví dụ, J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) của Baca et al., và J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) của Rosok et al.).

d) Các kháng thể của người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế là kháng thể của người. Các kháng thể của người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể của người nói chung được mô tả

trong: Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-374 (2001) của van Dijk và van de Winkel, và Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) của Lonberg.

Các kháng thể của người có thể được điều chế bằng cách cho một động vật chuyển gen dùng chất sinh miễn dịch, động vật này đã được cải biến để sản sinh các kháng thể nguyên vẹn của người hoặc các kháng thể nguyên vẹn với các vùng biến đổi của người để đáp ứng với kích thích kháng nguyên. Các động vật này thông thường có mang toàn bộ hoặc một phần các locus globulin miễn dịch của người, các locus này thay thế các locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc các locus này có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc được tích hợp ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của động vật này. Trong chuột chuyển gen này, các locus globulin miễn dịch nội sinh nói chung đã được làm bất hoạt. Tóm tắt về các phương pháp để thu được các kháng thể của người từ các động vật chuyển gen, có thể xem trong: Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005) của Lonberg. Cũng có thể xem, ví dụ, US 6075181 và bằng sáng chế Mỹ số 6150584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; bằng sáng chế Mỹ số 5770429 mô tả công nghệ HUMAB®; bằng sáng chế Mỹ số 7041870 mô tả công nghệ K-M MOUSE®, và Đơn sáng chế Mỹ số 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Các vùng biến đổi của người từ các kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bởi các động vật này có thể được cải biến tiếp, ví dụ, bằng cách kết hợp với một vùng cố định khác của người.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp tế bào lai. Các dòng tế bào u tuỷ của người và u tuỷ khác loài chuột-người để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả (xem, ví dụ, J. Immunol. 133:3001 (1984) của Kozbor; Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), các trang 51-63 của Brodeur et al.; và J. Immunol. 147:86 (1991) của Boerner et al.). Các kháng thể của người được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai tế bào B của người cũng được mô tả trong: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-3562 (2006) của Li et al.. Các phương pháp bổ sung bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong: bằng sáng chế Mỹ số 7189826 (mô tả quy trình sản xuất các kháng thể đơn dòng IgM của người từ các dòng tế bào lai) và Xiandai Mianyixue 26(4):265-268 (2006) của Ni (mô tả các tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai của người (Trioma technology) cũng được mô tả trong: S., Histology and Histopathology 20(3):927-937 (2005) của Vollmers và Brandlein, và Methods and

Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-191 (2005) của Vollmers và Brandlein.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi dòng Fv được chọn từ các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể thu được từ người. Các trình tự miền biến đổi này sau đó có thể được kết hợp với miền cố định của người mong muốn. Các kỹ thuật để chọn lọc các kháng thể của người từ các thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

e) Các kháng thể thu được từ thư viện

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp đối với các kháng thể với tính chất hoặc các tính chất mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp là đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các thư viện biểu hiện thực khuẩn thể và sàng lọc các thư viện này để tìm các kháng thể có các đặc tính gắn kết mong muốn. Các phương pháp này được tổng kết, ví dụ, trong: Methods in Molecular Biology 178:1-37 (2001) của Hoogenboom et al., (O'Brien et al., biên tập, Human Press, Totowa, NJ, 2001) và còn được mô tả, ví dụ, trong Nature 348:552-554 (1990) của McCafferty et al.; Nature 352:624-628 (1991) của Clackson et al.; J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992) của Marks et al.; Methods in Molecular Biology 248:161-175 của Marks và Bradbury (Lo, Ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004) của Sidhu et al.; J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004) của Lee et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004) của Fellouse; và J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004) của Lee et al..

Trong một vài phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể, các danh mục gen VH và VL được tách dòng riêng rẽ bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và tái tổ hợp ngẫu nhiên trong các thư viện thực khuẩn thể, các thư viện này tiếp đó được sàng lọc để lấy thực khuẩn thể gắn kết kháng nguyên như mô tả trong: Ann. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994) của Winter et al.. Thực khuẩn thể thông thường biểu hiện các mảnh kháng thể, dưới dạng các mảnh Fv đơn chuỗi (scFv) hoặc dưới dạng các mảnh Fab. Các thư viện từ các nguồn được gây miễn dịch cung cấp các kháng thể có ái lực cao đối với chất sinh miễn dịch mà không cần đến sự xây dựng cấu trúc các tế bào lai. Theo cách khác, các danh mục ban đầu có thể được tách dòng (ví dụ, từ người) để tạo ra nguồn kháng thể duy nhất đối với nhiều loại kháng nguyên không phải là tự kháng

nguyên và cả các kháng nguyên là tự kháng nguyên mà không cần gây miễn dịch như được mô tả bởi Griffiths et al. trong: EMBO J. 12:725-734 (1993). Cuối cùng là, các thư viện ban đầu cũng có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn V-gen không được sắp xếp lại từ tế bào gốc, và sử dụng các đoạn mồi PCR có chứa trình tự ngẫu nhiên mã hoá các vùng CDR3 siêu biến đổi và đạt được sự sắp xếp lại *in vitro*, như được mô tả bởi Hoogenboom và Winter, trong: G., J. Mol. Biol. 227:381-388 (1992). Tài liệu sáng chế công bố mô tả các thư viện thực khuẩn thể kháng thể của người bao gồm, ví dụ: bằng sáng chế Mỹ số US 5750373, và các Đơn sáng chế Mỹ số US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936, và US 2009/0002360.

Các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể được phân lập từ các thư viện kháng thể của người được xem là các kháng thể của người hoặc các mảnh kháng thể của người trong bản mô tả này.

g) Các kháng thể đa đặc hiệu

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể lưỡng đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu là các kháng thể đơn dòng có các tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo các phương án nhất định, một trong số các tính đặc hiệu gắn kết là cho TfR và tính đặc hiệu còn lại là cho kháng nguyên còn lại. Theo các phương án nhất định, các kháng thể lưỡng đặc hiệu có thể gắn kết với hai epitop khác nhau của TfR. Các kháng thể lưỡng đặc hiệu cũng có thể được sử dụng để khu trú các chất gây độc tế bào đến các tế bào biểu hiện TfR. Các kháng thể lưỡng đặc hiệu có thể được điều chế dưới dạng các kháng thể có độ dài đầy đủ hoặc các mảnh kháng thể.

Các kỹ thuật để điều chế các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kỹ thuật đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng globulin miễn dịch có các tính đặc hiệu khác nhau (xem tài liệu: *Nature* 305: 537 (1983), của Milstein và Cuello), WO 93/08829, và *EMBO J.* 10: 3655 (1991) của Traunecker et al.,), và công nghệ "nốt phồng-vào-lỗ" (xem tài liệu, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 5,731,168). Các kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được điều chế bằng cách xử lý hiệu ứng điều khiển tĩnh điện để tạo ra các phân tử kháng thể Fc-dị đime (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai hoặc nhiều kháng thể hoặc các mảnh (xem,

ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 4676980, và *Science*, 229: 81 (1985) của Brennan et al.); bằng cách sử dụng dây kéo lơxin để sản xuất các kháng thể lưỡng đặc hiệu (xem, ví dụ, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992) của Kostelny et al.); bằng cách sử dụng công nghệ "kháng thể thể đôi" để tạo ra các mảnh kháng thể lưỡng đặc hiệu (xem, ví dụ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) của Hollinger et al.); và bằng cách sử dụng các đime đơn chuỗi Fv (sFv) (xem, ví dụ *J. Immunol.*, 152:5368 (1994) của Gruber et al.); và điều chế các kháng thể tam đặc hiệu như được mô tả trong, ví dụ, *J. Immunol.* 147: 60 (1991) của Tutt et al..

Kháng thể hoặc mảnh trong bản mô tả này còn bao gồm "FAb hoạt động kép" hoặc "DAF" bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết với TfR cũng như một kháng nguyên khác (ví dụ, xem Đơn sáng chế Mỹ số 2008/0069820).

Theo một phương án của sáng chế, thực hiện "ngẫu hợp" bằng cách tạo ra kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ kháng thể lưỡng đặc hiệu). Các kháng thể đa đặc hiệu là các kháng thể đơn dòng có các tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất hai kháng nguyên hoặc epitop khác nhau. Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết TfR và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết kháng nguyên não, như beta-secretaza 1 (BACE1) hoặc Abeta, và các kháng nguyên não khác được đề cập trong bản mô tả này.

Kháng nguyên não được lấy làm ví dụ được gắn kết bởi kháng thể đa đặc hiệu/lưỡng đặc hiệu này là BACE1, và kháng thể gắn kết được lấy làm ví dụ là kháng thể YW412.8.31 trên Fig.16A-Fig.16B trong bản mô tả này.

Theo một phương án khác, kháng nguyên não là Abeta, các kháng thể này ví dụ được mô tả trong WO2007068412, WO2008011348, WO20080156622, và WO2008156621, được viện dẫn ở đây để tham khảo, với kháng thể Abeta ví dụ bao gồm kháng thể IgG4 MABT5102A bao gồm các trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng trên Fig.11A và Fig.11B.

Các kỹ thuật để điều chế các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kỹ thuật đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nhẹ-chuỗi nặng globulin miễn dịch có các tính đặc hiệu khác nhau (xem tài liệu: *Nature* 305: 537 (1983), của Milstein và Cuello), WO 93/08829, và *EMBO J.* 10: 3655 (1991) của Traunecker et al.,), và công nghệ "nốt phồng vào lỗ" (xem tài liệu, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số

5731168). Các kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được điều chế bằng cách xử lý hiệu ứng điều khiển tĩnh điện để tạo ra các phân tử kháng thể Fc-dị đime (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai hoặc nhiều kháng thể hoặc các mảnh (xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 4676980, và *Science*, 229: 81 (1985) của Brennan et al.); bằng cách sử dụng dây kéo lơxin để sản xuất các kháng thể lưỡng đặc hiệu (xem, ví dụ, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992) của Kostelny et al.); bằng cách sử dụng công nghệ "kháng thể thể đôi" để tạo ra các mảnh kháng thể lưỡng đặc hiệu (xem, ví dụ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) của Hollinger et al.); và bằng cách sử dụng các đime đơn chuỗi Fv (sFv) (xem, ví dụ *J. Immunol.*, 152:5368 (1994) của Gruber et al.); và điều chế các kháng thể thể ba đặc hiệu như được mô tả trong, ví dụ, *J. Immunol.* 147: 60 (1991) của Tutt et al..

Các kháng thể được xử lý với ba hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên hoạt động, bao gồm "các kháng thể bạch tuộc," hoặc "các globulin miễn dịch miền biến đổi kép" (DVD) cũng được bao gồm trong bản mô tả này (xem, ví dụ US 2006/0025576A1, và *Nature Biotechnology* (2007) của Wu et al.).

h) Các biến thể kháng thể

Theo các phương án nhất định, sáng chế dự định các biến thể trình tự axit amin của kháng thể được đề xuất theo sáng chế. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái lực gắn kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được điều chế bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hoá kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, các khuyết đoạn từ, và/hoặc các cài xen vào và và/hoặc các thay thế các gốc trong các trình tự axit amin của kháng thể. Có thể thực hiện tổ hợp bất kỳ khuyết đoạn, cài xen, và thay thế để thu được cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết kháng nguyên.

Các biến thể khuyết đoạn, cài xen, và thay thế

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều thay thế axit amin. Các vị trí quan tâm để gây đột biến thay thế bao gồm các HVR và FR. Các thay thế bảo toàn được thể hiện trong Bảng 2 dưới đề mục "các thay thế được ưu tiên." Các thay đổi đáng kể hơn được đề cập trong Bảng 2 dưới đề mục "các thay thế ví dụ" và như được mô tả dưới đây liên quan đến các nhóm chuỗi

bên axit amin. Có thể đưa các thay thế axit amin vào kháng thể quan tâm và sàng lọc các sản phẩm về hoạt tính mong muốn, ví dụ, vẫn giữ được/cải thiện khả năng gắn kết kháng nguyên, tính gây miễn dịch giảm đi, hoặc ADCC hoặc CDC được cải thiện.

Bảng 2

Gốc ban đầu	Các thay thế ví dụ	Các thay thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Nolơxin	Leu
Leu (L)	Nolơxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Nolơxin	Leu

Axit amin có thể nhóm lại theo các tính chất chung của chuỗi bên:

(1) tính kỵ nước: Noloxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) tính thân nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) tính axit: Asp, Glu;

(4) tính bazơ: His, Lys, Arg;

(5) các gốc ảnh hưởng đến định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các thay thế không bảo toàn sẽ dẫn đến sự hoán vị một thành viên của một trong các nhóm này cho một nhóm khác.

Một loại biến thể thay thế bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc của vùng siêu biến đổi của kháng thể gốc (ví dụ, kháng thể được nhân tính hóa hoặc của người). Nói chung, (các) biến thể thu được được chọn lọc để nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến (ví dụ, các cải thiện) về một số tính chất sinh học nhất định (ví dụ, ái lực gia tăng, tính sinh miễn dịch giảm đi) so với kháng thể gốc và/hoặc sẽ hầu như giữ được các tính chất sinh học nhất định của kháng thể gốc. Biến thể thay thế ví dụ là kháng thể được làm trưởng thành ái lực, có thể được tạo ra một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật làm trưởng thành ái lực dựa trên sự biểu hiện thực khuẩn thể như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Tóm lại, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và các kháng thể biến thể được biểu hiện trên thực khuẩn thể và sàng lọc theo một hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết).

Thay đổi (ví dụ, các thay thế) có thể thực hiện trong HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực của kháng thể. Thay đổi này có thể được thực hiện ở "các điểm nóng" của HVR nghĩa là, các gốc được mã hoá bởi các cođon bị đột biến ở tần suất cao trong quá trình làm trưởng thành soma (xem, ví dụ, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008) của Chowdhury), và/hoặc các gốc tiếp xúc với kháng nguyên, với VH hoặc VL biến thể thu được được thử nghiệm ái lực gắn kết. Quá trình làm trưởng thành ái lực bằng cách xây dựng cấu trúc và tái chọn lọc từ các thư viện cấp hai đã được mô tả trong: ví dụ, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 của Hoogenboom et al., (O'Brien et al., biên tập, Human Press, Totowa, NJ, (2001). Theo một vài phương án làm trưởng thành ái lực, tính đa dạng được tạo ra trong các gen có thể thay đổi được chọn để làm trưởng

thành bằng phương pháp bất kỳ (ví dụ, PCR dễ sai sót, xáo trộn chuỗi, hoặc gây đột biến định hướng oligonucleotit). Tiếp đó thư viện cấp hai được tạo ra. Thư viện này sau đó được sàng lọc để xác định các biến thể kháng thể có ái lực mong muốn. Một phương pháp khác để tạo tính đa dạng bao gồm các phương pháp định hướng HVR, trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc ở một thời điểm) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc HVR tham gia vào quá trình gắn kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng gây đột biến hoặc mô hình quét alanin. Thường hướng đích cụ thể CDR-H3 và CDR-L3.

Theo các phương án nhất định, các thay thế, các cài xen, hoặc các khuyết đoạn có thể xảy ra ở một hoặc nhiều HVR sao cho thay đổi này không làm giảm đáng kể khả năng của kháng thể gắn kết kháng nguyên. Ví dụ, thay đổi bảo toàn (ví dụ, các thay thế bảo toàn như được đề xuất theo sáng chế) không làm giảm đáng kể ái lực gắn kết có thể thực hiện trong các HVR. Thay đổi này có thể ở bên ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên trong các HVR. Theo các phương án nhất định của các trình tự VH và VL biến thể nêu trên, mỗi HVR không được biến đổi, hoặc có chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba thay thế axit amin.

Phương pháp hữu ích để xác định các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể nhằm vào để gây đột biến gọi là "gây đột biến quét alanin" được Cunningham và Wells (1989) mô tả trong: *Science*, 244:1081-1085. Theo phương pháp này, một gốc hoặc nhóm các gốc đích (ví dụ, có gốc mang điện tích như arg, asp, his, lys, và glu) được xác định và thay thế bằng axit amin trung tính hoặc mang điện tích âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định liệu tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng. Các thay thế có thể được đưa vào ở vị trí axit amin chứng tỏ tính nhạy cảm hoạt động với các thay thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc hơn nữa, cấu trúc tinh thể của một phức hợp kháng nguyên-kháng thể để xác định các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên có thể được sử dụng. Các gốc tiếp xúc này và các gốc gần đó được nhằm vào hoặc loại bỏ như các gốc ứng cử để thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Các cài xen trình tự axit amin bao gồm các thể dung hợp đầu tận cùng amino và/hoặc carboxyl độ dài khác nhau từ một gốc đến polypeptit có chứa hàng trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như các cài xen vào giữa trình tự gồm một gốc hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ về các cài xen đầu tận cùng bao gồm kháng thể với gốc methionyl đầu

tận cùng N. Các biến thể cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm dung hợp ở đầu tận cùng N hoặc C của kháng thể với một enzym (ví dụ cho ADEPT) hoặc polypeptit làm tăng thời gian bán thải trong huyết thanh của kháng thể.

Các biến thể glycosyl hoá

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này được biến đổi để làm gia tăng hoặc giảm thiểu mức độ mà kháng thể này được glycosyl hoá. Việc thêm vào hoặc bỏ bớt các vị trí glycosyl hoá của kháng thể có thể đạt được dễ dàng bằng cách làm thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá được tạo ra hoặc bỏ đi.

Trong trường hợp kháng thể bao gồm vùng Fc, hyđrat cacbon gắn liền với vùng này có thể được biến đổi. Các kháng thể nguyên thuỷ do các tế bào động vật có vú sản sinh thường bao gồm dạng oligosacarit hai anten mạch nhánh nói chung là được gắn bởi liên kết N với Asn297 của miền CH2 thuộc vùng Fc. Xem, ví dụ, TIBTECH 15 (1997) 26-32 của Wright, A. và Morrison, S.L.). Oligosacarit này có thể bao gồm nhiều loại hyđrat cacbon, ví dụ, manoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza gắn với GlcNAc ở "phần thân" của cấu trúc oligosacarit dạng hai anten. Theo một vài phương án, các cải biến oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế có thể được tiến hành để tạo ra các biến thể kháng thể với các tính chất nhất định được cải thiện.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến các biến thể kháng thể có cấu trúc hyđrat cacbon mà không có fucoza gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) với vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể có thể từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính lượng fucoza trung bình trong mạch đường ở Asn297, so với tổng các cấu trúc glycosyl gắn với Asn 297 (ví dụ, các cấu trúc phức hợp, lai và hàm lượng manoza cao) như được xác định bằng phổ khối MALDI-TOF, như được mô tả ví dụ trong: WO 2008/077546. Asn297 dùng để chỉ gốc asparagin nằm ở vị trí 297 trong vùng Fc (cách đánh số EU các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể ở vị trí ± 3 axit amin phía trước hoặc phía sau vị trí 297, nghĩa là, giữa các vị trí 294 và 300, do thay đổi nhỏ trong trình tự các kháng thể. Việc fucosyl hoá các biến thể này có thể cải thiện chức năng ADCC. Xem, ví dụ, US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ví dụ

về các tài liệu công bố liên quan đến các biến thể kháng thể "khử fucosyl hoá" hoặc "thiếu hụt fucoza" bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004) của Okazaki et al.; *Biotech. Bioeng.* 87: 614-622 (2004) của Yamane-Ohnuki et al.. Ví dụ về các dòng tế bào có khả năng sản sinh các kháng thể khử fucosyl hoá bao gồm các tế bào CHO Lec13 thiếu hụt fucosyl hoá protein (*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986) của Ripka et al.; US 2003/0157108 A1, Presta, L; và WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, đặc biệt ở Ví dụ 11), và các dòng tế bào "được làm khuyết gen (knockout)", như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8,* tế bào CHO bất hoạt (xem, ví dụ, *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004) của Yamane-Ohnuki et al.; *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006) của Kanda, Y. et al.; và WO2003/085107).

Các biến thể kháng thể còn được đề cập với các oligosacarit được cắt đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit dạng hai anten gắn với vùng Fc của kháng thể được cắt đôi bởi GlcNAc. Các biến thể kháng thể này có thể có fucosyl hoá giảm và/hoặc chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ về các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); US 6,602,684 (Umana *et al.*); và US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Sáng chế cũng đề cập đến các biến thể kháng thể với ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit gắn với vùng Fc. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

Các biến thể vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin khác nữa có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất theo sáng chế, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) bao gồm cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án nhất định, sáng chế dự liệu kháng thể biến thể có một vài, nhưng không phải tất cả các chức năng hiệu ứng, các chức năng này làm cho kháng thể trở thành kháng thể mong muốn để sử dụng, trong đó thời gian bán thải của kháng thể *in vivo* là quan trọng mặc dù các chức năng hiệu ứng (như là bổ thể và ADCC) là không cần thiết và có thể loại bỏ. Có thể thực hiện các thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* để khẳng định sự giảm thiểu/suy kiệt các hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, các thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo là kháng thể không có khả năng gắn kết FcγR (do đó có thể không có hoạt tính ADCC), nhưng vẫn giữ được khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào cấp một để điều tiết ADCC, các tế bào giết tự nhiên (NK), chỉ biểu hiện FcγRIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Biểu hiện FcR trên các tế bào tạo máu được tóm tắt trong Bảng 3, trang 464 của tài liệu: Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492 của Ravetch và Kinet. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các thử nghiệm *in vitro* định lượng hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm được mô tả trong: US 5,500,362 (xem, ví dụ, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; và Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502) của Hellstrom, I. et al.; US 5,821,337 (xem J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987) của Bruggemann, M. et al.). Theo cách khác, các phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTI™ đếm lưu lượng tế bào (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Các tế bào hiệu ứng hữu ích cho các thử nghiệm bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc theo cách bổ sung, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, *ví dụ,* trên mô hình động vật, như là mô hình được bộc lộ trong tài liệu: Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) của Clynes et al.. Các thử nghiệm gắn kết C1q cũng có thể được thực hiện để khẳng định là kháng thể không có khả năng gắn kết C1q và do đó không có hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402). Để đánh giá hoạt hoá bổ thể, có thể tiến hành thử nghiệm CDC (xem, ví dụ, J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171 của Gazzano-Santoro et al.; Blood 101:1045-1052 (2003) của Cragg, M.S. et al.; và Blood 103:2738-2743) (2004) của Cragg, M.S. và M.J. Glennie. Cũng có thể tiến hành xác

định gắn kết FcRn và thanh thải/thời gian bán thải *in vivo* bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Int'l. Immunol. 18:1759-1769 (2006) của Petkova, S.B. et al.).

Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các kháng thể với chức năng hiệu ứng giảm đi bao gồm các kháng thể với thay thế một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (Bằng sáng chế Mỹ số 6737056). Các đột biến vùng Fc này bao gồm các đột biến vùng Fc với thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến vùng Fc gọi là "DANA" với thay thế các gốc 265 và 297 thành alanin (Bằng sáng chế Mỹ số 7332581).

Các biến thể kháng thể với khả năng gắn kết với FcR giảm đi hoặc cải thiện được mô tả. Xem, ví dụ, bằng sáng chế Mỹ số 6737056; WO 2004/056312, và *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) của Shields et al..

Theo các phương án nhất định, kháng thể biến thể bao gồm vùng Fc với một hoặc nhiều thay thế axit amin cải thiện ADCC, ví dụ, các thay thế ở vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (cách đánh số EU của các gốc).

Theo một vài phương án, thay đổi ở vùng Fc dẫn đến sự gắn kết C1q biến đổi (có nghĩa là, cải thiện hoặc giảm đi) và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) biến đổi (có nghĩa là, cải thiện hoặc giảm đi), ví dụ, như mô tả trong: bằng sáng chế Mỹ số 6194551, WO 99/51642, và *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000) của Idusogie et al..

Các kháng thể có thời gian bán thải gia tăng và khả năng gắn kết với Fc thụ thể mới sinh (FcRn) được cải thiện, đặc tính này chịu trách nhiệm về sự vận chuyển các IgG của mẹ sang thai nhi (J. Immunol. 117:587-593 (1976), của Guyer et al., và J. Immunol. 24:249 (1994) của Kim, J.K. et al.,), được mô tả trong US 2005/0014934 (Hinton et al.). Các kháng thể bao gồm vùng Fc với một hoặc nhiều thay thế nhờ đó cải thiện khả năng gắn kết của vùng Fc với FcRn. Các biến thể vùng Fc không mang tính giới hạn này bao gồm các biến thể với các thay thế ở một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, thay thế gốc 434 của vùng Fc (US 7,371,826).

Xem tài liệu: Nature 322:738-40 (1988) của Duncan & Winter; bằng sáng chế Mỹ số 5648260; bằng sáng chế Mỹ số 5624821; và WO 94/29351 về các ví dụ khác về các biến thể vùng Fc.

Các biến thể kháng thể được xử lý xystein

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn tạo ra các kháng thể được xử lý xystein, ví dụ, "thioMAb," trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thay thế bằng các gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thay thế này là ở các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể. Bằng cách thay thế các gốc này bằng xystein, các nhóm thiol phản ứng nhờ đó ở vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể với các phần tử khác, như các phần tử thuốc hoặc phần tử liên kết thuốc, để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch như mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ sau đây có thể được thay thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (cách đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (cách đánh số EU) của vùng chuỗi nặng Fc. Các kháng thể được xử lý xystein có thể được tạo ra như mô tả, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ số 7521541.

Các dẫn xuất kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế có thể được cải biến tiếp để có chứa các phần tử không phải protein bổ sung đã biết trong lĩnh vực này và có bán sẵn. Các phần tử thích hợp để tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các polyme tan trong nước. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit của axit maleic, poly-axit amin (các polyme đồng nhất hoặc đồng polyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, các polyme đồng nhất propropylen glycol, copolyme prolypropylen oxit/etylen oxit, polyol polyoxyetyl hoá (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các ưu điểm trong sản xuất do nó ổn định trong nước. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể là mạch nhánh hoặc không phải mạch nhánh. Số lượng các polyme gắn

với kháng thể có thể biến thiên, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn, các polyme này có thể là cùng một phân tử hoặc các phân tử khác nhau. Nói chung, số lượng và/hoặc chủng loại các polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên cân nhắc các yếu tố, nhưng không giới hạn ở, các tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong liệu pháp điều trị trong các điều kiện xác định, v.v..

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các thể tiếp hợp của kháng thể và phần tử không phải protein có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng cách phơi nhiễm phóng xạ. Theo một phương án, phần tử không phải protein là ống nano cacbon (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005) của Kam, N.W. et al.). Sự chiếu xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bước sóng không gây hại các tế bào bình thường, nhưng gia nhiệt cho phần tử không phải protein đến nhiệt độ giết các tế bào gần với kháng thể-phần tử không phải protein.

B. Các phương pháp và chế phẩm tái tổ hợp

Các kháng thể có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp và chế phẩm tái tổ hợp, ví dụ, như mô tả trong: bằng sáng chế Mỹ số 4816567. Theo một phương án, sáng chế đề xuất (các) axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể kháng TfR được mô tả trong bản mô tả này. Axit nucleic này có thể mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo phương án khác, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vectơ (ví dụ, các vectơ biểu hiện) bao gồm axit nucleic. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ bao gồm axit nucleic này. Theo một phương án này, tế bào vật chủ bao gồm (ví dụ, đã được biến nạp với): (1) vectơ bao gồm axit nucleic mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể, hoặc (2) vectơ thứ nhất bao gồm axit nucleic mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic mã hoá trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào vật chủ là có nhân điển hình, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO) hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể kháng TfR, trong đó phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào vật chủ bao gồm axit nucleic mã hoá kháng thể, như đề xuất ở trên, trong các điều kiện

thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tuỳ ý thu hồi kháng thể này từ tế bào vật chủ (hoặc dịch nuôi cấy tế bào vật chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng TfR, axit nucleic mã hoá kháng thể, ví dụ, như mô tả ở trên, được phân lập và cài xen vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng tiếp và/hoặc biểu hiện trong tế bào vật chủ. Axit nucleic này có thể dễ dàng được phân lập và xác định trình tự bằng cách sử dụng các quy trình đã biết (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với các gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào vật chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện các plasmit mã hoá kháng thể bao gồm các tế bào chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các kháng thể có thể được sản xuất trong vi khuẩn, cụ thể là khi không cần glycosyl hoá và chức năng hiệu ứng Fc. Để biểu hiện các mảnh kháng thể và polypeptit trong vi khuẩn, xem tài liệu: ví dụ, US 5648237, US 5789199, và US 5840523 (Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (biên tập), Humana Press, Totowa, NJ (2003), trang 245-254 của Charlton, K.A., mô tả biểu hiện các mảnh kháng thể trong *E. coli*.). Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ khối tế bào vi khuẩn trong phân đoạn hoà tan và có thể được tinh chế tiếp.

Ngoài các sinh vật chưa có nhân điển hình, các vi sinh vật có nhân điển hình như là nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng và biểu hiện thích hợp cho các vectơ mã hoá kháng thể, bao gồm các chủng nấm và nấm men, mà con đường glycosyl hoá của chúng đã "được nhân tính hóa," dẫn đến sản xuất kháng thể có kiểu glycosyl hoá một phần hoặc hoàn toàn là của người. Xem tài liệu: Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) của Gerngross; và Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) của Li et al..

Các tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hoá cũng thu được từ các sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Ví dụ về các tế bào động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng. Nhiều chủng baculovirus đã được xác định có thể sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Có thể sử dụng nuôi cấy tế bào thực vật làm vật chủ. Xem tài liệu, ví dụ các bằng sáng chế Mỹ số 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, và 6417429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất các kháng thể ở thực vật chuyển gen).

Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được làm thích hợp để sinh trưởng trong hỗn dịch có thể là hữu ích. Ví dụ khác về các dòng tế bào vật chủ có vú hữu ích là dòng tế bào CV1 thận của khỉ được biến nạp với SV40 (COS-7); dòng tế bào phôi thận của người (các tế bào 293 hoặc 293T như được mô tả trong tài liệu, ví dụ, J Gen Virol 36:59 (1977) của Graham et al.), tế bào thận chuột đồng con (BHK), tế bào Sertoli của chuột (các tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Biol Reprod 23:243-251 (1980) của Mather), tế bào thận khỉ (CV1), tế bào thận khỉ xanh Châu Phi (VERO-76), các tế bào caxinom cổ tử cung của người (HELA), tế bào thận chó (MDCK), tế bào gan chuột buffalo (BRL 3A), tế bào phổi của người (W138), tế bào gan của người (Hep G2), các tế bào khối u vú của chuột (MMT 060562), các tế bào TRI (như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) của Mather et al.), các tế bào MRC 5, và các tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ có vú hữu ích khác bao gồm các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO), bao gồm các tế bào CHO DHFR$^-$ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 (1980), của Urlaub et al.); và các dòng tế bào u tuỷ như là Y0, NS0, P3X63 và Sp2/0. Để tổng kết các dòng tế bào vật chủ có vú thích hợp để sản xuất kháng thể, xem tài liệu, ví dụ, Methods in Molecular Biology, Tập 248 (B.K.C. Lo, biên tập, Humana Press, Totowa, NJ), (2003), các trang 255-268 của Yazaki và Wu.

C. Các thử nghiệm

Các kháng thể kháng TfR được đề cập trong bản mô tả này có thể được nhận biết, sàng lọc, xác định đặc tính các tính chất vật lý/hoá học và/hoặc hoạt tính sinh học bằng nhiều thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này.

a) Các thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Nhiều kỹ thuật là sẵn có để xác định sự gắn kết của kháng thể với TfR. Một thử nghiệm là thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) để xác nhận khả năng gắn kết với TfR của người (và kháng nguyên não). Theo thử nghiệm này, các đĩa được phủ bằng kháng nguyên (ví dụ, TfR tái tổ hợp) được ủ với mẫu bao gồm kháng thể kháng TfR và xác định mức gắn kết của kháng thể với kháng nguyên quan tâm.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng cách phương pháp đã biết như ELISA, phương pháp thấm tách Western, v.v..

Theo một khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể sử dụng để xác định kháng thể cạnh tranh với kháng thể theo sáng chế về gắn kết với TfR. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này gắn kết với cùng một epitop (ví dụ, epitop mạch thẳng hoặc cấu dạng) được gắn kết bởi kháng thể theo sáng chế, cụ thể hơn là epitop bất kỳ trong số các epitop được gắn kết đặc hiệu bởi các kháng thể trong lớp I, lớp II, lớp III hoặc lớp IV như mô tả trong bản mô tả này (xem, ví dụ, Ví dụ 1 và Bảng 4). Các phương pháp ví dụ chi tiết để lập bản đồ epitop mà kháng thể gắn kết với được đề cập trong "Epitop Mapping Protocols," trong tài liệu: *Methods in Molecular Biology* Tập 66 (Humana Press, Totowa, NJ) của Morris (1996).

Trong một thử nghiệm cạnh tranh ví dụ, TfR đã được cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà gắn kết với TfR (ví dụ, một hoặc nhiều kháng thể được đề cập trong bản mô tả này) và kháng thể không được đánh dấu thứ hai sẽ được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh của nó với kháng thể thứ nhất để gắn kết với TfR. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi tế bào lai. Mẫu đối chứng là TfR đã được cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất, nhưng không có kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong điều kiện cho phép gắn kết kháng thể thứ nhất với TfR, loại bỏ kháng thể chưa gắn kết còn dư, và xác định lượng chất đánh dấu kết hợp với TfR đã được cố định. Nếu lượng chất đánh dấu kết hợp với TfR đã được cố định về cơ bản giảm đi trong mẫu thử so với mẫu đối chứng, thì cho thấy là kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất gắn kết với TfR. Xem tài liệu: Antibodies: A Laboratory Manual chương 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), của Harlow và Lane (1988).

b) Thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các thử nghiệm để nhận biết kháng thể kháng TfR có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, sự vận chuyển hợp chất được liên hợp với/được tiếp hợp với kháng thể này đi qua BBB vào não và/hoặc CNS. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể có hoạt tính sinh học này in vivo và/hoặc in vitro.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính sinh học này.

D. Các thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế cũng đề xuất các thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng TfR trong bản mô tả này được tiếp hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như chất hoá trị liệu hoặc các thuốc, các chất ức chế tăng trưởng, các độc tố (ví dụ, các độc tố protein, các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc các chất đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, kháng thể kháng TfR trong bản mô tả này được ngẫu hợp với thuốc rối loạn thần kinh, chất hoá trị liệu và/hoặc chất tạo hình ảnh để vận chuyển hiệu quả hơn thuốc, chất hoá trị liệu và/hoặc chất tạo hình ảnh này đi qua BBB.

Sự tiếp hợp cộng hoá trị có thể là trực tiếp hoặc qua một liên kết. Theo các phương án nhất định, sự tiếp hợp trực tiếp là bằng cách xây dựng cấu trúc thể dung hợp protein (có nghĩa là, bằng cách dung hợp di truyền hai gen mã hoá kháng thể kháng TfR và ví dụ, thuốc rối loạn thần kinh và biểu hiện dưới dạng protein đơn nhất). Theo các phương án nhất định, sự tiếp hợp trực tiếp là bằng cách tạo thành liên kết cộng hoá trị giữa nhóm phản ứng trên một trong hai đoạn của kháng thể kháng TfR và nhóm tương ứng hoặc nhóm tiếp nhận trên, ví dụ, thuốc thần kinh. Theo các phương án nhất định, sự tiếp hợp trực tiếp là bằng cách cải biến (có nghĩa là, cải biến gen) của một trong số hai các phân tử sẽ được tiếp hợp với bao gồm nhóm phản ứng (Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế là, nhóm sulfhydryl hoặc nhóm carboxyl) mà tạo ra sự gắn kết cộng hoá trị với phân tử sẽ tiếp hợp còn lại trong các điều kiện thích hợp. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế là phân tử (có nghĩa là, axit amin) có nhóm phản ứng mong muốn (có nghĩa là, gốc xystein) có thể được đưa vào kháng thể kháng TfR và liên kết đisulfua được tạo thành với, ví dụ, thuốc thần kinh. Các phương pháp để tiếp hợp cộng hoá trị các axit nucleic với các protein cũng đã biết trong lĩnh vực này (có nghĩa là, quang hoá liên kết ngang, xem, ví dụ, *Russ. Chem.* Rev. 74: 77-95 (2005) của Zatsepin et al.).

Tiếp hợp không phải cộng hoá trị có thể bằng phương thức gắn kết không phải cộng hoá trị, kể cả các liên kết kỵ nước, liên kết ion, các tương tác tĩnh điện và các liên kết tương tự, mà sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rõ.

Cũng có thể tiến hành tiếp hợp bằng cách sử dụng nhiều loại liên kết. Ví dụ, kháng thể kháng TfR và thuốc thần kinh có thể được tiếp hợp bằng cách sử dụng nhiều loại chất ngẫu hợp protein hai nhóm chức như N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), sucxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai nhóm chức của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt động (như disucxinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis(p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), các diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo hoạt động kép (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch ricin có thể được điều chế như được mô tả trong *Science* 238:1098 (1987) của Vitetta et al.. Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminepentaaxetic được đánh dấu Cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat ví dụ để tiếp hợp nucleotit có tính phóng xạ với kháng thể này. Xem WO94/11026. Các liên kết peptit, bao gồm từ 1 đến 20 axit amin được nối bằng liên kết peptit, cũng có thể được sử dụng. Theo các phương án này, các axit amin được chọn từ 20 axit amin có trong tự nhiên. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ glyxin, alanin, prolin, asparagin, glutamin và lysin. Liên kết có thể "liên kết có thể phân cắt được" tạo thuận lợi giải phóng thuốc thần kinh khi vận chuyển đến não. Ví dụ, liên kết không bền với axit, liên kết nhạy cảm peptidaza, liên kết không bền với ánh sáng, liên kết dimetyl hoặc liên kết có chứa đisulfua (*Cancer Res.* 52:127-131 (1992) của Chari et al.; bằng sáng chế Mỹ số 5208020) có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng dự định, nhưng không giới hạn ở, các thể tiếp hợp được điều chế bằng các chất phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (sucxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) có bán sẵn (ví dụ, của Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp kháng thể-thuốc (ADC) trong đó kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều thuốc, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, maytansinoit (xem các bằng sáng chế Mỹ số 5208020, 5416064 và EP 0 425 235 B1); auristatin như các phần tử thuốc monometylauristatin DE và DF

(MMAE và MMAF) (xem các bằng sáng chế Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588, và 7,498,298); dolastatin; calicheamicin hoặc dẫn xuất của nó (xem các bằng sáng chế Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993) của Hinman et al.; và *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998) của Lode et al.); anthraxyclin như daunomyxin hoặc doxorubixin (xem *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006) của Kratz et al.; *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006) của Jeffrey et al.; *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005) của Torgov et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000) của Nagy et al.; *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002) của Dubowchik et al.; *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002) của King et al.; và bằng sáng chế Mỹ số 6,630,579); methotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothecene; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chuỗi A độc tố bạch hầu, các mảnh có hoạt tính không gắn kết của độc tố bạch hầu, chuỗi A ngoại độc tố (của Pseudomonas aeruginosa), chuỗi A ricin, chuỗi A abrin, chuỗi A modeccin, alpha-sarcin, các protein của Aleurites fordii, các protein dianthin, các protein của Phytolaca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curxin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và các tricothexen.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp với nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo thành thể tiếp hợp phóng xạ. Nhiều chất đồng vị phóng xạ là sẵn có để sản xuất các thể tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để nghiên cứu đo phát sáng, ví dụ tc99m hoặc I123, hoặc chất đánh dấu spin để chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn biết đến là chụp cộng hưởng từ, mri), như iôt-123, iôt-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắc.

E. Các phương pháp và các chế phẩm để chẩn đoán và phát hiện

Theo các phương án nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TfR được đề cập trong bản mô tả này hữu ích để phát hiện sự có mặt của TfR trong mẫu sinh phẩm. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm phát hiện định tính hoặc định lượng. Theo các phương án nhất định, mẫu sinh phẩm bao gồm tế bào hoặc mô, như máu (có nghĩa là, hồng cầu chưa trưởng thành), CSF, và mô có chứa BBB.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của TfR trong mẫu sinh phẩm. Theo các phương án nhất định, phương pháp bao gồm cho mẫu sinh phẩm tiếp xúc với kháng thể kháng TfR như mô tả trong bản mô tả này trong điều kiện cho phép sự gắn kết của kháng thể kháng TfR với TfR, và phát hiện xem có phức hợp tạo ra giữa kháng thể kháng TfR và TfR. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng TfR được sử dụng để chọn lọc các đối tượng thích hợp với liệu pháp kháng thể kháng TfR, ví dụ trong trường hợp TfR là chất đánh dấu sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Các rối loạn bệnh lý ví dụ có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế bao gồm các rối loạn bệnh lý liên quan đến hồng cầu chưa trưởng thành, do TfR được biểu hiện trong hồng cầu lưới và do đó có thể phát hiện bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể theo sáng chế. Các rối loạn bệnh lý này bao gồm chứng thiếu máu và các rối loạn bệnh lý phát sinh do lượng hồng cầu lưới giảm đi, hoặc chứng đa hồng cầu bẩm sinh hoặc chứng đa hồng cầu nguyên phát khối u, trong đó số lượng tế bào hồng cầu tăng lên do tăng sinh, ví dụ, hồng cầu lưới, dẫn đến máu bị đặc và các triệu chứng sinh lý kèm theo.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng TfR được đánh dấu. Các chất đánh dấu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đánh dấu hoặc gốc được phát hiện bằng cách trực tiếp (như các chất đánh dấu huỳnh quang, mang mầu, chất ngăn electron, hoá phát quang, và phóng xạ), cũng như các phần tử, như enzym hoặc phối tử, được phát hiện bằng cách gián tiếp, ví dụ, qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu phóng xạ bao gồm, nhưng không

giới hạn ở, các đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, và ^{131}I, các chất huỳnh quang như chelat đất hiếm hoặc fluorescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, các luceriferaza, ví dụ, luciferaza của đom đóm và luciferaza của vi khuẩn (Bằng sáng chế Mỹ số 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza củ cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, β-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, các oxidaza dị vòng như uricaza và xanthin oxidaza, được ngẫu hợp với enzym sử dụng hydro peroxit để oxy hoá tiền chất nhuộm màu như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, các chất đánh dấu spin, chất đánh dấu thực khuẩn thể, các gốc tự do bền, và các chất tương tự.

Theo một phương án, kháng thể nguyên vẹn không có chức năng hiệu ứng. Theo một phương án khác, kháng thể nguyên vẹn có chức năng hiệu ứng giảm đi. Theo một phương án khác, kháng thể nguyên vẹn được chế tạo có chức năng hiệu ứng giảm đi. Theo một khía cạnh, kháng thể này là Fab. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này có một hoặc nhiều đột biến Fc giảm thiểu hoặc loại bỏ chức năng hiệu ứng. Theo một khía cạnh khác, kháng thể này có sự glycosyl hoá được cải biến, ví dụ, do sản xuất kháng thể này trong hệ không có các enzym glycosyl hoá thông thường của người. Theo một khía cạnh khác, khung Ig được cải biến để không có chức năng hiệu ứng hoặc có chức năng hiệu ứng hạn chế một cách tự nhiên.

Nhiều kỹ thuật là sẵn có để xác định gắn kết của kháng thể với TfR. Một thử nghiệm là ELISA để xác nhận khả năng gắn kết với TfR của người (và kháng nguyên não). Theo thử nghiệm này, các đĩa được phủ bằng kháng nguyên (ví dụ TfR tái tổ hợp) được ủ với mẫu bao gồm kháng thể kháng TfR và xác định gắn kết kháng thể với kháng nguyên quan tâm.

Các thử nghiệm để đánh giá hấp thu của kháng thể đã sử dụng theo đường toàn thân và hoạt tính sinh học của kháng thể có thể được tiến hành như đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế hoặc như đã biết đối với kháng thể kháng kháng nguyên CNS quan tâm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để nhận biết các kháng thể kháng TfR được tiếp hợp (theo cách cộng hoá trị hoặc không phải cộng hoá trị) với các kháng thể kháng BACE1 có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm,

ví dụ, ức chế hoạt tính BACE1 aspartyl proteaza. Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể có hoạt tính sinh học này *in vivo* và/hoặc *in vitro*, ví dụ như được đánh giá bằng thử nghiệm huỳnh quang phân giải theo thời gian đồng nhất (HTRF) hoặc thử nghiệm điện di mao quản vi lỏng (MCE) bằng cách sử dụng các peptit cơ chất tổng hợp, hoặc *in vivo* trong các dòng tế bào biểu hiện các chất BACE1 như APP.

F. Dược phẩm

Các dược phẩm chứa kháng TfR như được mô tả trong bản mô tả này được bào chế bằng cách trộn kháng thể kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với một hoặc nhiều chất mang dược dụng chất mang, tá dược, chất làm ổn định dược dụng tuỳ ý (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước. Chất mang tá dược, chất làm ổn định dược dụng nói chung không độc với người nhận ở các liều dùng và nồng độ sử dụng, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexamethonium clorua; benzalkonium clorua; benzethonium clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (< 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme thân nước như polyvinylpyrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và hyđrat cacbon khác bao gồm glucoza, manoza, hoặc dextrin; các chất tạo chelat như EDTA; các đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối ứng tạo muối như natri; các phức kim loại (ví dụ, các phức hợp Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng trong bản mô tả này ví dụ còn bao gồm các chất phân tán thuốc kẽ tế bào như các glycoprotein hyaluronidaza hoạt tính-trung tính hoà tan (sHASEGP), ví dụ, glycoprotein hyaluronidaza PH-20 hoà tan của người, như rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Các sHASEGP và phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, ví dụ được mô tả trong các Công bố đơn sáng chế của Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Các chế phẩm kháng thể đông khô ví dụ được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,267,958. Các chế phẩm kháng thể nước bao gồm các chế phẩm được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,171,586 và WO2006/044908, chế phẩm của công bố đơn này bao gồm dịch đệm histidin-axetat.

Chế phẩm trong bản mô tả này cũng có thể chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính nếu cần thiết cho một chỉ định cụ thể đang điều trị, tốt hơn là các thành phần hoạt tính bổ trợ không gây ảnh hưởng bất lợi lẫn nhau. Ví dụ, có thể mong muốn cung cấp một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính khác nữa để điều trị rối loạn bệnh lý thần kinh, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh lý ở mắt, rối loạn động kinh, bệnh ứ đọng ty lạp thể, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh do virut hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi hoặc viêm nhiễm CNS. Các thuốc ví dụ này được đề cập dưới đây. Các thành phần hoạt tính này là thích hợp có mặt với lượng kết hợp hữu hiệu cho mục đích dự định.

Các thành phần hoạt tính có thể được bẫy trong các vi nang được bào chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật đồng ngưng tụ hoặc polyme hoá tại bề mặt, ví dụ, các vi nang-hydroxymetylxenluloza hoặc –gelatin và vi nang poly-(metylmetaxylat), tương ứng trong hệ vận chuyển thuốc dạng keo (ví dụ, các liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, các hạt kích cỡ nano và nang kích cỡ nano) hoặc trong các nhũ tương macro. Các kỹ thuật ngày được mô tả trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Một hoặc nhiều thành phần hoạt tính có thể đóng trong các liposom mà được ngẫu hợp với các kháng thể kháng TfR được mô tả trong bản mô tả này (xem ví dụ, Công bố Đơn sáng chế Mỹ số 20020025313).

Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Các chế phẩm giải phóng kéo dài ví dụ thích hợp bao gồm các chất nền bán thấm bằng các polyme kỵ nước dạng rắn có chứa kháng thể, các chất nền này ở dạng vật thể có hình dạng, ví dụ, các màng, hoặc vi nang. Các ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế về các chất nền giải phóng kéo dài bao gồm các polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-metacrylat), hoặc poly(rượu vinyl)), các polylactit (Bằng sáng chế Mỹ số 3,773,919), các đồng polyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, các etylen-vinyl axetat không phân huỷ, các đồng polyme của axit lactic-axit glycolic phân huỷ được như LUPRON DEPOT™ (vi cầu để tiêm gồm có đồng polyme của axit lactic-axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Các chế phẩm để sử dụng *in vivo* nói chung là vô khuẩn. Có thể đạt được độ vô khuẩn, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô khuẩn.

G. Chế phẩm và phương pháp điều trị

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TfR được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR để sử dụng làm thuốc. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp vận chuyển hợp chất trị liệu đi qua hàng rào máu-não có tác động lên quần thể tế bào hồng cầu giảm đi hoặc bị loại bỏ, bao gồm cho kháng thể kháng TfR được ngẫu hợp với hợp chất trị liệu (ví dụ kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết cả TfR và kháng nguyên não) tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất trị liệu được ngẫu hợp với nó đi qua BBB. Trong một ví dụ khác, sáng chế đề xuất phương pháp vận chuyển thuốc rối loạn thần kinh đi qua hàng rào máu-não bao gồm việc cho kháng thể kháng TfR theo sáng chế được ngẫu hợp với thuốc rối loạn bệnh lý não (ví dụ, kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết cả TfR và kháng nguyên não) tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển thuốc rối loạn thần kinh được ngẫu hợp với nó đi qua BBB với tác động lên quần thể tế bào hồng cầu giảm đi hoặc bị loại bỏ. Theo một phương án, BBB là ở động vật có vú (ví dụ con người), ví dụ, người có rối loạn thần kinh, bao gồm, nhưng không giới hạn ở: bệnh Alzheimer (AD), bệnh đột quỵ, bệnh mất trí nhớ, bệnh teo cơ (MD), đa xơ cứng (MS), bệnh xơ cứng teo cơ cột bên (ALS), xơ nang, hội chứng Angelman, hội chứng Liddle, bệnh Parkinson, bệnh Pick, bệnh Paget, bệnh ung thư, tổn thương não do chấn thương, v.v..

Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ: bệnh thần kinh, chứng thoái hoá dạng tinh bột, bệnh ung thư (ví dụ, liên quan đến CNS hoặc não), bệnh hoặc rối loạn bệnh lý ở mắt, bệnh nhiễm virut hoặc vi khuẩn, bệnh viêm nhiễm (ví dụ của CNS hoặc não), chứng thiếu máu cục bộ, bệnh thoái hoá thần kinh, bệnh động kinh, rối loạn hành vi, bệnh ứ đọng ty lạp thể, v.v. Các kháng thể theo sáng chế là đặc biệt thích hợp để điều trị các rối loạn thần kinh này do khả năng vận chuyển một hoặc nhiều thành phần hoạt tính được liên hợp/hợp chất trị liệu được ngẫu hợp của nó đi qua BBB và vào CNS/não nơi tìm thấy căn nguyên phân tử, tế bào hoặc virut/vi khuẩn của các rối loạn bệnh lý này.

Các rối loạn bệnh lý thần kinh là các bệnh hoặc bất thường của hệ thần kinh đặc trưng ở chỗ truyền tín hiệu thần kinh không thích hợp hoặc không được kiểm soát hoặc không có sự truyền tín hiệu thần kinh, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cơn đau mãn tính (kể cả đau do cảm thụ đau), cơn đau do tổn thương mô thực thể, kể cả đau liên quan đến bệnh ung thư, cơn đau bệnh lý thần kinh (đau do bất thường ở dây thần kinh, tuỷ sống, hoặc não), và cơn đau do nguyên nhân tâm lý (có liên quan hoàn toàn hoặc phần lớn đến rối loạn bệnh lý tâm lý), đau đầu, đau nửa đầu, bệnh thần kinh, và các triệu chứng và các hội chứng thường đi kèm các rối loạn bệnh lý thần kinh này như chóng mặt hoặc buồn nôn.

Cho rối loạn bệnh lý thần kinh, thuốc thần kinh có thể được chọn là thuốc giảm đau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giảm đau gây nghiện/opioid (có nghĩa là, morphin, fentanyl, hydrocodon, meperidin, methadon, oxymorphon, pentazoxin, propoxyphen, tramadol, codein và oxycodon), thuốc chống viêm phi steroit (NSAID) (có nghĩa là, ibuprofen, naproxen, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, flurbiprofen, indomethacin, ketorolac, mefenamic axit, meloxicam, nabumeton, oxaprozin, piroxicam, sulindac, và tolmetin), corticosteroit (có nghĩa là, cortison, prednison, prednisolon, dexamethason, metylprednisolon và triamxinolon), chất chống đau nửa đầu (có nghĩa là, sumatriptin, almotriptan, frovatriptan, sumatriptan, rizatriptan, eletriptan, zolmitriptan, dihydroergotamin, eletriptan và ergotamin), acetaminophen, salixylat (có nghĩa là, aspirin, cholin salixylat, magie salixylat, diflunisal, và salsalat), chống động kinh (có nghĩa là, carbamazepin, clonazepam, gabapentin, lamotrigin, pregabalin, tiagabin, và topiramat), thuốc gây mê (có nghĩa là, isofluran, tricloetylen, halothan, sevofluran, benzocain, cloprocain, cocain, xyclomethycain, dimethocain, propoxycain, procain, novocain, proparacain, tetracain, articain, bupivacain, carticain, cinchocain, etidocain, levobupivacain, lidocain, mepivacain, piperocain, prilocain, ropivacain, trimecain, saxitoxin và tetrodotoxin), và chất ức chế-cox-2 (có nghĩa là, celecoxib, rofecoxib, và valdecoxib). Cho rối loạn bệnh lý thần kinh kèm theo chóng mặt, thuốc thần kinh có thể được chọn là thuốc chống chóng mặt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, meclizin, diphenhydramin, promethazin và diazepam. Cho rối loạn bệnh lý thần kinh kèm theo buồn nôn, thuốc thần kinh có thể được chọn là thuốc chống nôn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, promethazin, clopromazin, procloperazin, trimethobenzamit, và metoclopramit.

Chứng thoái hoá dạng tinh bột là nhóm các bệnh và rối loạn bệnh lý kết hợp với sự lắng đọng chất protein ngoại bào trong CNS, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chứng thoái hoá dạng tinh bột thứ phát, chứng thoái hoá dạng tinh bột do tuổi tác, bệnh Alzheimer (AD), chứng thiểu năng nhận thức nhẹ (MCI), chứng mất trí nhớ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền kèm theo chứng thoái hoá dạng tinh bột (thể Dutch); phức hợp bệnh Guam Parkinson-bệnh mất trí nhớ, bệnh mạch máu amyloit não, bệnh Huntington, chứng liệt trên nhân tiến triển, bệnh đa xơ cứng; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, bệnh não xốp truyền nhiễm, chứng mất trí nhớ có liên quan đến HIV, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh viêm cơ thể vùi (IBM), và bệnh ở mắt liên quan đến lắng đọng beta-amyloit (có nghĩa là, thoái hoá điểm vàng, bệnh thần kinh nhãn khoa có liên quan đến điểm vàng, và đục thuỷ tinh thể).

Cho chứng thoái hoá dạng tinh bột, thuốc thần kinh có thể được chọn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác (bao gồm, nhưng không giới hạn ở phân tử nhỏ, peptit, aptame, hoặc chất gắn kết protein khác) mà gắn kết đặc hiệu với đích được chọn từ: beta secretaza, tau, presenilin, protein tiền chất amyloit hoặc các phần của chúng, amyloit beta peptit hoặc các oligome hoặc dạng sợi của nó, thụ thể chết 6 (DR6), thụ thể cho các sản phẩm glycat hoá bền vững (RAGE), parkin, và huntingtin; chất ức chế cholinesteraza (có nghĩa là, galantamin, donepezil, rivastigmin và tacrin); chất đối kháng thụ thể NMDA (có nghĩa là, memantin), chất gây suy kiệt monoamin (có nghĩa là, tetrabenazin); ergoloit mesylat; chất chống parkinson chống tiết cholin (có nghĩa là, procyclidin, diphenhydramin, trihexylphenidyl, benztropin, biperiden và trihexyphenidyl); chất chống parkinson kiểu dopamin (có nghĩa là, entacapon, selegilin, pramipexol, bromocriptin, rotigotin, selegilin, ropinirol, rasagilin, apomorphin, carbidopa, levodopa, pergolit, tolcapon và amantadin); tetrabenazin; thuốc chống viêm (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chống viêm phi steroit (có nghĩa là, indomethicin và các hợp chất nêu trên); hormon (có nghĩa là, estrogen, progesteron và leuprolit); vitamin (có nghĩa là, folat và nicotinamit); dimebolin; homotaurin (có nghĩa là, axit 3-aminopropansulfonic; 3APS); chất điều biến hoạt tính thụ thể serotonin (có nghĩa là, xaliproden); intơferon, và glucocorticoit.

Các bệnh ung thư của CNS đặc trưng ở chỗ tăng sinh bất thường một hoặc nhiều tế bào CNS (có nghĩa là, tế bào nơron) và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, u

thần kinh đệm, u nguyên bào đệm đa dạng, u màng não, u bào hình sao, u dây thần kinh thính giác, u sụn, u thần kinh đệm tế bào thần kinh đệm ít gai, u nguyên bào tuỷ, thần kinh đệm hạch, khối u tế bào Schwann, u xơ thần kinh, u nguyên bào thần kinh, và các khối u ngoài màng ứng, trong tuỷ hoặc trong màng cứng.

Cho bệnh ung thư, thuốc thần kinh có thể được chọn là chất hoá trị liệu. Các ví dụ về chất hoá trị liệu bao gồm các chất alkyl hoá như thiotepa và CYTOXAN® xyclosphosphamit; alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; các aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; các etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenthiophospho-amit và trimetylolomelamin; các axetogenin (đặc biệt là bullatacin và bullatacinon); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachon; lapachol; các colchixin; axit betulinic; camptothexin (kể cả chất đồng đẳng tổng hợp topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), axetylcamptothexin, scopolectin, và 9-aminocamptothexin); bryostatin; callystatin; CC-1065 (bao gồm các chất đồng đẳng tổng hợp của nó adozelesin, carzelesin và bizelesin); podophyllotoxin; axit podophyllinic; teniposit; các cryptophyin (cụ thể là cryptophycin 1 và cryptophycin 8); dolastatin; duocarmyxin (kể cả chất đồng đẳng tổng hợp, KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; các dẫn chất mù tạc nitơ như chlorambucil, chlornaphazin, clophosphamit, estramustin, ifosfamit, mecloetamin, mecloetamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamit, dẫn chất mù tạc uracil; các nitrosoure như carmustin, chlorozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranimnustin; các kháng sinh như các kháng sinh enediyn (ví dụ, calicheamixin, đặc biệt là calicheamixin gamma1I và calicheamixin omegaI1 (xem, ví dụ, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994) của Agnew); dynemixin, kể cả dynemixin A; esperamixin; cũng như chất mang màu neocarzinostatin và các chất mang màu kháng sinh chromoprotein enediyn cùng họ), các aclaxinomysin, actinomyxin, authramyxin, azaserin, bleomyxin, cactinomyxin, carabixin, carminomyxin, carzinophilin, chromomyxinis, dactinomyxin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norlœxin, ADRIAMYCIN® doxorubixin (kể cả morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrolino-doxorubixin và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomyxin, các mitomyxin như mitomyxin C, axit mycophenolic,

nogalamyxin, các olivomyxin, peplomyxin, potfiromyxin, puromyxin, quelamyxin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tuberxidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các thuốc chống chuyển hoá như metotrexat và 5-flouraxil (5-FU); các chất đồng đẳng axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất đồng đẳng purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất đồng đẳng pyrimidin như anxitabin, azaxitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enoxitabin, floxuridin; các androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; các thuốc kháng hormon vỏ thượng thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; các thuốc bổ sung axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziquon; elfornithin; elliptinium axetat; epothilon; etogluxit; gallium nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidainin; các maytansinoit như maytansin và ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; 2-etylhydrazit; procarbazin; phức hợp polysacarit PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2"-triclotrietylamin; trichothexen (đặc biệt là độc tố T-2, verracurin A, roridin A và anguidin); urethan; vindesin (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazin; mannomustin mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); thiotepa; các taxoit, ví dụ, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM không chứa Cremophor, chế phẩm hạt nano được xử lý albumin của paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), và TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chloranbuxil; gemxitabin (GEMZAR®); 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; chất đồng đẳng platin như xisplatin và carboplatin; vinblastin (VELBAN®); platin; etoposit (VP-16); ifosfamit; mitoxantron; vincristin (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovovin; vinorelbin (NAVELBINE®); novantron; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; ibandronat; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); các retinoit như axit retinoic; capexitabin (XELODA®); các muối, axit hoặc dẫn xuất dược dụng của chất bất kỳ nêu trên; cũng như dạng kết hợp hai hoặc nhiều chất nêu trên như CHOP, là chữ viết tắt cho liệu pháp kết hợp của xyclophosphamit,

doxorubixin, vincristin, và prednisolon, và FOLFOX, chữ viết tắt cho liệu pháp điều trị bằng oxaliplatin (ELOXATINTM) kết hợp với 5-FU và leucovovin.

Cũng bao gồm trong định nghĩa về chất hoá trị liệu là các chất kháng hormon có tác dụng điều tiết, giảm thiểu, phong bế hoặc ức chế các tác dụng của các hormon có thể thúc đẩy sự phát triển bệnh ung thư, và thường ở dạng điều trị toàn thân. Có thể là bản thân các hormon. Các ví dụ bao gồm các kháng estrogen và các chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM), kể cả, ví dụ, tamoxifen (kể cả NOLVADEX® tamoxifen), EVISTA® raloxifene, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và FARESTON® toremifen; các chất kháng progesteron; các chất điều tiết giảm thụ thể estrogen (ERDs); các chất hoạt động ức chế hoặc làm buồng trứng không hoạt động, ví dụ, các chất chủ vận hormon kích thích giải phóng hormon tạo hoàng thể (LHRH) như LUPRON® và ELIGARD® leuprolit axetat, goserelin axetat, buserelin axetat và tripterelin; các chất kháng-androgen khác như flutamit, nilutamit và bicalutamit; và các chất ức chế aromataza, điều tiết sản xuất estrogen trong tuyến thượng thận, như, ví dụ, các 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, MEGASE® megestrol axetat, AROMASIN® exemestan, formestani, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, và ARIMIDEX® anastrozol. Ngoài ra, định nghĩa này về chất hoá trị liệu bao gồm các bisphosphonat như clodronat (ví dụ, BONEFOS® hoặc OSTAC®), DIDROCAL® etidronat, NE-58095, ZOMETA® axit zoledronic/zoledronat, FOSAMAX® alendronat, AREDIA® pamidronat, SKELID® tiludronat, hoặc ACTONEL® risedronat; cũng như troxaxitabin (chất đồng đẳng 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); các oligonucleotit không cảm, cụ thể là các oligonucleotit ức chế biểu hiện các gen trong các con đường truyền tín hiệu có vai trò trong tăng sinh tế bào bất thường, như, ví dụ, PKC-alpha, Raf, H-Ras, và thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF-R); các vacxin như vacxin THERATOPE® và các vacxin liệu pháp gen, ví dụ, vacxin ALLOVECTIN®, vacxin LEUVECTIN®, và vacxin VAXID®; chất ức chế topoisomeraza LURTOTECAN® 1; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosylat (chất ức chế phân tử nhỏ tyrosin kinaza kép ErbB-2 và EGFR còn gọi là GW572016); và các muối, axit hoặc dẫn xuất dược dụng của chất bất kỳ trong số các chất nêu trên.

Một nhóm các hợp chất có thể được lựa chọn làm các thuốc thần kinh cho điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư là các globulin miễn dịch chống ung thư (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab, alemtuxumab,

cetuximab, gemtuzumab ozogamixin, ibritumomab tiuxetan, panitumumab và rituximab). Trong một vài trường hợp, các kháng thể kết hợp với chất đánh dấu hoặc chất tiếp hợp độc tính có thể được sử dụng để hướng đích và giết chết các tế bào mong muốn (có nghĩa là, các tế bào ung thư), bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tositumomab với chất đánh dấu phóng xạ ^{131}I, hoặc trastuzumab emtansin.

Các bệnh hoặc rối loạn bệnh lý ở mắt là các bệnh hoặc rối loạn bệnh lý của mắt, cho mục đích của bản mô tả này được xem là một cơ quan của CNS bị cô lập bởi BBB. Các bệnh hoặc rối loạn bệnh lý ở mắt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn bệnh lý của củng mạc, giác mạc, mống mắt và thể mi (có nghĩa là, viêm củng mạc, viêm kết mạc, loét giác mạc, giác mạc mài mòn, mù chói tuyết, bỏng do tia tử ngoại phát ra từ cung hàn điện, thương tổn nông dạng chấm của giác mạc Thygeson, tạo mạch mới giác mạc, loạn dưỡng Fuchs, giác mạc hình chóp, chứng viêm khô kết mạc, viêm mống mắt và viêm màng mạch nho), các rối loạn bệnh lý của thấu kính mắt (có nghĩa là, đục thuỷ tinh thể), các rối loạn bệnh lý của màng mạch và võng mạc (có nghĩa là, bong võng mạc, bong u nang võng mạc bẩm sinh, bệnh võng mạc do cao huyết áp, bệnh võng mạc tiểu đường, bệnh võng mạc, bệnh võng mạc do thoái hoá điểm vàng sớm, thoái hoá điểm vàng liên quan đến tuổi tác, thoái hoá điểm vàng (ướt hoặc khô), màng trên võng mạc, viêm võng mạc sắc tố và phù điểm vàng), chứng tăng nhãn áp, bệnh ruồi bay trước mắt, các rối loạn bệnh lý của dây thần kinh thị giác và các con đường thị giác (có nghĩa là, bệnh thần kinh thị giác di truyền Leber và lắng đọng protein đĩa thị giác), các rối loạn bệnh lý do điều tiết vận động/khúc xạ hai bên/cơ mắt (có nghĩa là, tật lác mắt, chứng liệt cơ mắt, liệt vận nhãn tiến triển, lác trong, lé ngoài, chứng viễn thị, chứng cận thị, chứng loạn thị, tật khúc xạ hai mắt không đều, chứng lão thị và chứng liệt vận nhãn), rối loạn thị lực và mù (có nghĩa là, chứng giảm thị lực, chứng thông manh bẩm sinh Lever, ám điểm, mù màu, chứng mù màu sắc, chứng quáng gà, mù, bệnh mù sông và chứng mắt nhỏ/tật khuyết của mắt), mắt đỏ, đồng tử Argyll Robertson, bệnh nấm giác mạc, bệnh khô mắt và tật không mống mắt.

Cho bệnh hoặc rối loạn bệnh lý ở mắt, thuốc thần kinh có thể được chọn là các chất nhãn khoa chống tạo mạch (có nghĩa là, bevacizumab, ranibizumab và pegaptanib), chất cho chứng tăng nhãn áp (có nghĩa là, carbachol, epinephrin, demecarium bromua, apraclonidin, brimonidin, brinzolamit, levobunolol, timolol,

betaxolol, dorzolamit, bimatoprost, carteolol, metipranolol, dipivefrin, travoprost và latanoprost), chất ức chế cacbon anhydraza (có nghĩa là, methazolamit và acetazolamit), thuốc kháng histamin nhãn khoa (có nghĩa là, naphazolin, phenylephrin và tetrahydrozolin), chất làm trơn nhãn khoa, steroit nhãn khoa (có nghĩa là, flometholon, prednisolon, loteprednol, dexamethason, difluprednat, rimexolon, floxinolon, medryson và triamxinolon), thuốc gây tê nhãn khoa (có nghĩa là, lidocain, proparacain và tetracain), thuốc chống nhiễm khuẩn nhãn khoa (có nghĩa là, levofloxaxin, gatifloxaxin, xiprofloxaxin, moxifloxaxin, cloramphenicol, bacitraxin/polymyxin b, sulfaxetamit, tobramyxin, azithromyxin, besifloxaxin, norfloxaxin, sulfisoxazol, gentamixin, idoxuridin, erythromyxin, natamyxin, gramixidin, neomyxin, ofloxaxin, trifluridin, ganxiclovir, vidarabin), thuốc chống viêm nhiễm nhãn khoa (có nghĩa là, nepafenac, ketorolac, flurbiprofen, suprofen, xyclosporin, triamxinolon, diclofenac và bromfenac), và thuốc kháng histamin hoặc chống phù nề nhãn khoa (có nghĩa là, ketotifen, olopatadin, epinastin, naphazolin, cromolyn, tetrahydrozolin, pemirolast, bepotastin, naphazolin, phenylephrin, nedocromil, lodoxamit, phenylephrin, emedastin và azelastin).

Bệnh nhiễm virut hoặc vi khuẩn của CNS bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhiễm virut (có nghĩa là, cúm, HIV, virut bại liệt, rubella), vi khuẩn (có nghĩa là, Neisseria sp., Streptococcus sp., Pseudomonas sp., Proteus sp., E. coli, S. aureus, Pneumococcus sp., Meningococcus sp., Haemophilus sp., và Mycobacterium tuberculosis) và các vi sinh vật khác như nấm (có nghĩa là, nấm men, Cryptococcus neoformans), ký sinh trùng (có nghĩa là, toxoplasma gondii) hoặc amip dẫn đến bệnh lý ở CNS bao gồm, nhưng không giới hạn ở, viêm màng não, viêm não, viêm tuỷ sống, viêm mạch và áp-xe, có thể cấp tính hoặc mãn tính.

Cho bệnh do virut hoặc vi khuẩn, thuốc thần kinh có thể được chọn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hợp chất kháng virut (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất kháng virut adamantan (có nghĩa là, rimantadin và amantadin), interferon kháng virut (có nghĩa là, peginterferon alfa-2b), chất đối kháng thụ thể chemokin (có nghĩa là, maraviroc), chất ức chế chuyển sợi integraza (có nghĩa là, raltegravir), chất ức chế neuraminidaza (có nghĩa là, oseltamivir và zanamivir), chất ức chế enzym phiên mã ngược phi nucleosit (có nghĩa là, efavirenz, etravirin, delavirdin và nevirapin), chất ức chế enzym phiên mã ngược nucleosit (tenofovir, abacavir, lamivudin, zidovudin,

stavudin, entecavir, emtricitabin, adefovir, zalcitabin, telbivudin và didanosin), chất ức chế proteaza (có nghĩa là, darunavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir và saquinavir), purin nucleosit (có nghĩa là, valaxyclovir, famxiclovir, axyclovir, ribavirin, ganxiclovir, valganxiclovir và xidofovir), và chất kháng virut các loại (có nghĩa là, enfuvirtit, foscarnet, palivizumab và fomivirsen)), kháng sinh (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, aminopenixilin (có nghĩa là, amoxixillin, ampixillin, oxaxillin, nafxillin, cloxaxillin, dicloxaxillin, flucoxaxillin, temoxillin, azloxillin, carbenixillin, ticarxillin, mezloxillin, piperaxillin và bacampixillin), cephalosporin (có nghĩa là, cefazolin, cephalexin, cephalothin, cefamandol, ceftriaxon, cefotaxim, cefpodoxim, ceftazidim, cefadroxil, cephradin, loracarbef, cefotetan, cefuroxim, cefprozil, cefaclor, và cefoxitin), carbapenem/penem (có nghĩa là, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem và doripenem), monobactam (có nghĩa là, aztreonam, tigemonam, norcardixin A và tabtoxinin-beta-lactam, chất ức chế beta-lactamaza (có nghĩa là, axit clavulanic, tazobactam và sulbactam) kết hợp với kháng sinh beta-lactam khác, aminoglycosit (có nghĩa là, amikaxin, gentamixin, kanamyxin, neomyxin, netilmixin, streptomyxin, tobramyxin, và paromomyxin), ansamyxin (có nghĩa là, geldanamyxin và herbimyxin), carbacephem (có nghĩa là, loracarbef), glycopeptit (có nghĩa là, teicoplanin và vancomyxin), macrolit (có nghĩa là, azithromyxin, clarithromyixn, dirithromyxin, erythromyxin, roxithromyxin, troleandomyxin, telithromyxin và spectinomyxin), monobactam (có nghĩa là, aztreonam), quinolon (có nghĩa là, xiprofloxaxin, enoxaxin, gatifloxaxin, levofloxaxin, lomefloxaxin, moxifloxaxin, norfloxaxin, ofloxaxin, trovafloxaxin, grepafloxaxin, sparfloxaxin và temafloxaxin), sulfonamit (có nghĩa là, mafenit, sulfonamidochrysoidin, sulfaxetamit, sulfadiazin, sulfamethizol, sulfanilamit, sulfasalazin, sulfisoxazol, trimethoprim, trimethoprim và sulfamethoxazol), tetraxyclin (có nghĩa là, tetraxyclin, demecloxyclin, doxyxyclin, minoxyclin và oxytetraxyclin), chất chống ung thư hoặc kháng sinh độc tế bào (có nghĩa là, doxorubixin, mitoxantron, bleomyxin, daunorubixin, dactinomyxin, epirubixin, idarubixin, plicamyxin, mitomyxin, pentostatin và valrubixin) và hợp chất kháng khuẩn (có nghĩa là, baxitraxin, colistin và polymyxin B)), kháng nấm (có nghĩa là, metronidazol, nitazoxanit, tinidazol, cloroquin, iodoquinol và paromomyxin), và thuốc chống ký sinh trùng (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, quinin, cloquin, amodiaquin, pyrimethamin,

sulphadoxin, proguanil, mefloquin, atovaquon, primaquin, artemesinin, halofantrin, doxyxyclin, clindamyxin, mebendazol, pyrantel pamoat, thiabendazol, dietylcarbamazin, ivermectin, rifampin, amphotericin B, melarsoprol, efornithin và albendazol).

Bệnh viêm nhiễm của CNS bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh viêm nhiễm do tổn thương CNS, có thể tổn thương thực thể (có nghĩa là, do tai nạn, phẫu thuật, chấn thương não, tổn thương tuỷ sống, chấn động não) và tổn thương hoặc có liên quan đến một hoặc nhiều bệnh hoặc rối loạn bệnh lý khác của CNS (có nghĩa là, áp-xe, bệnh ung thư, bệnh nhiễm virut hoặc vi khuẩn).

Cho viêm nhiễm CNS, thuốc thần kinh có thể được chọn nhằm điều trị bản thân bệnh viêm nhiễm (có nghĩa là, chất chống viêm phi-steroit như ibuprofen hoặc naproxen), hoặc điều trị nguyên nhân căn bản của bệnh viêm nhiễm (có nghĩa là, chất kháng virut hoặc chống ung thư).

Chứng thiếu máu cục bộ của CNS, như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ nhóm các rối loạn bệnh lý liên quan đến lưu lượng máu bất thường hoặc biểu hiện mạch máu bất thường ở não hoặc các nguyên nhân gây bệnh, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chứng thiếu máu cục bộ não khu trú, chứng thiếu máu cục bộ não tổng thể, bệnh đột quỵ (có nghĩa là, xuất huyết dưới màng nhện và xuất huyết trong não), và chứng phình mạch.

Cho chứng thiếu máu cục bộ, thuốc thần kinh có thể được chọn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc làm tan huyết khối (có nghĩa là, urokinaza, alteplaza, reteplaza và tenecteplaza), thuốc ức chế kết tập tiểu cầu (có nghĩa là, aspirin, xilostazol, clopidogrel, prasugrel và dipyridamol), statin (có nghĩa là, lovastatin, pravastatin, fluvastatin, rosuvastatin, atorvastatin, simvastatin, cerivastatin và pitavastatin), và hợp chất cải thiện lưu lượng máu hoặc độ linh hoạt của mạch máu, kể cả, ví dụ, thuốc cao huyết áp.

Bệnh thoái hoá thần kinh là nhóm các bệnh và rối loạn bệnh lý kèm theo mất chức năng tế bào nơron hoặc chết tế bào trong CNS, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: bệnh loạn dưỡng não chất trắng thượng thận, bệnh Alexander, bệnh Alper, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, chứng giãn mao mạch mất điều hoà, bệnh Batten, hội chứng Cockayne, chứng thoái hoá nền vỏ não, chứng thoái hoá do nguyên nhân hoặc kèm

theo chứng thoái hoá dạng tinh bột, chứng mất điều hoà Friedreich, chứng thoái hoá thuỳ trán thái dương, bệnh Kennedy, bệnh teo đa hệ thống, bệnh đa xơ cứng, bệnh xơ cứng một bên nguyên phát, chứng liệt trên nhân tiến triển, bệnh teo cơ cột sống, bệnh viêm tuỷ ngang, bệnh Refsum, và chứng mất điều hoà cột sống tiểu não.

Đối với bệnh thoái hoá thần kinh, thuốc thần kinh có thể được chọn là hormon tăng trưởng hoặc yếu tố dinh dưỡng thần kinh; các ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc não (BDNF), yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF), neurotrophin-4/5, yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF)-2 và các FGF khác, neurotrophin (NT)-3, erythropoietin (EPO), yếu tố tăng trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF), yếu tố tăng trưởng chuyển dạng (TGF)-alpha, TGF-beta, yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF), chất đối kháng thụ thể intơlơkin-1 (IL-1ra), yếu tố dinh dưỡng thần kinh lông tiết (CNTF), yếu tố dinh dưỡng thần kinh nguồn gốc-thần kinh đệm (GDNF), neurturin, yếu tố tăng trưởng nguồn gốc-tiểu cầu (PDGF), heregulin, neuregulin, artemin, persephin, các intơlơkin, yếu tố dinh dưỡng thần kinh nguồn gốc tế bào thần kinh đệm (GFR), yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt (CSF), CSF- bạch cầu hạt-đại thực bào, các netrin, cardiotrophin-1, các yếu tố hedgehog, yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (LIF), midkin, pleiotrophin, các protein tạo hình thể xương (các BMP), các netrin, các saposin, các semaphorin, và yếu tố tế bào gốc (SCF).

Các bệnh và rối loạn bệnh lý động kinh của CNS liên quan đến dẫn truyền điện không thích hợp và/hoặc bất thường trong CNS, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở chứng động kinh (có nghĩa là, các bệnh động kinh vắng ý thức, các bệnh động kinh mất trương lực, chứng động kinh Rolandic lành tính, các bệnh động kinh vắng ý thức khi còn nhỏ, động kinh co giật, các cơn động kinh bán phần phức tạp, động kinh thuỳ trán, động kinh do sốt cao, co thắt ở trẻ sơ sinh, động kinh rung giật cơ ở thiếu niên, động kinh vắng ý thức ở thiếu niên, hội chứng Lennox-Gastaut, hội chứng Landau-Kleffner, hội chứng Dravet, hội chứng Otahara, hội chứng West, động kinh rung giật cơ, các rối loạn bệnh lý ty thể, động kinh giật cơ tiến triển, động kinh căn nguyên tâm lý, động kinh phản xạ, hội chứng Rasmussen, bệnh động kinh bán phần đơn giản, bệnh động kinh toàn thể thứ phát, động kinh thuỳ thái dương, động kinh co cứng-giật, động kinh co cứng, động kinh tâm thần vận động, động kinh rìa não, động kinh khởi phát một phần, động kinh khởi phát toàn thể, trạng thái co giật, động kinh bụng, động kinh

bất động, động kinh tự động, rung giật cơ hai bên nặng, cơn động kinh tăng ở chu kỳ kinh nguyệt, cơn động kinh khuyụ, cơn động kinh cảm xúc, cơn động kinh cục bộ, động kinh thể cười, Jacksonian March, bệnh Lafora, bệnh động kinh vận động, bệnh động kinh đa ổ, bệnh động kinh về đêm, bệnh động kinh nhạy cảm ánh sáng, bệnh giả động kinh, bệnh động kinh cảm giác, bệnh động kinh tiềm ẩn, bệnh động kinh Sylvan, bệnh động kinh cai thuốc, và bệnh động kinh phản xạ của thị giác).

Cho rối loạn động kinh, thuốc thần kinh có thể được chọn là thuốc chống co giật hoặc chống động kinh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc chống co giật barbiturat (có nghĩa là, primidon, metharbital, mephobarbital, allobarbital, amobarbital, aprobarbital, alphenal, barbital, brallobarbital và phenobarbital), thuốc chống co giật benzodiazepin (có nghĩa là, diazepam, clonazepam, và lorazepam), thuốc chống co giật carbamat (có nghĩa là felbamat), thuốc chống co giật ức chế cacbonic anhydraza (có nghĩa là, axetazolamit, topiramat và zonisamit), thuốc chống co giật dibenzazepin (có nghĩa là, rufinamit, carbamazepin, và oxcarbazepin), thuốc chống co giật dẫn xuất axit béo (có nghĩa là, divalproex và axit valproic), các chất đồng đẳng axit gamma-aminobutyric (có nghĩa là, pregabalin, gabapentin và vigabatrin), thuốc ức chế tái hấp thụ axit gamma-aminobutyric (có nghĩa là, tiagabin), thuốc ức chế transaminaza axit gamma-aminobutyric (có nghĩa là, vigabatrin), thuốc chống co giật hydantoin (có nghĩa là phenytoin, ethotoin, fosphenytoin và mephenytoin), các thuốc chống co giật các loại (có nghĩa là, lacosamit và magie sulfat), các progestin (có nghĩa là, progesteron), các thuốc chống co giật oxazolidinedion (có nghĩa là, paramethadion và trimethadion), thuốc chống co giật pyrrolidin (có nghĩa là, levetiracetam), thuốc chống co giật sucxinimit (có nghĩa là, ethosuximit và methsuximit), thuốc chống co giật triazin (có nghĩa là, lamotrigin), và thuốc chống co giật ure (có nghĩa là, phenaxemit và pheneturit).

Các rối loạn hành vi là các rối loạn bệnh lý của CNS đặc trưng ở biểu hiện bất thường ở đối tượng bị tối loạn và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: rối loạn bệnh lý giấc ngủ (có nghĩa là, mất ngủ, tình trạng cận giấc ngủ, kinh sợ ban đêm, rối loạn nhịp sinh học, và cơn ngủ kịch phát), các rối loạn tâm trạng (có nghĩa là, bệnh trầm cảm, bệnh trầm cảm tự tử, chứng lo lắng, rối loạn tình cảm mãn tính, ám ảnh, cơn hoảng loạn, rối loạn ám ảnh cưỡng bức, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD), rối loạn giảm chú ý (ADD), hội chứng mệt mỏi mãn tính, chứng sợ khoảng rộng, rối loạn căng

thẳng hậu chấn thương tâm lý, rối loạn lưỡng cực), rối loạn ăn uống (có nghĩa là, chán ăn hoặc chứng ăn vô độ), bệnh loạn tâm thần, rối loạn hành vi phát triển (có nghĩa là, chứng tự kỷ, hội chứng Rett, hội chứng Aspberger), rối loạn tính cách và rối loạn tâm thần (có nghĩa là, bệnh tâm thần phân liệt, rối loạn hoang tưởng, và bệnh tương tự).

Đối với rối loạn hành vi, thuốc thần kinh có thể được chọn từ hợp chất điều chỉnh hành vi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc chống loạn thần mới (có nghĩa là, risperidon, olanzapin, apripiprazol, quetiapin, paliperidon, asenapin, clozapin, iloperidon và ziprasidon), thuốc chống loạn thần phenothiazin (có nghĩa là, procloperazin, clopromazine, fluphenazin, perphenazin, trifluoperazin, thioridazin và mesoridazin), thioxanthen (có nghĩa là, thiothixen), thuốc chống loạn thần các loại (có nghĩa là, pimozit, lithi, molindon, haloperidol và loxapin), thuốc ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc (có nghĩa là, citalopram, escitalopram, paroxetin, fluoxetin và sertralin), thuốc ức chế tái hấp thu serotonin-norepinephrin (có nghĩa là, duloxetin, venlafaxin, desvenlafaxin, thuốc chống trầm cảm ba vòng (có nghĩa là, doxepin, clomipramin, amoxapin, nortriptylin, amitriptylin, trimipramin, imipramin, protriptylin và desipramin), thuốc chống trầm cảm bốn vòng (có nghĩa là, mirtazapin và maprotilin), thuốc chống trầm cảm phenylpiperazin (có nghĩa là, trazodon và nefazodon), thuốc ức chế monoamin oxidaza (có nghĩa là, isocarboxazid, phenelzin, selegilin và tranylxypromin), benzodiazepin (có nghĩa là, alprazolam, estazolam, flurazeptam, clonazepam, lorazepam và diazepam), thuốc ức chế tái hấp thu norepinephrin-dopamin (có nghĩa là, bupropion), thuốc kích thích CNS (có nghĩa là, phentermin, dietylpropion, methamphetamin, dextroamphetamin, amphetamin, metylphenidat, dexmetylphenidat, lisdexamfetamin, modafinil, pemolin, phendimetrazin, benzphetamin, phendimetrazin, armodafinil, dietylpropion, cafein, atomoxetin, doxapram, và mazindol), thuốc gây ngủ/an thần/ bình thần (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, barbiturat (có nghĩa là, secobarbital, phenobarbital và mephobarbital), benzodiazepin (như nêu trên), và thuốc gây ngủ/an thần/ bình thần các loại (có nghĩa là diphenhydramin, natri oxybat, zaleplon, hydroxyzin, cloral hydrat, aolpidem, buspiron, doxepin, eszopiclon, ramelteon, meprobamat và ethclorvynol)), secretin (xem, ví dụ, *Autism* 9: 256-265 (2005) của Ratliff-Schaub et al.), peptit opioid (xem, ví dụ, *J. Neurochem.* 89:273-285 (2004) của Cowen et al.), và thuốc peptit thần kinh (xem, ví dụ, *Am. J. Physiol.* 289: E301-305 (2005) của Hethwa et al.).

Bệnh ứ đọng ty lạp thể là các rối loạn bệnh lý chuyển hoá, trong một vài trường hợp kèm theo các triệu chứng của CNS hoặc có các triệu chứng đặc trưng-CNS; các rối loạn bệnh lý này bao gồm, nhưng không giới hạn ở: bệnh Tay-Sachs, bệnh Gaucher, bệnh Fabry, hội chứng Hunter (typ I, II, III, IV, V, VI và VII), bệnh dự trữ glycogen, bệnh GM1-rối loạn dự trữ lipit do tích luỹ gangliosit, bệnh loạn dưỡng bạch cầu biến sắc, bệnh Farber, bệnh loạn dưỡng bạch cầu Canavan, và bệnh dạng sáp của tế bào thần kinh týp 1 và 2, bệnh Niemann-Pick, bệnh Pompe, và bệnh Krabbe.

Đối với bệnh ứ đọng ty lạp thể, thuốc thần kinh có thể được chọn là bản thân thuốc thần kinh hoặc thuốc bắt chước hoạt tính của enzym bị tổn thương gây bệnh. Các enzym tái tổ hợp ví dụ để điều trị bệnh ứ đọng ty lạp thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở các enzym nêu trong ví dụ, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0142141 (có nghĩa là, alpha-L-iduronidaza, iduronate-2-sulphataza, N-sulfataza, alpha-N-axetylglucosaminidaza, N-azetyl-galactosamin-6-sulfataza, beta-galactosidaza, arylsulphataza B, beta-glucuronidaza, axit alpha-glucosidaza, glucocerebrosidaza, alpha-galactosidaza A, hexosaminidaza A, axit sphingomyelinaza, beta-galactocerebrosidaza, beta-galactosidaza, arylsulfataza A, axit ceramidaza, aspartoacylaza, palmitoyl-protein thioesteraza 1 và tripeptidyl amino peptidaza 1).

Theo một phương án khác, các bệnh có liên quan đến hoặc nguyên nhân do tăng sản xuất hồng cầu không thích hợp, hoặc trong đó tăng sản xuất hồng cầu là một tác động của bệnh, có thể phòng ngừa hoặc điều trị bằng tác dụng gây suy kiệt hồng cầu lưới được nhận thấy trong bản mô tả này của các kháng thể kháng TfR vẫn giữ được ít nhất chức năng hiệu ứng một phần. Ví dụ, trong chứng đa hồng cầu nguyên phát bẩm sinh hoặc do khối u, sự tăng số lượng tế bào hồng cầu do tăng sinh, ví dụ, hồng cầu lưới, dẫn đến làm máu đặc lại và các triệu chứng sinh lý kèm theo (Clin. Lab. Haematol. (1996) Suppl. 1: 29-34 của d'Onofrio et al.). Sử dụng kháng thể kháng TfR theo sáng chế trong đó giữ lại ít nhất một phần chức năng hiệu ứng của kháng thể sẽ cho phép loại bỏ chọn lọc các hồng cầu lưới chưa trưởng thành mà không tác động đến vận chuyển transferrin bình thường vào CNS. Có thể điều chỉnh liều dùng của kháng thể sao cho có thể giảm thiểu các triệu chứng lâm sàng cấp tính (có nghĩa là, cho dùng ở liều rất thấp hoặc cách quãng xa), như đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để phát hiện rối loạn thần kinh trước khi khởi phát các triệu chứng và/hoặc đánh giá mức độ nghiêm

trọng hoặc thời gian mắc bệnh hoặc rối loạn bệnh lý. Theo một khía cạnh, kháng thể này cho phép phát hiện và/hoặc chụp hình rối loạn thần kinh, bao gồm chụp X quang, chụp cắt lớp, hoặc chụp cộng hưởng từ (MRI).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp theo sáng chế để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp để sử dụng trong điều trị bệnh hoặc rối loạn bệnh lý thần kinh (ví dụ, bệnh Alzheimer) mà không làm suy kiệt hồng cầu (nghĩa là, hồng cầu lưới). Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp được cải biến để sử dụng trong phương pháp điều trị như mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp được cải biến nhằm cải thiện tính an toàn của nó để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh hoặc rối loạn bệnh lý thần kinh bao gồm cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng TfR (tuỳ ý được ngẫu hợp với thuốc rối loạn thần kinh). Theo phương án này, phương pháp này còn bao gồm cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR được cải biến nhằm cải thiện tính an toàn của nó để sử dụng nhằm giảm thiểu hoặc ức chế tạo đám hoại tử amyloit ở bệnh nhân có nguy cơ hoặc mắc bệnh hoặc rối loạn bệnh lý thần kinh (ví dụ, bệnh Alzheimer). "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên tuỳ ý là con người. Theo các khía cạnh nhất định, kháng thể kháng TfR theo sáng chế để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế cải thiện hấp thu của thuốc rối loạn thần kinh mà nó được ngẫu hợp với.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng TfR ái lực thấp theo sáng chế để sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này là để điều trị bệnh hoặc rối loạn bệnh lý thần kinh. Theo một phương án khác, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn bệnh lý thần kinh bao gồm cho cá thể mắc bệnh hoặc rối loạn bệnh lý thần kinh sử dụng lượng hữu hiệu của thuốc. Theo phương án này, phương pháp này còn bao gồm cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Alzheimer. Theo một phương án, phương pháp bao gồm cho cá thể mắc bệnh Alzheimer dùng lượng hữu hiệu của kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế mà gắn kết cả BACE1 và TfR hoặc cả Abeta và TfR. Theo phương án này, phương pháp này còn

bao gồm cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể con người.

Các kháng thể kháng TfR theo sáng chế có thể được sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với các chất khác trong một liệu pháp. Ví dụ, kháng thể kháng TfR theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu bổ sung là chất trị liệu hữu hiệu để điều trị cùng một rối loạn thần kinh hoặc một rối loạn thần kinh khác với rối loạn thần kinh mà kháng thể kháng TfR được sử dụng để điều trị. Các chất trị liệu bổ sung ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các thuốc thần kinh nêu trên, các chất ức chế cholinesteraza (như donepezil, galantamin, rovastigmin, và tacrin), các chất đối kháng thụ thể NMDA (như memantin), các chất ức chế kết tụ peptit amyloit beta, các chất chống oxy hoá, các chất điều biến γ-secretaza, các chất bắt chước yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF) hoặc liệu pháp gen NGF, các chất chủ vận PPARγ, các chất ức chế HMS-CoA reductaza (các statin), các ampakin, các chất chẹn kênh canxi, các chất đối kháng thụ thể GABA, các chất ức chế kinaza enzym tổng hợp glycogen, globulin miễn dịch dùng qua tĩnh mạch, chất chủ vận thụ thể muscarin, chất điều biến thụ thể nicotin, chất gây miễn dịch peptit amyloit beta chủ động hoặc thụ động, các chất ức chế phosphodiesteraza, các chất đối kháng thụ thể serotonin và các kháng thể peptit kháng amyloit beta. Theo các phương án nhất định, ít nhất một chất trị liệu bổ sung được chọn theo khả năng làm giảm nhẹ một hoặc nhiều tác dụng phụ của thuốc thần kinh.

Như được lấy ví dụ trong bản mô tả này, các kháng thể kháng TfR có thể có các tác dụng phụ tác động bất lợi lên số lượng hồng cầu lưới ở một đối tượng được điều trị bằng kháng thể kháng TfR. Do đó, theo các phương án nhất định, ít nhất một chất trị liệu khác được chọn theo khả năng làm giảm nhẹ các tác dụng phụ bất lợi lên số lượng hồng cầu lưới này được sử dụng đồng thời với kháng thể kháng TfR theo sáng chế. Các ví dụ về các chất trị liệu này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất làm tăng dòng tế bào hồng cầu (có nghĩa là, hồng cầu lưới), các chất hỗ trợ tăng trưởng và phát triển hồng cầu (có nghĩa là, hồng cầu lưới), và các chất bảo vệ dòng tế bào hồng cầu khỏi các tác động của kháng thể kháng TfR; các chất này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, erythropoietin (EPO), bổ sung sắt, vitamin C, axit folic, và vitamin B12, cũng như thay thế hồng cầu thực thể (có nghĩa là, hồng cầu lưới) bằng cách, ví dụ, tiêm truyền tế bào tương tự, có thể từ một cá thể khác có nhóm máu tương tự hoặc có thể

trước đó đã được lấy từ đối tượng sử dụng kháng thể kháng TfR này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được là trong một vài trường hợp, các chất nhằm bảo vệ hồng cầu hiện có (có nghĩa là, hồng cầu lưới) tốt hơn là được sử dụng cho đối tượng trước đó đã dùng hoặc đang dùng liệu pháp kháng thể kháng TfR, trong khi đó các chất nhằm hỗ trợ hoặc kích thích tái phát triển/phát triển các dòng tế bào máu hoặc hồng cầu (có nghĩa là, hồng cầu lưới hoặc số lượng hồng cầu lưới) tốt hơn là được sử dụng đồng thời hoặc sau khi dùng liệu pháp kháng thể kháng TfR sao cho các tế bào máu có thể có thể được bổ sung sau khi điều trị bằng kháng thể kháng TfR.

Theo các phương án khác, ít nhất một chất trị liệu khác được chọn theo khả năng ức chế hoặc ngăn ngừa hoạt hoá con đường bổ thể khi sử dụng kháng thể kháng TfR. Các ví dụ về các chất trị liệu này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất gây ảnh hưởng đến khả năng gắn kết hoặc hoạt hoá con đường bổ thể của kháng thể kháng TfR và các chất ức chế một hoặc nhiều tương tác phân tử trong con đường bổ thể, và nói chung được mô tả trong: Molec. Immunol. 43:107-121 (2006) của Mollnes và Kirschfink, được viện dẫn ở đây để tham khảo.

Các liệu pháp kết hợp nêu trên và trong bản mô tả này bao gồm sử dụng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng một chế phẩm hoặc các chế phẩm riêng biệt), và sử dụng tách biệt, trong trường hợp này, có thể sử dụng kháng thể theo sáng chế trước khi, đồng thời, và/hoặc sau khi sử dụng chất trị liệu bổ sung và/hoặc chất phụ trợ. Theo một phương án, sử dụng kháng thể kháng TfR và sử dụng chất trị liệu bổ sung có thể cách nhau một tháng, hoặc cách nhau một, hai hoặc ba tuần, hoặc cách nhau một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu ngày. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với các liệu pháp can thiệp khác như, không chỉ giới hạn ở, liệu pháp chiếu xạ, liệu pháp hành vi, hoặc các liệu pháp khác đã biết trong lĩnh vực này và thích hợp cho rối loạn thần kinh sẽ được điều trị hoặc phòng ngừa.

Kháng thể kháng TfR theo sáng chế (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được sử dụng theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hoá, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn để sử dụng điều trị khu trú, trong chỗ tổn thương. Sử dụng tiêm truyền ngoài đường tiêu hoá bao gồm sử dụng trong bắp cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong phúc mạc hoặc dưới da. Có thể qua đường dùng thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng cách tiêm, như tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tuỳ thuộc một phần vào việc sử dụng là trong thời gian ngắn hay mãn tính. Nhiều phác đồ dùng liều

khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng liều đơn nhất hoặc nhiều liều tại các thời điểm khác nhau, sử dụng liều cao, và tiêm truyền theo nhịp cũng được dự định trong bản mô tả này.

Các kháng thể theo sáng chế sẽ được bào chế, định liều, và sử dụng theo cách phù hợp với thực hành y học tốt. Các yếu tố cần cân nhắc trong bối cảnh này bao gồm rối loạn bệnh cụ thể sẽ điều trị, động vật có vú cụ thể sẽ điều trị, tình trạng lâm sàng của cá thể bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn bệnh này, vị trí vận chuyển chất trị liệu, phương pháp sử dụng, lịch trình sử dụng, và các yếu tố khác đã biết đối với bác sỹ hành nghề. Kháng thể này không nhất thiết, nhưng tuỳ ý được bào chế với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn bệnh quan tâm hoặc để dự phòng, giảm nhẹ hoặc cải thiện một hoặc nhiều tác dụng phụ khi sử dụng kháng thể. Lượng hữu hiệu của các chất khác này tuỳ thuộc vào liều lượng của kháng thể có mặt trong chế phẩm, loại bệnh hoặc rối loạn bệnh điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Các chất này nói chung được sử dụng với liều lượng và đường dùng như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc trong khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng bất kỳ và đường dùng bất kỳ được xác định trên thực tiễn/lâm sàng là thích hợp.

Để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi sử dụng đơn độc hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ tuỳ thuộc vào loại bệnh sẽ điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và tiến trình của bệnh, việc kháng thể này được sử dụng nhằm mục đích phòng ngừa hoặc trị liệu, liệu pháp trước đó, bệnh sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể này, và quyết định của bác sỹ điều trị. Kháng thể này được sử dụng thích hợp cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc qua các đợt điều trị. Tuỳ thuộc vào loại bệnh và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng từ 1µg/kg đến 15mg/kg (ví dụ 0,1mg/kg-10mg/kg) kháng thể có thể là liều lượng thăm dò ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân ví dụ, bằng cách sử dụng một hoặc nhiều lần riêng rẽ, hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục. Liều lượng hàng ngày thông thường nằm trong khoảng từ 1µg/kg đến 100mg/kg hoặc cao hơn, tuỳ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tuỳ thuộc vào tình trạng, việc điều trị nói chung sẽ được duy trì cho đến khi đạt được mức ức chế các triệu chứng bệnh mong muốn. Liều lượng ví dụ của kháng thể nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 40mg/kg. Do đó, một hoặc nhiều liều khoảng

0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg, 5,0mg/kg, 7,5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 35mg/kg hoặc 40mg/kg (hoặc liều kết hợp bất kỳ của các liều này) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều dùng này có thể được sử dụng cách quãng, ví dụ hàng tuần hoặc ba tuần một lần (ví dụ sao cho bệnh nhân tiếp nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Liều tấn công cao hơn ban đầu, tiếp đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các phác đồ liều lượng khác có thể là hữu ích. Nên hiểu là một phương pháp nhằm giảm thiểu tác động lên số lượng hồng cầu lưới bằng cách sử dụng các kháng thể kháng TfR là điều chỉnh liều lượng hoặc thời điểm của các liều dùng sao cho số lượng kháng thể trong máu tuần hoàn có mặt trong máu tương tác với hồng cầu lưới thấp hơn. Theo một ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, liều dùng thấp hơn của các kháng thể kháng TfR có thể được sử dụng với tần suất mau hơn so với liều cao hơn. Có thể cân đối mức liều lượng được sử dụng giữa lượng kháng thể cần thiết phải vận chuyển đến CNS (lượng này có liên quan đến ái lực của phần đặc hiệu kháng nguyên CNS của kháng thể), ái lực của kháng thể đó đối với TfR, và liệu (các) hợp chất kích thích bảo vệ, tăng trưởng và phát triển tế bào hồng cầu (có nghĩa là, hồng cầu lưới) hoặc ức chế con đường bổ thể có được sử dụng đồng thời hoặc kế tiếp với kháng thể này hay không. Theo dõi tiến triển của liệu pháp này bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường như mô tả trong bản mô tả này và đã biết trong lĩnh vực này.

Cần hiểu là chế phẩm hoặc phương pháp bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc phương pháp điều trị nêu trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho kháng thể kháng TfR.

H. Chế phẩm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến chế phẩm có chứa các chất hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn bệnh nêu trên. Chế phẩm bao gồm bao gói và nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng hoặc kết hợp với bao gói. Bao gói thích hợp, bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi-lanh, túi dịch truyền tĩnh mạch, v.v. Các bao gói có thể được làm từ nhiều loại vật liệu như là thuỷ tinh hoặc chất dẻo. Bao gói đựng chế phẩm, bản thân chế phẩm này hoặc kết hợp với một chế phẩm khác có hiệu quả để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý và có thể có miệng tiếp cận vô khuẩn (ví dụ, bao gói có thể là túi dung dịch truyền tĩnh mạch hoặc

lọ có nút có thể chọc bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng chỉ rõ chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý chọn lựa. Hơn nữa, chế phẩm có thể bao gồm (a) bao gói thứ nhất có chứa một chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể theo sáng chế; và (b) bao gói thứ hai có chứa một chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này còn bao gồm chất trị liệu gây độc tế bào hoặc chất trị liệu khác. Chế phẩm theo phương án này của sáng chế còn có thể bao gồm hướng dẫn sử dụng chỉ rõ là các chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị một tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, chế phẩm còn có thể bao gồm bao gói thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm chất đệm dược dụng, như là nước kìm khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer's và dung dịch dextroza. Chế phẩm này còn có thể bao gồm các chất khác mong muốn theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm, pha loãng, màng lọc, kim tiêm và xi-lanh khác.

Nên hiểu là chế phẩm nêu trên có thể bao gồm thể tiếp hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc ngoài kháng thể kháng TfR.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tổng kết, xác định đặc tính và nhân tính hóa các kháng thể kháng TfR phản ứng chéo giữa người/khỉ Cynomolgous

Bước đầu, quy trình đãi thực khuẩn thể của kháng thể chưa quen thí nghiệm được tiến hành nhằm nhận biết các kháng thể phản ứng chéo với cả thụ thể transferrin (TfR) của người và TfR của khỉ Cynomolgous ("cyno") mà không cạnh tranh với Tf để gắn kết với TfR (*JMB (2004) 1073-1093 của Lee et al.*). Không xác định được dòng phản ứng chéo, không cạnh tranh Tf này từ quá trình đãi thực khuẩn thể này. Tuy nhiên, hai kháng thể đã được nhận biết là hữu ích để xác định đặc tính các dòng tế bào lai được tạo ra sau này.

Kháng thể phản ứng chéo giữa các loài đã được nhận biết mà cạnh tranh với Tf về sự gắn kết với TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus (kháng thể cạnh tranh Tf). Epitop của một dòng khác, đặc hiệu đối với TfR của người, được lập bản đồ với miền đỉnh của thụ thể transferrin của người (huTfR) bằng cách sử dụng các thụ thể TfR khảm chuột/người (Fig.1). Dòng gắn kết miền đỉnh này mất khả năng gắn kết với huTfR khi trình tự TfR của chuột trong miền đỉnh được thay thế vào huTfR.

Tiếp đó, tiến hành phương pháp dựa trên sự miễn dịch để tạo ra các kháng thể kháng TfR của người/khỉ Cynomolgus phản ứng chéo. Miền ngoại bào ("ecd") TfR của người có chứa nhãn His đầu tận cùng N và protein nhiễm sắc tố sắt mô của người ("HFE") được biểu hiện và tinh chế như đã mô tả trong *Nature (2000) 403, 46-53* của *Bennet et al.*. Cấu trúc miền ngoại bào TfR của khỉ Cynomolgus tương tự cũng được tạo ra. TfR của khỉ Cynomolgus được biểu hiện và tinh chế theo cách tương tự. Các kháng thể TfR phản ứng chéo người và khỉ Cynomolgus được tạo ra bằng cách gây miễn dịch 5 chuột nhắt Balb/C ở ở chân bằng 6 liều (2 lần/tuần) có chứa 2µg lần lượt miền ngoại bào thụ thể transferrin của khỉ Cynomolgus (cynoTfR) và thụ thể transferrin của người (huTfR). Huyết thanh của tất cả chuột đều dương tính FACS và tất cả chuột nhắt được dung hợp. Trong số 1632 tế bào lai đã sàng lọc, 111 theo ELISA là có gắn kết với cả TfR của người và khỉ.

Sàng lọc các tế bào lai có gắn kết theo ELISA thu được bằng FACS với sự có mặt của 1µM holo-Tf của người để gắn kết với các tế bào 293 biểu hiện nhất thời TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus. Vắt tắt là, tiến hành phân tích FACS bằng cách sử dụng các tế bào 293 được chuyển nhiễm với TfR có độ dài đầy đủ của người hoặc khỉ Cynomolgus bằng cách sử dụng lipofectamin 2000 plus (Invitrogen) 48-72 giờ trước khi phân tích FACS. Các tế bào 293 không được chuyển nhiễm (đối chứng) và được chuyển nhiễm được rửa 2 lần bằng dịch đệm FACS (PBS có chứa BSA 1%), 50µl dịch nổi tế bào lai (được chuẩn hoá đến 10µg/ml) được thêm vào các tế bào 293 với sự có mặt của 1µM holo-Tf của người và ủ trên đá trong 30 phút. Các tế bào được rửa 2 lần bằng dịch đệm FACS, 50µl Fcγ của dê kháng chuột PE (Jackson ImmunoResearch) được thêm vào các tế bào và chúng được ủ trên đá trong 30 phút. Các tế bào được rửa bằng dịch đệm FACS và tái tạo hỗn dịch trong 100µl dịch đệm FACS để phân tích.

14 dòng dương tính có gắn kết với cả TfR của người và khỉ Cynomolgus (Fig.2A và Fig.2B). Các dòng này được tách dòng phụ tiếp và đánh giá khả năng gắn kết với cả TfR của người và khỉ Cynomolgus bằng ELISA, và lập bản đồ epitop trên huTfR bằng cách sử dụng dòng thực khuẩn thể gắn kết miền đỉnh được nhận biết ở trên. Vắt tắt là, tiến hành ELISA cạnh tranh thực khuẩn thể miền đỉnh trong các đĩa maxisorp được phủ bằng 2µg/ml TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus đã tinh chế trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phong bế bằng cách sử dụng Superblock với casein (Thermo Scientific, Hudson, NH). 30µl

dịch mẫu dịch nổi tế bào lai (được chuẩn hoá đến 10µg/ml) được thêm vào mỗi lỗ trong 45 phút. Tiếp đó bổ sung thêm 30µl thực khuẩn thể gắn kết miền đỉnh ở OD 0,05 trong 15 phút. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và M13 kháng HRP chuột được pha loãng 1:1000 (GE healthcare) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phát hiện thực khuẩn thể đã gắn kết bằng cách sử dụng cơ chất TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). 9 trong số 14 dòng được xác định là ức chế sự gắn kết của kháng thể gắn kết đỉnh được bộc lộ trên thực khuẩn thể (xem Fig.2C).

Ái lực của kháng thể được xác định bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt ("SPR") (Biacore™, GE Healthcare). Kháng thể kháng His (Qiagen) được ngẫu hợp vào 4 tế bào đo dòng khác nhau của chíp cảm biến CM5 BIACORE™ (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) ở khoảng từ 6000 đến 8000RU. Làm cố định bằng cách ngẫu hợp ngẫu nhiên qua các nhóm amino bằng cách sử dụng quy trình theo nhà sản xuất. 10X HBS-P (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) được pha loãng trong nước và dùng làm đệm pha loãng và đệm chạy. TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus đã tinh chế được bắt giữ, tiếp đó tiêm dịch pha loãng theo dãy 3 lần của IgG hoặc Fab ở tốc độ chảy 30ml/phút bằng cách sử dụng phương pháp động học một chu trình. Xác định các hằng số ái lực bằng cách sử dụng mô hình gắn kết Langmuir 1:1 đơn giản hoặc bằng cách sử dụng mô hình trạng thái tĩnh khi k_{on} hoặc k_{off} > ngưỡng phát hiện. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính theo tỷ lệ giữa hằng số tốc độ kết hợp (k_{on}) và hằng số tốc độ phân ly (k_{off}). Các kết quả được thể hiện trên Fig.2C.

Tách dòng mỗi dòng tế bào lai. ARN toàn phần được phân lập từ các tế bào lai bằng cách sử dụng bộ kít RNeasy mini (Qiagen). Tạo ra ADN bổ trợ bằng cách sử dụng bộ kit khuếch đại AND bổ trợ SMART 5' RACE (Clontech) dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuếch đại vùng biến đổi của từng kháng thể bằng cách sử dụng UPM (5' oligo) được cung cấp trong bộ kit và 3' oligo ghép với miền cố định. Toàn bộ sản phẩm PCR tiếp đó được tách dòng vào vectơ pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) để xác định trình tự. Sau khi phân tích trình tự, các tế bào lai có thể được chia tiếp thành 4 nhóm (Fig.3A-Fig.3D). Các dòng cạnh tranh với kháng thể gắn kết đỉnh thuộc 3 lớp trình tự có liên quan (Fig.3 A-Fig.C). 4 dòng không phải đỉnh (Fig.3D) gồm 2 dòng có liên quan và 2 trình tự riêng biệt khác. Các CDR của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của mỗi dòng được đề cập trong Bảng 3.

Bảng 3: Các CDR của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể kháng TfR phản ứng chéo khỉ Cynomolgus/ người

Tên dòng	Chuỗi nặng/ Chuỗi nhẹ	HVR1	SEQ ID #	HVR2	SEQ ID #	HVR3	SEQ ID #
7A4	Chuỗi nhẹ	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	31
	Chuỗi nặng	DYAMH	32	GISTYFGRTNYNQKFKG	33	GLSGNYVMDY	34
8A2	Chuỗi nhẹ	RASESVDSYGNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNEGPPT	36
	Chuỗi nặng	DYGMH	37	VISPYSGRTNYNQNFKG	38	GLSGNYVVDY	39
15D2	Chuỗi nhẹ	RASESVDSYGNSFMH	35	RASNLES	30	QQSNEGPPT	36
	Chuỗi nặng	DYAMH	32	VISFYSGKTNYNQKFMG	40	GLSGNYVMDY	34
10D11	Chuỗi nhẹ	RASESVDSYGNSFMH	41	RASNLES	30	QHSNEDPPT	42
	Chuỗi nặng	DYGMH	37	VISPYSGKTNYSQKFKG	43	GLSGNFVMDF	44
7B10	Chuỗi nhẹ	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	31
	Chuỗi	DYAMH	32	GISTYFGRTNYN	33	GLSGNY	34

	nặng			QKFKG		VMDY	
Các CDR Chuỗi nhẹ lớp I đồng thuận		RASESVD(S/D)YG(N/P)SFMH	45	RASNLES	30	Q(Q/H)SNE(A/G/D)PPT	46
Các CDR Chuỗi nhẹ lớp I đồng thuận		DY(A/G)MH	47	(G/V)IS(T/F/P)Y(F/S)G(R/K)TNY(N/S)Q(K/N)F(K/M)G	48	GLSGN(Y/F)V(M/V)D(Y/F)	49
15G11	Chuỗi nhẹ	RASDNLYSNLA	50	DATNLAD	51	QHFWGTPLT	52
	Chuỗi nặng	SYWMH	53	EINPTNGRTNYIEKFKS	54	GTRAYHY	55
16G5	Chuỗi nhẹ	RASENIYSNLA	56	AATDLAD	57	QHFWGTPLT	52
	Chuỗi nặng	SYWMH	53	EINPTNGRTNYNENFKS	58	GTRAYHF	59
13C3	Chuỗi nhẹ	RASDNIYSNLA	60	AATNLAD	61	QHFWGTPLM	62
	Chuỗi nặng	SYWMH	53	EINPINGRTNYSEKFKK	63	GTRAYHY	55
16G4	Chuỗi nhẹ	RASDNIYSNLA	60	AVTNLAD	64	QHFWGTPLT	52
	Chuỗi nặng	SYWMH	53	EINPSNGRTNYNETFKS	65	GTRAYHY	55
Các CDR Chuỗi nhẹ lớp I đồng thuận		RAS(E/D)N(L/I)YSNLA	66	(D/A)(A/V)T(N/D)LAD	67	QHFWGTPL(T/M)	68

Các CDR Chuỗi nặng lớp II đồng thuận		SYWMH	53	EINP(T/I/S)NGRTNY(I/N/S)E(K/N/T)FK(S/K)	69	GTRAYH(Y/F)	70
16F6	Chuỗi nhẹ	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPWT	73
	Chuỗi nặng	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPSLKS	75	YGYGNPATRYFDV	76
7G7	Chuỗi nhẹ	RARQSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Chuỗi nặng	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAWFAY	82
4C2	Chuỗi nhẹ	RARQSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Chuỗi nặng	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDEKFKS	83	GGYDSRAWFAH	84
1B12	Chuỗi nhẹ	TTSSSVPSSYFH	85	STSNLAS	86	HQYHRSPFT	87
	Chuỗi nặng	DYYMY	88	SISNGGDNTYYPDTVKG	89	QGALYDGYYRGAMDY	90
13D4	Chuỗi nhẹ	RAGQDITNYLN	91	YTSRLHS	92	QQANTLPYT	93
	Chuỗi nặng	NYWIE	94	EILPGSGSTKYNEKFKG	95	RGGYGYDGEFAY	96

Các CDR Chuỗi nhẹ lớp IV đồng thuận	(R/T)(A/T)(R/S/G)(Q/S)(S/-)(V/-)(S/-)(T/-)(S/V/D)(S/P/I)(Y/S/T)(S/N)(F/Y)(M/F/L)(H/N)	97	(Y/S)(A/T)S(I/N/R)(Q/L)(E/A/H)S	98	(Q/H)(H/Q)(T/Y/A)(W/H/N)(E/R/T)(I/S/L)P(F/Y)T	99
Các CDR Chuỗi nặng lớp IV đồng thuận	(S/D/N)Y(W/Y)(M/I)(H/Y/E)	100	(N/S/E)I(Y/S/L)(P/N)G(S/G)(G/D)(S/N)T(K/Y)Y(D/P/N)(E/D)(R/K/T)(F/V)K(S/G)	101	(G/Q/R)G(Y/A/G)(D/L/Y)(S/Y/G)(R/D/Y)(A/G/D)(W/Y/G)(F/Y/E)(R/F/-)(G/-)(A/-)(M/-)(A/D)(Y/H)	102

Các dòng đại diện từ mỗi lớp, (15G11, 7A4, 16F6 và 7G7), được lấy ví dụ trong bản mô tả này để làm tương thích với người và xác định đặc tính tiếp. Làm tương thích với người bằng cách sử dụng mảnh ghép HVR kèm theo đưa vào các vị trí vernier như nêu dưới đây và Fig.4A-Fig.4E. 15G11 được nhân tính hóa bằng cách ghép các HVR vào các miền biến đổi của người IGKV1-NL1*01 và IGHV1-3*01. Tổ hợp các vị trí vernier của chuột khác nhau được đưa vào các biến thể được nhân tính hóa như như minh hoạ trên Fig.4E. Biến thể 15G11 được nhân tính hóa 15G11.v5 có chứa các vị trí vernier đã chọn trong VL (các vị trí 43 và 48) và VH (các vị trí 48, 67, 69, 71 và 73) như minh hoạ trên Fig.4A. Ngoài ra, đầu tận cùng N của VH được thay đổi từ Q thành E. Để làm tương thích với người 7A4, mảnh ghép HVR được tạo ra bằng cách sử dụng các HVR chuỗi nặng 7A4 và chuỗi nhẹ 8A2 (7A4 và 8A2 là các dòng có liên quan, Fig.3A). Các HVR được ghép vào các miền biến đổi của người IGKV4-1*01 và IGHV1-2*02. Tổ hợp các vị trí vernier của chuột khác nhau được đưa vào biến thể được nhân tính hóa như minh hoạ trên Fig.4E. Biến thể 7A4 được nhân

tính hóa, 7A4.v15 có chứa các vị trí đã chọn trong VL (vị trí 68) và VH (các vị trí 24 và 71) và thay đổi CDR-L3 G94A, như minh hoạ trên Fig.4B. 7G7 được nhân tính hóa bằng cách ghép các HVR vào các miền biến đổi đồng thuận của người kappa 4 và phân nhóm I cùng với các vị trí vernier đã chọn trong VH (vị trí 93) như minh hoạ trên Fig.4C. Biến thể được nhân tính hóa này gọi là 7G7.v1. 16F6 được nhân tính hóa bằng cách ghép các HVR vào các miền biến đổi của người IGKV1-9*01 và IGHV4-59*01. Tổ hợp các vị trí vernier của chuột khác nhau được đưa vào biến thể được nhân tính hóa như minh hoạ trên Fig.4E. Biến thể 16F6 được nhân tính hóa 16F6.v4 có chứa 2 thay đổi trong VL (I48L và F71Y) cũng như các vị trí vernier đã chọn trong VL (các vị trí 43 và 44) và VH (các vị trí 71 và 78) như minh hoạ trên Fig.4D.

Bảng 4: các CDR chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể/Fab được nhân tính hóa

Tên dòng	Chuỗi nặng/ chuỗi nhẹ	CDR1	SEQ ID #	CDR2	SEQ ID #	CDR3	SEQ ID #
15G11.v5	Chuỗi nhẹ	RASDNLYSNLA	50	DATNLAD	51	QHFWGTPLT	52
	Chuỗi nặng	SYWMH	53	EINPTNGRTNYIEKFKS	54	GTRAYHY	55
7A4.v15	Chuỗi nhẹ	RASESVDSYGNSFMH	29	RASNLES	30	QQSNEAPPT	127
	Chuỗi nặng	DYAMH	32	GISTYFGRTNYNQKFKG	33	GLSGNYVMDY	34
7G7.v1	Chuỗi nhẹ	RARQSVSTSSYSFMH	77	YASIQES	78	QHTWEIPFT	79
	Chuỗi nặng	SYWMH	80	NIYPGSGSTKYDERFKS	81	GGYDSRAWFAY	82
16F6.v4	Chuỗi nhẹ	RASKSISKYLA	71	SGSTLQS	72	QQHNEYPWT	73
	Chuỗi nặng	SEYAWN	74	YISYSGTTSYNPSLKS	75	YGYGNPATRYFDV	76

Ái lực của các biến thể được nhân tính hóa đối với TfR của người và khỉ Cynomolgus được xác định bằng SPR theo IgG (Fig.4E). Các dòng đã chọn cũng được phân tích bằng SPR theo Fab để đánh giá ái lực hoá trị một (Bảng 7). Trong cả hai trường hợp, tiến hành các thí nghiệm SPR như nêu trên.

Bảng 5: Dữ liệu gắn kết theo Biacore của các biến thể theo kiểu Fab đã chọn lọc

	HuTfR			CynoTfR			
Mẫu	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	Tỷ lệ giữa khỉ cynomolgus và người
Mu15G11.Fab	1,38E+06	4,65E-03	3,37E-09	1,07E+06	6,23E-03	5,81E-09	1,72
Mu15G11.Fab	6,34E+05	1,52E-03	2,41E-09	4,85E+05	3,68E-03	7,57E-09	3,15
Hu15G11.v1.Fab	6,38E+05	0,006986	1,09E-08	5,05E+05	0,0373	7,39E-08	
Hu15G11.v3.Fab	6,42E+05	0,004657	7,26E-09	4,83E+05	0,0201	1,09E-08	
Hu15G11.v5.Fab	4,56E+05	0,004063	8,91E-09				
hu15G11.v5.Fab	7,76E+05	0,003643	4,70E-09	1,41E+06	0,02184	1.56E-08	3,4
Mu7A4.Fab	1,65E+06	3,13E-04	1,90E-10	1,14E+06	8,45E-04	7,41E-10	3,9
Hu7A4.v5.Fab	2,24E+06	1,53E-03	6,86E-10	1,18E+06	6,41E-03	5,44E-09	
Hu7A4.v8.Fab	9,28E+05	1,07E-03	1,15E-09	7,97E+05	6,81E-03	8,55E-09	
Hu7A4.v9.Fab	1,71E+06	6,86E-04	4,01E-10	8,08E+05	3,42E-03	4,23E-09	
Hu7A4.v12.Fab	3,32E+06	8,44E-04	2,55E-	1,74E+06	3,31E-03	1,90E-	

			10			09	
hu7A4.v15.Fab	9,10E+05	3,17E-04	3,48E-10	3,78E+05	0,001618	4.28E-09	11
Hu7G7.v1 Fab	1,44E+05	0,006594	4,58E-08	3,84E+04	0,007231	1,88E-07	4,4
Mu16F6.Fab	6,07E+04	1,90E-04	3,13E-09	5,11E+04	1,37E-03	2,68E-08	8,56
Hu16F6.v4.Fab	1,31E+05	1,69E-04	1,29E-09	9,89E+04	2,44E-03	2,47E-08	19,1

Epitop gắn kết của các kháng thể được tái khẳng định như sau. Tiến hành ELISA phong bế Tf-TfR trong các đĩa maxisorp được phủ bằng 2µg/ml TfR của người đã tinh chế trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phong bế bằng cách sử dung dịch đệm phong bế Superblock trong PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). 50µl dịch chứa 12,5µM holo-Tf của người (R&D Systems, Minneapolis, MN) được thêm vào các đĩa trong 40 phút. 50µl dịch chuẩn độ của hu7A4.v15, hu15G11.v5, kháng thể cạnh tranh Tf, và hu7G7.v1 (bắt đầu từ 10ug/ml, pha loãng theo dãy 1:3) được thêm vào đĩa và được ủ trong 20 phút. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và Fcγ của dê kháng người HRP đã pha loãng 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phát hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Tiến hành ELISA gắn kết HFE-TfR trong các đĩa maxisorp được phủ bằng 1µg/ml HFE trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phong bế bằng cách sử dụng dịch đệm phong bế Superblock trong PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Dịch chuẩn độ TfR của người (bắt đầu ở 100ug/ml, pha loãng theo dãy 1:3) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ. 1µg/ml hu15G11.v5, hu7A4.v15 hoặc hu7G7.v1 tiếp đó được thêm vào đĩa trong 1 giờ. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và Fc của dê kháng người HRP đã pha loãng 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng.

Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phát hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Tiến hành ELISA phong bế HFE-TfR trong các đĩa được phủ bằng 1µg/ml HFE trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phong bế bằng cách sử dụng dịch đệm phong bế Superblock trong PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Trong đĩa NUNC™, dịch chuẩn độ của hu7A4.v15, hu15G11.v5, kháng thể cạnh tranh Tf, holo-Tf của người và IgG đối chứng (400µg cho toàn bộ kháng thể, 8000µg/ml cho holo transferrin, pha loãng theo dãy 1:3) kết hợp với 2µg/ml TfR của người được biotin hoá và được ủ trong 1 giờ. Hỗn hợp tiếp đó được thêm vào đĩa đã phủ HFE trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và HRP-streptavidin đã pha loãng 1:1000 (SouthernBiotech, Birmingham) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phát hiện TfR của người đã biotin hoá được gắn kết vào đĩa bằng cách sử dụng cơ chất TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Khả năng gắn kết của các biến thể được nhân tính hóa này với TfR không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của 6,3µM holo-Tf, trong khi đó khả năng gắn kết của kháng thể cạnh tranh Tf gắn kết với vị trí gắn kết Tf trên TfR bị ức chế (Fig.5). Hơn nữa, 7A4.v15, 15G11.v5 và 7G7.v1 được nhân tính hóa vẫn có thể gắn kết huTfR được bắt giữ bằng HFE, cho thấy là các kháng thể này không ảnh hưởng đến khả năng gắn kết của huTfR với HFE đã được cố định (Fig.6A). Trong một thí nghiệm liên quan, 7A4.v15 và 15G11.v5 không phong bế TfR đã biotin hoá gắn kết với HFE đã được cố định. Trái lại, tương tác này bị phong bế bởi kháng thể cạnh tranh Tf và holo Tf (Fig.6B). HFE và Tf đã biết là có cùng epitop trên TfR (*Nature (2000) 403, 46-53 của Bennet et al.*).

15G11v.5 và kháng TfR^{C12} đã cố định được đánh giá về khả năng gắn kết với miền ngoại bào (ECD) TfR của người đã biotin hoá hoặc thực khuẩn thể M13 hoá trị một bộc lộ miền đỉnh TfR của người. Kháng TfR^{C12} thu được từ thư viện thực khuẩn thể kháng thể tổng hợp đã được đãi ECD TfR của người và gắn kết với vị trí trên TfR của người mà cạnh tranh với gắn kết transferrin. Các kháng thể được phủ ở 1µg/ml trong PBS trên các đĩa Maxisorp. ECD TfR của người được biotin hoá đã gắn kết hoặc thực khuẩn thể miền đỉnh TfR tương ứng đã gắn kết được phát hiện bằng HRP-streptavidin (GE health care, RPN 4401V) hoặc HRP-kháng M13 (GE health care, 27-

9421-01). Fig.25 thể hiện 15G11v.5 gắn kết với miền đỉnh TfR của người. Vị trí gắn kết 15G11v.5 được lập bản đồ với miền đỉnh, một vị trí cách xa các vị trí gắn kết phối tử TfR.

Ví dụ 2: Chế tạo ái lực các kháng thể kháng TfR phản ứng chéo người/khỉ cynomolgus

Ngoài các biến thể được nhân tính hóa nêu trên, các biến thể được chế tạo ái lực bổ sung được tạo ra. Được lấy ví dụ trong bản mô tả này là việc chế tạo ái lực của 15G11.v5 và 7A4.v15. Các biến thể ái lực được tạo ra bằng cách tạo ra các thay thế alanin riêng rẽ trong CDR-L3 hoặc CDR-H3 bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn. Các biến thể này được sàng lọc dưới dạng IgG bằng ELISA và SPR để nhận biết các vị trí quan trọng cho gắn kết với TfR của người và khỉ Cynomulgus; cũng xác định ái lực hoá trị một của các biến thể đã chọn lọc dưới dạng Fab. Các IgG hoặc Fab biến thể quét Ala được biểu hiện trong các tế bào 293 và gắn kết với TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus được định lượng bằng ELISA trong đĩa Maxisorp được phủ bằng 1,8µg/ml Fcγ của dê kháng người (Jackson ImmunoResearch) trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phong bế bằng cách sử dụng dịch đệm phong bế Superblock trong PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH). Các dịch nổi có chứa IgG đã biểu hiện được pha loãng theo dãy 1:5 và được thêm vào đĩa trong 1 giờ. hu15G11.v5 hoặc hu7A4.v15 đã tinh chế được sử dụng làm chất chuẩn (được pha loãng 1:5 bắt đầu từ 1ug/ml). Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và HRP kháng kappa của dê được pha loãng 1:1000 (Southern Biotech) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phát hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills). Cũng đánh giá khả năng gắn kết bằng SPR, như nêu trên. Các kết quả được thể hiện trên Fig.7A (các biến thể 15G11.v5) và Fig.7B (các biến thể 7A4.v15).

Các biến thể khác của 15G11.v5 với các thay thế alanin riêng rẽ ở các vị trí trong CDR-L1, CDR-L2, CDR-H1 và CDR-H2 cũng được tạo ra, được biểu hiện và trước tiên sàng lọc về khả năng gắn kết với TfR của người và khỉ Cynomulgus bằng ELISA (Bảng 6). ELISA gắn kết người/khỉ được tiến hành trong các đĩa Maxisorp được phủ bằng 2µg/ml TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus đã tinh chế trong PBS ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phong bế bằng cách sử dụng dịch đệm phong bế Superblock trong PBS (Thermo Scientific, Hudson, NH).

Các dịch nổi nuôi cấy tế bào có chứa các IgG biến thể quét Ala đã biểu hiện được pha loãng theo dãy 1:5 và được thêm vào các lỗ trong 1 giờ. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và Fcγ của dê kháng HRP người được pha loãng 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) được thêm vào đĩa và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Rửa các đĩa bằng PBS/Tween 20 0,05% và phát hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills).

Bảng 6: Phân tích ELISA các biến thể hu15G11.v5 IgG Ala

			CynoTfR EC50 (ng/ml)	HuTfR EC50 (ng/ml)
		15G11.v5	1,8	0,8
HVR-H1		G26A	6,1	1,1
		Y27A	1467,1	21,1
		T28A	0,8	0,4
		F29A	12,5	1,5
		T30A	0,9	0,4
		S31A	0,1	0,05
		Y32A	1,4	0,4
		W33A	362,5	59,6
		M34A	1,1	0,4
HVR-H2		G49A	1,1	0,3

		E50A	409,7	20,6
		I51A	0,6	0,2
		N52A	0,9	0,3
		P52aA	8,1	3,9
		T53A	0,7	0,3
		R56A	5405,4	55,1
		N58A	80,4	6,3
		Y59A	0,7	0,3
		I60A	0,7	0,3
		E61A	0,6	0,2
		K62A	0,7	0,3
		F63A	0,6	0,4
		K64A	0,6	0,3
		S65A	0,7	0,2
HVRL1		R24A	0,4	0,1
		S26A	0,6	0,2
		D27A	0,8	0,2

		N28A	0,8	0,2
		L29A	0,9	0,3
		Y30A	1,0	0,3
		S31A	0,7	0,3
		N32A	4,0	1,6
		L33A	0,1	0,05
HVR-L2		D50A	0,5	0,2
		T52A	0,3	0,2
		N53A	0,6	0,3
		L54A	0,5	0,4
		D56A	0,5	0,3

Các biến thể đã chọn lọc được tinh chế tiếp và ái lực hoá trị một của chúng đối với TfR của người hoặc khỉ Cynomolgus được đánh giá bằng SPR (Bảng 7).

Bảng 7: Phân tích SPR ái lực hoá trị một của các biến thể alanin Fab 15G11.v5

	HuTfR			CynoTfR			Tỷ lệ khỉ Cynomolgus/ người
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	Tỷ lệ
Hu15G11.v5 Fab	6,74E+05	4,74E-03	7,03E-09	4,51E+05	1,27E-02	2,82E-08	4,0
Hu15G11.HC32A Fab	2,38E+05	1,78E-03	7,47E-09	1,77E+05	8,51E-03	4,80E-08	6,4

Hu15G11.HC34A Fab	5,64E+05	4,03E-03	7,14E-09	3.04E+05	9,90E-03	3,26E-08	4,6
Hu15G11.HC52A Fab	5,30E+05	2,36E-02	4,44E-08	4,87E+05	5,67E-02	1,17E-07	2,6
Hu15G11.HC52A Fab	5,64E+05	1,96E-02	3,46E-08	Không xác định được	Không xác định được	Không xác định được	Không xác định được
Hu15G11.HC51A Fab	4,33E+05	1,04E-02	2,39E-08	3,13E+05	3,29E-02	1,05E-07	4,4
Hu15G11.HC53A Fab	8,90E+05	1,15E-02	1,29E-08	4,84E+05	2,50E-02	5,18E-08	4,0
Hu15G11.HC54A Fab	2,06E+05	8,71E-03	4,24E-08	2,80E+05	1,69E-02	6,02E-08	1,4

Ví dụ 3: Xây dựng cấu trúc kháng thể kháng TfR của người lưỡng đặc hiệu và phân tích in vitro

Một vài biến thể trong số các biến thể kháng thể nêu trên được định dạng lại dưới dạng các kháng thể lưỡng đặc hiệu với nhánh thứ hai gắn kết đặc hiệu với BACE1. Các kháng thể kháng TfR của người Hu15G11.v5, Hu15G11.LC92A, Hu15G11.HC52A và Hu15G11.HC53A được sử dụng để chế tạo nhánh gắn kết TfR của kháng thể lưỡng đặc hiệu bằng cách sử dụng công nghệ xây dựng cấu trúc kháng thể lưỡng đặc hiệu 'nốt phồng vào lỗ' (J. Immunol. Methods 248, 7–15 (2001) của Carter, P.; Protein Eng. 9, 617–621 (1996) của Ridgway, J. B., Presta, L. G., và Carter, P.; Nat. Biotechnol. 16, 677–681 (1998) của Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., và Carter, P.; J. Mol. Biol. 270, 26–35 (1997) của Atwell, S., Ridgway, J. B., Wells, J. A., và Carter, P.). Ngoài các đột biến nốt phồng và lỗ trong Fc cho kháng TfR (lỗ) và kháng BACE1 (nốt phồng), tất cả nửa kháng thể có chứa các đột biến trong vùng Fc đã huỷ bỏ chức năng hiệu ứng (N297G) và Hu15G11.v5 và Hu15G11.LC92A có chứa đột biến Fc bổ sung đã huỷ bỏ chức năng hiệu ứng (D265A). Các nửa kháng thể nốt phồng và lỗ được tinh chế riêng biệt từ *E.coli* và kết hợp theo tỷ lệ 1:1,1 của kháng TfR để ngăn ngừa tạo thành các homodime kháng TfR. Việc lắp ghép kháng thể lưỡng đặc hiệu được thực hiện bằng cách ủ khử hoá trong ít nhất ba ngày ở nhiệt độ trong phòng trong dịch đệm có chứa

glutathion đã khử ở tỷ lệ 100x so với kháng thể và 200mM arginin có độ pH 8,0. Sau khi lắp ghép, các kháng thể lưỡng đặc hiệu được tinh chế bằng sắc ký tương tác kỵ nước. Xác nhận việc lắp ghép bằng phổ khối sắc ký lỏng và SDS-PAGE. Các kháng thể đã tinh chế được xác nhận là đồng nhất và tập hợp đồng đều theo sắc ký loại trừ kích cỡ và phổ khối tia laze đa góc.

Các kháng thể lưỡng đặc hiệu thu được được gọi là 15G11.v5 (kháng TfR^1), 15G11.W92A (15G11.LC92A hoặc kháng TfR^2), Hu15G11.N52A (kháng TfR^{52A}) và Hu15G11.T53A (kháng TfR^{53A}). Ái lực hoá trị một và động học đối với TfR của người và khỉ Cynomulgus được xác định đối với 115G11.v5 và 115G11.W92A bằng SPR, như trên (xem Bảng 9). Kháng TfR^1 và kháng TfR^2 có ái lực gắn kết hoá trị một tương tự như kháng TfR^A và kháng TfR^D để gắn kết với TfR của chuột (xem: *Sci. Transl. Med.* **3**, 84ra43 (2011) của Atwal et al.; *Sci. Transl. Med.* 25/5/2011: Tập. 3, Ấn Bản 84, trang 84-44 của Yu et al.).

Bảng 8: Phân tích SPR hoá trị một của 15G11.v5 (TfR^1) và 15G11.W92A (LC92A, TfR^2)

	HuTfR			CynoTfR			Tỷ lệ khỉ Cynomolgus/ người
	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Hu15G11,v5 Fab	6,74E+05	4,74E-03	7,03E-09	4,51E+05	1,27E-02	2,82E-08	4,0
Hu15G11,W92A Lưỡng đặc hiệu	1,28E+05	3,77E-02	2,95E-07	8,36E+04	5,20E-02	6,22E-07	2,1

Ngoài ra, ái lực gắn kết của các kháng thể lưỡng đặc hiệu kháng TfR^1, kháng TfR^2, Hu15G11.N52A và Hu15G11.T53A được xác định kháng TfR của người và khỉ Cynomulgus bằng SPR như mô tả trên đây. Như được thể hiện trong Bảng 9 dưới đây, kháng TfR^{52A} và kháng TfR^{53A} có ái lực gắn kết đối với TfR của người và khỉ Cynomulgus nằm trong khoảng ái lực của $TfR1^{h15G11.v5}$ và $TfR2^{LC92A}$.

Bảng 9

Các kháng thể kháng TfR của khỉ Cynomolgus/ của người (nM)		
	TfR của người	TfR của khỉ Cynomolgus
$TfR1^{h15G11.v5}$	10	37
$TfR2^{LC92A}$	270	810
TfR^{52A}	52	343
TfR^{53A}	24	143

Ví dụ 4: Tác động của các kháng thể đơn đặc hiệu và lưỡng đặc hiệu có chức năng hiệu ứng và không có chức năng hiệu ứng lên dòng tế bào mắc chứng tăng hồng cầu bạch cầu của người và các tế bào đơn nhân mắc bệnh tuỷ xương nguyên phát

Các nghiên cứu trước đây ở chuột đã xác định là các kháng thể gắn kết TfR của chuột có chức năng hiệu ứng và/hoặc khả năng gắn kết bổ thể đã làm suy kiệt một cách chọn lọc hồng cầu lưới biểu hiện TfR. Để khẳng định liệu hiện tượng suy kiệt được nhận thấy trong các nghiên cứu ở chuột này là chỉ có ở chuột hay không, tiến hành các thử nghiệm khác nữa sử dụng kháng TfR gắn kết với TfR của người.

Tiến hành các thử nghiệm ADCC bằng cách sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (các PBMC) từ người cho khoẻ mạnh làm các tế bào hiệu ứng. Dòng tế bào chứng tăng hồng cầu bạch cầu của người (HEL, ATCC) và các tế bào đơn nhân tuỷ xương của người nguyên phát (AllCells, Inc.) được sử dụng làm các tế bào đích. Để giảm thiểu độ biến thiên giữa những người cho mà có thể phát sinh do các khác biệt về alen chuỗi kháng thể ở gốc vị trí 158 trong FcγRIIIA, giới hạn người cho máu là những người mang kiểu gen RcγRIIIA dị hợp tử (F/V158) trong loạt các thử nghiệm thứ nhất (Fig.8A-Fig.B). Cho loạt các thử nghiệm thứ hai (Fig.9A-Fig.B), chỉ sử dụng các tế bào HEL làm các tế bào đích, với các PBMC từ người cho khoẻ mạnh mang kiểu gen F/V158 hoặc kiểu gen FcγRIIIA V/V158. Kiểu gen V/V158 cũng được bao gồm trong thử nghiệm này do có mối liên quan đã biết với hoạt tính ADCC qua trung gian tế bào giết tự nhiên (NK) gia tăng cũng như khả năng gắn kết các kháng thể IgG4

(Bowles và Weiner, 2005; Bruhns et al. 2008). Đếm các tế bào và xác định khả năng sống còn bằng Vi-CELL® (Beckman Coulter; Fullerton, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các PBMC được phân lập bằng cách ly tâm gradien tỷ trọng bằng cách sử dụng ống nghiệm tách máu Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Các tế bào đích trong 50µl môi trường thử nghiệm (RPMI-1640 với BSA 1% và 100 đơn vị/mL penixilin và streptomyxin) được gây giống trong đĩa 96 lỗ, đáy tròn ở 4 x 10^4/lỗ. Các dịch pha loãng theo dãy chứa các kháng thể thử nghiệm và đối chứng (50µl/lỗ) được thêm vào các đĩa có chứa các tế bào đích, tiếp đó ủ ở nhiệt độ 37°C với CO_2 5% trong 30 phút để cho phép opsonin hoá. Nồng độ cuối cùng của các kháng thể nằm trong khoảng từ 0,0051 đến 10.000ng/mL sau khi pha loãng theo dãy 5 lần đối với tổng cộng 10 điểm lấy dữ liệu. Sau khi ủ, 1,0 x 10^6 tế bào hiệu ứng PBMC trong 100µl môi trường thử nghiệm được thêm vào mỗi lỗ để có tỷ lệ tế bào hiệu ứng:tế bào đích 25:1, và ủ các đĩa thêm 4 giờ. Ly tâm các đĩa khi kết thúc quá trình ủ và thử nghiệm các dịch nổi về hoạt tính lactat dehydrogenaza (LDH) bằng cách sử dụng Cytotoxicity Detection Kit™ (Roche Applied Scinece; Indianapolis, IN). Thêm hỗn hợp phản ứng LDH vào các dịch nổi và ủ các đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút kèm theo lắc liên tục. Ngừng phản ứng bằng H_3PO_4 1M, và xác định độ hấp thụ ở 490nm (mức nền, được xác định ở 650nm được trừ đi cho mỗi lỗ) bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa vi chuẩn độ SpectraMax Plus. Độ hấp thụ của các lỗ chỉ chứa các tế bào đích được dùng làm đối chứng cho mức nền (đối chứng mức thấp), trong khi đó các lỗ có chứa các tế bào đích được phân giải bằng Triton-X100 cho tín hiệu tối đa sẵn có (đối chứng mức cao). Độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể (AICC) như được xác định trong các lỗ có chứa các tế bào đích và hiệu ứng mà không có bổ sung thêm kháng thể. Mức độ ADCC cụ thể được tính như sau:

$$\% \text{ ADCC} = 100 \times \frac{A_{490} \text{ (mẫu thử)} - A_{490} \text{ (AICC)}}{A_{490} \text{ (Đối chứng mức cao)} - A_{490} \text{ (Đối chứng mức thấp)}}$$

Vẽ đồ thị các giá trị ADCC của dịch pha loãng mẫu thử theo nồng độ kháng thể, và khớp đường cong đồ thị đáp ứng liều dùng vào mô hình bốn tham số bằng cách sử dụng SoftMax Pro.

Trong loạt thử nghiệm thứ nhất, hoạt tính ADCC của nhiều loại cấu trúc kháng TfR của người được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào mắc chứng tăng hồng cầu bạch cầu của người (các tế bào HEL) hoặc các tế bào đơn nhân mắc bệnh tuỷ xương nguyên phát của người làm các tế bào đích. Kháng thể kháng TfR1 của người có khả năng-chức năng hiệu ứng của IgG1 hoá trị hai 15G11, và dạng lưỡng đặc hiệu của kháng thể này với nhánh kháng BACE1 theo định dạng IgG1 của người có chứa các đột biến D265A và N297G để phá huỷ chức năng hiệu ứng (xem Ví dụ 3), được thử nghiệm ở nhiều nồng độ khác nhau trong thử nghiệm ADCC, bằng cách sử dụng IgG1 kháng gD kiểu dại làm đối chứng âm tính và HLA của chuột kháng người (lớp I) làm đối chứng dương tính. Các kết quả được thể hiện trên Fig.8A và Fig.8B. Với các tế bào HEL làm tế bào đích (Fig.8A) hoặc các tế bào đơn nhân tuỷ xương làm tế bào đích (Fig.8B), kháng thể kháng TfR của người có chức năng hiệu ứng đơn đặc hiệu 15G11 thể hiện hoạt tính ADCC đáng kể. Hoạt tính này tương tự với mức hoạt tính của các kháng thể HLA kháng người đối chứng dương tính trên các tế bào HEL, và ở mức độ mạnh mặc dù thấp hơn so với mức đối chứng dương tính trên các tế bào đơn nhân tuỷ xương. Mức tương đối thấp được nhận thấy trong thử nghiệm các tế bào đơn nhân tuỷ xương có thể là do chỉ một phần của hỗn hợp khác loại gồm các tế bào PBMC dạng tuỷ và thuộc dòng hồng cầu được sử dụng trong thử nghiệm này biểu hiện các mức cao của TfR, trong khi đó các tế bào HEL có mức biểu hiện TfR cao đồng nhất trong toàn bộ tập hợp tế bào tách dòng. Trái lại, kháng thể kháng TfR/BACE1 của người lưỡng đặc hiệu không có chức năng hiệu ứng không thể hiện hoạt tính ADCC bất kỳ trong các tế bào HEL hoặc các tế bào đơn nhân tuỷ xương, tương tự như mẫu đối chứng âm tính.

Trong loạt các thử nghiệm thứ hai, đánh giá tác động của sự chuyển lớp kháng thể trong hệ thử nghiệm này. Quy trình thử nghiệm ADCC là giống như quy trình nêu trên, ngoại trừ toàn bộ các tế bào đích là các tế bào HEL, và các tế bào hiệu ứng là các PBMC từ người cho khoẻ mạnh mang kiểu gen FcγRIIIa-V/F158 dị hợp tử hoặc kiểu gen FcγRIIIa-V/V158 đồng hợp tử. Tất cả kháng TfR của người được thử nghiệm là lưỡng đặc hiệu với kháng gD, trên ba mạch khung Ig khác nhau: IgG1 của người kiểu dại, IgG1 của người với đột biến N297G, và IgG4 của người. Kháng thể kháng Abeta với mạch khung IgG4 của người cũng được thử nghiệm, và kháng HLA của người của chuột (lớp I) được dùng làm đối chứng dương tính. Các kết quả được thể hiện trên

Fig.9A và Fig.9B. Như dự đoán dựa trên liên quan đã biết giữa hoạt hoá tế bào hiệu ứng và kiểu gen V/V158 (Bowles và Weiner 2005), hoạt tính ADCC được thể hiện mạnh hơn bởi các PBMC người cho V/V158 (~ 45% các tế bào đích bị tác động) so với các người cho F/V158 (~ 25% các tế bào đích bị tác động) (so sánh Fig.9A với Fig.9B). Kháng TfR/gD với IgG1 kiểu dại gây cảm ứng ADCC mạnh trong các tế bào HEL, trong khi kháng TfR/gD với IgG1 không có chức năng hiệu ứng không thể hiện hoạt tính ADCC bất kỳ trong các tế bào HEL, lặp lại các kết quả từ loạt thử nghiệm thứ nhất. Đáng chú ý là, ở các nồng độ=100 ng/mL hoặc cao hơn, kháng TfR/gD lớp kháng thể IgG4 thể hiện hoạt tính ADCC nhẹ. Hoạt tính này không được nhận thấy trong các kết quả của IgG4 kháng Abeta, điều này cho thấy là gắn kết TfR là cần thiết cho hoạt tính ADCC. Khám phá này phù hợp với các báo cáo là IgG4 có chức năng hiệu ứng tối thiểu nhưng có thể đo xác định được (J. Neurosci. 32(28):9677-9689 (2012) của Adolffson et al.; Clin Exp. Immunol. 64: 415-422 (1986) của van der Zee et al.); J. Exp. Med. 173:1025-1028 (1991) của Tao et al.).

Ví dụ 5: Đánh giá các kháng thể lưỡng đặc hiệu kháng-TfR/BACE1 của người lưỡng đặc hiệu in vivo

Nghiên cứu dược động học, dược lực học và tính an toàn

Để đánh giá nồng độ thuốc, các tác dụng dược lực học, và tính an toàn của các kháng thể kháng TfR của người lưỡng hiệu *in vivo*, khỉ Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) được cho dùng liều các kháng thể lưỡng hiệu bằng cách sử dụng dòng kháng thể kháng TfR 15G11 ghép cặp với cùng nhánh kháng BACE1 được sử dụng trong các ví dụ nêu trên (kháng TfR^1/BACE1), hoặc dòng 15G11.LC92A ghép cặp với cùng nhánh kháng BACE1 được sử dụng trong các ví dụ nêu trên (kháng TfR^2/BACE1) hoặc Hu15G11.N52A (kháng TfR^{52A}/BACE1) và Hu15G11.T^{53A} (kháng TfR^{53A}/BACE1). Các kháng thể lưỡng hiệu này theo định dạng IgG1 của người với các đột biến N297G hoặc D265A và N297G huỷ bỏ chức năng hiệu ứng, như nêu trên. Để làm đối chứng, sử dụng phân tử kháng gD trên IgG1 của người. Tiến hành nghiên cứu này ở các động vật linh trưởng không phải là người do tính phản ứng chéo của các kháng thể kháng TfR này bị hạn chế ở các động vật linh trưởng không phải là người và con người. Ngoài ra, các nghiên cứu đã chứng tỏ là cơ chế vận chuyển thuốc giữa dịch não tuỷ (CSF) và các khoang huyết tương có thể tương tự nhau giữa con người và các động vật linh trưởng (Poplack et al., 1977). Các kháng thể được sử dụng

bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV) liều duy nhất vào tĩnh mạch hiển ở liều dùng 30mg/kg cho khỉ Cynomolgus thức tỉnh với ống thông dẫn vào bể lớn. Ở nhiều thời điểm cho đến 60 ngày sau khi tiêm, lấy mẫu huyết tương, huyết thanh và (CSF). Phân tích mẫu bao gồm huyết học (máu toàn phần), hoá học lâm sàng (huyết thanh), nồng độ kháng thể (huyết thanh và CSF), và đáp ứng dược lực học với kháng thể này (huyết tương và CSF). Chi tiết việc lấy mẫu xem Fig.10.

Nồng độ các kháng thể đã tiêm trong huyết thanh và CSF của khỉ Cynomolgus được xác định bằng ELISA bằng cách sử dụng lớp phủ kháng thể được hấp phụ ở khỉ IgG của cừu kháng người, tiếp đó thêm vào các mẫu huyết thanh bắt đầu ở dịch pha loãng 1:100, và kết thúc bằng cách thêm kháng thể IgG của dê kháng người được tiếp hợp với peroxidaza củ cải ngựa được hấp phụ ở khỉ để phát hiện. Thử nghiệm có khoảng nồng độ đường cong chuẩn độ là 0,78-50ng/mL và ngưỡng phát hiện là 0,08µg/mL. Các kết quả dưới ngưỡng phát hiện này được ghi nhận là < ngưỡng có thể ghi nhận (LTR).

Fig.11A-Fig.11B thể hiện các kết quả của phân tích dược động học cho kháng TfR1/BACE1 và kháng TfR2/BACE1. Profin dược động học cho kháng gD là như kỳ vọng cho kháng thể IgG1 của người thông thường ở khỉ Cynomolgus với độ thanh thải trung bình 3,98mL/ngày/kg. Cả hai kháng thể kháng TfR/BACE1 thanh thải nhanh hơn so với kháng gD, có thể là do thanh thải qua trung gian đích ngoại vi. Kháng TfR1/BACE1 có mức độ thanh thải nhanh nhất, phù hợp với việc kháng thể này có ái lực gắn kết cao nhất với TfR, trong khi đó kháng TfR2/BACE1 thể hiện profin dược động học được cải thiện (có nghĩa là, nồng độ kéo dài trong huyết thanh) so với kháng TfR1/BACE1, có thể là do ái lực của nó với TfR giảm đi. Độ thanh thải của kháng TfR1/BACE1 và kháng TfR2/BACE1 tương ứng là 18,9mL/ngày/kg và 8,14mL/ngày/kg. Tất cả các kháng thể được phát hiện trong CSF ở khoảng một phần nghìn nồng độ huyết thanh. Tuy nhiên, có khoảng biến thiên rộng, và tổng thể không có mức chênh lệch có thể phát hiện được về nồng độ kháng thể trong CSF giữa các phân tử.

Bảng 10: Giá trị trung bình (± SD) thông số dược động học ước tính cho tất cả các kháng thể thử nghiệm sau khi tiêm tĩnh mạch liều duy nhất ở 30mg/kg ở khỉ Cynomolgus (n=5)

Kháng thể	AUC_{all} (ngày*µg/mL)	AUC_{inf} (ngày*µg/mL)	C_{max} (µg/mL)	CL (mL/ngày/kg)	V_{ss} (mL/kg)
kháng gD	7640±1790	7930 ± 1910	912±141	3,98±1,05	51,3±10,2
kháng TfR^1/BACE1	1610±240	1610±237	809±132	18,9 ± 2,54	41,0±8,18
kháng TfR^2/BACE1	3750±528	3750±530	850±69,2	8,14±1,21	41,2±6,06

SD = độ lệch chuẩn; AUC_{all} = diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm nồng độ cuối cùng có thể đo được; AUC_{inf} = diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian được ngoại suy đến vô tận; C_{max} = nồng độ trong huyết thanh tối đa được nhận thấy; CL = độ thanh thải; V_{ss} = thể tích phân bố ở trạng thái ổn định; Min = tối thiểu; Max = tối đa

Fig.19 thể hiện các kết quả phân tích dược động học cho kháng TfR^1/BACE1, kháng TfR^{52A}/BACE1 và kháng TfR^{53A}/BACE1. Tất cả các kháng thể kháng TfR/BACE1 thanh thải nhanh hơn so với kháng gD, có thể là do thanh thải qua trung gian đích ngoại vi. Kháng TfR^1/BACE1 có mức độ thanh thải nhanh nhất, phù hợp với việc kháng thể này có ái lực gắn kết cao nhất với TfR, trong khi đó kháng TfR^{52A}/BACE1 và kháng TfR^{53A}/BACE1 thể hiện profin dược động học được cải thiện (có nghĩa là, phơi nhiễm kéo dài trong huyết thanh) so với kháng TfR^1/BACE1, có thể là do ái lực với TfR của kháng TfR^{52A}/BACE1 và kháng TfR^{53A}/BACE1 giảm đi.

Để quan sát tác dụng dược lực học đáp ứng với việc sử dụng kháng TfR/BACE1, các tác giả sáng chế đã xác định các nồng độ $Abeta_{1-40}$ và APPα hoà tan và APPβ hoà tan trong huyết tương và CSF của khỉ Cynomolgus. $Abeta_{1-40}$ được xác định bằng ELISA bằng cách sử dụng lớp phủ kháng thể đa dòng đặc hiệu kháng $Abeta_{1-40}$, tiếp đó thêm các mẫu thử vào, và kết thúc bằng cách cho thêm kháng thể đơn dòng kháng $Abeta_{1-40}$ của người của chuột được tiếp hợp với peroxidaza củ cải ngựa để phát hiện. Thử nghiệm này có ngưỡng phát hiện 60pg/mL cho huyết tương và 140pg/mL cho CSF. Các kết quả < nồng độ này được báo cáo là < ngưỡng có thể được ghi nhận (LTR). Các nồng độ trong CSF của APPα hoà tan và APPβ hoà tan được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Multi-spot sAPPα/sAPPβ (Mesoscale Discovery

(Gaithersburg, MD)). CSF được làm tan băng, tiếp đó pha loãng 1:10 trong BSA 1% trong TBS-T (10mM dịch đệm Tris, pH 8,0, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20). Tiến hành thử nghiệm theo quy trình của nhà sản xuất. Thử nghiệm có ngưỡng định lượng dưới 0,05ng/ml đối với APPα hoà tan và 0,03ng/mL đối với APPβ hoà tan.

Fig.12A-Fig.12E tóm tắt biểu hiện dược lực học của các kháng thể. Ở vùng ngoại biên, nồng độ $Abeta_{1-40}$ trong huyết tương duy trì không thay đổi sau khi sử dụng kháng gD, nhưng giảm đi nhất thời sau khi sử dụng kháng TfR/BACE1. Cả hai biến thể làm giảm nồng độ $Abeta_{1-40}$ trong huyết tương, với mức ức chế tối đa 50% đạt được 1 ngày sau khi tiêm. Nồng độ $Abeta_{1-40}$ trong huyết tương phục hồi từ từ, với con khỉ đã dùng kháng TfR^1/BACE1 trở về mức nồng độ $Abeta_{1-40}$ trong huyết tương khoảng 14 ngày sau khi tiêm. Nồng độ $Abeta_{1-40}$ trong huyết tương trở về mức cơ sở khoảng 21 và 30 ngày sau khi tiêm ở khỉ được điều trị bằng kháng TfR^2/BACE1. Cả hai kháng thể kháng TfR/BACE1 làm giảm nồng độ $Abeta_{1-40}$ trong CSF, trong đó không nhận thấy có thay đổi ở khỉ được tiêm kháng gD. Việc sử dụng kháng TfR^1/BACE1 dẫn đến giảm đáng kể nồng độ $Abeta_{1-40}$ trong CSF (mức ức chế tối đa trung bình = 50% mức cơ sở) so với kháng TfR^2/BACE1 (mức ức chế tối đa trung bình 20% mức cơ sở). Sản sinh APPβ hoà tan bị ức chế ở khỉ được điều trị bằng kháng TfR/BACE1, nhưng không bị ức chế ở khỉ dùng kháng gD. Tương tự như các kết quả đối với Aβ40, kháng TfR^1/BACE1 có tác dụng ức chế mạnh hơn lên sản sinh APPβ hoà tan so với kháng TfR^2/BACE1. Sự sản sinh APPα hoà tan được kích thích trong khi ức chế BACE1 bởi cả hai kháng TfR^1/BACE1 và kháng TfR^2/BACE1, và đáp ứng này tỷ lệ nghịch với nồng độ ức chế được nhận thấy đối với APPβ hoà tan và $Abeta_{1-40}$. APPα hoà tan và APPβ hoà tan là các sản phẩm chế biến cấp một của protein tiền chất amyloit (APP), và nồng độ của chúng rất tương quan với nhau. Tỷ lệ APPβ hoà tan /APPα hoà tan chuẩn hoá các kết quả theo các thay đổi tiềm ẩn ở biểu hiện APP mức cơ sở hoặc chênh lệch trước khi phân tích tiềm ẩn trong tập hợp CSF và việc xử lý trong quá trình nghiên cứu. Tỷ lệ APPβ hoà tan/APPα hoà tan trong CSF với kháng TfR^1/BACE1 chứng tỏ tác dụng dược lực mạnh hơn so với kháng TfR^2/BACE1. Do đó, các kết quả này chứng tỏ gắn kết đích (có nghĩa là BACE1) bởi các kháng thể kháng TfR/BACE1.

Đáp ứng dược lực học của kháng TfR^{52A}/BACE1 và kháng TfR^{53A}/BACE1 cũng tương quan với thời gian kéo dài nồng độ của kháng thể và nhánh TfR ái lực

giảm đi thể hiện sự giảm độ gia tăng $A\beta_{40}$ (dữ liệu không được thể hiện). Dữ liệu cũng chứng tỏ gắn kết đích bởi các kháng thể lưỡng hiệu này.

Tóm lại, các kết quả này gợi ý là kháng thể kháng TfR/BACE1 lưỡng hiệu với ái lực với TfR của người trong khoảng ái lực của kháng TfR^1/BACE1 và kháng TfR^2/BACE1 có thể có sự cân đối giữa dược động học/dược lực học mong muốn.

Không nhận thấy có các dấu hiệu về an toàn trong nghiên cứu này. Không có tác dụng rõ rệt lên các thông số huyết học hoặc hoá học lâm sàng bất kỳ của khỉ dùng liều 30mg/kg kháng thể lưỡng hiệu cho đến 60 ngày sau khi tiêm. Điều quan trọng là, số lượng hồng cầu không bị ảnh hưởng bởi việc điều trị bằng kháng TfR^1/BACE1 hoặc kháng TfR^2/BACE1 (Fig.13), như mong đợi, do các kháng thể này có chức năng hiệu ứng giảm đi và số lượng hồng cầu lưới mới vào máu toàn phần có các mức TfR cao là rất thấp ở các động vật linh trưởng bình thường (xem Ví dụ 4).

Ví dụ 6: đánh giá các kháng thể lưỡng đặc hiệu kháng-TfR/BACE1 của người lưỡng đặc hiệu in vivo

Để xem xét mối liên quan giữa dược lực học của kháng thể trong CSF và dược động học trong não, khỉ Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) được cho dùng liều các kháng thể lưỡng đặc hiệu kháng TfR^1/BACE1 hoặc kháng TfR^2/BACE1, như trong ví dụ nêu trên. Các kháng thể lưỡng đặc hiệu này theo định dạng IgG1 của người với các đột biến D265A và N297G huỷ bỏ chức năng hiệu ứng. Để làm đối chứng, sử dụng phân tử kháng gD trên IgG1 của người. Để so sánh, cũng cho dùng liều kháng thể kháng BACE1 hoá trị hai, dòng này cũng được sử dụng cho các kháng thể lưỡng đặc hiệu. Các kháng thể được sử dụng bằng cách tiêm tĩnh mạch (IV) liều duy nhất vào tĩnh mạch hiển ở liều dùng 30mg/kg cho khỉ Cynomolgus thức tỉnh bằng ống thông dẫn vào bể lớn. Lấy các mẫu CFS mức cơ sở 24 và 48 giờ trước khi tiêm, và lấy một mẫu CSF khác 24 giờ sau khi tiêm (như thể hiện trên Fig.14). Sau khi lấy mẫu CSF 24 giờ sau khi tiêm, các con khỉ được truyền nước muối và lấy mẫu não để phân tích nồng độ kháng thể. Các vùng não khác nhau được đồng thể hoá trong 1% NP-40 (Cal-Biochem) trong PBS có chứa các viên nén cocktail chất ức chế proteaza không có EDTA Complete Mini (Roche Diagnostics). Các mẫu não đã được đồng thể hoá được lắc xoay tròn ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ trước khi lắc ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 20 phút. Phân tách dịch nổi để đo nồng độ kháng thể trong não, bằng cách sử dụng

phương pháp ELISA được mô tả trong ví dụ nêu trên. Lấy mẫu máu để xác nhận nồng độ trong máu ngoại vi và các đáp ứng dược lực học, tương tự như các kết quả nhận thấy trong Ví dụ 5.

Các tác dụng dược lực học của kháng TfR^1/BACE1 và kháng TfR^2/BACE1 như được đánh giá trong CSF cũng tương tự như các tác dụng nhận thấy trong ví dụ nêu trên. Fig.15 chứng tỏ tỷ lệ APPβ hoà tan/APPα hoà tan trong CSF giảm mạnh sau khi tiêm kháng TfR^1/BACE1. Kháng TfR^2/BACE1 không thể hiện giảm rõ rệt 24 giờ sau khi tiêm trong nghiên cứu này. Kháng BACE1 cũng thể hiện không có tác dụng. Phân tích các nồng độ của kháng thể trong não cho thấy cả IgG đối chứng và kháng thể kháng BACE1 có hấp thu hạn chế vào não, ở các nồng độ chỉ xấp xỉ ngưỡng phát hiện trong thử nghiệm này (trung bình ~670pM). Kháng TfR^2/BACE1 có độ hấp thu vào não được cải thiện ~3-lần so với IgG đối chứng (trung bình~2nM), và kháng TfR^1/BACE1 có độ hấp thu vào não cao nhất, ~15-lần > IgG đối chứng (trung bình~10nM). Các nồng độ kháng thể trong não của các kháng thể khác nhau tương quan với đáp ứng dược lực học nhận thấy trong CSF trong các nghiên cứu này, với kháng TfR^1/BACE1 có độ hấp thu vào não tốt nhất và tác dụng dược lực học mạnh nhất, và kháng TfR^2/BACE1 có độ hấp thu vào não thấp hơn và tác dụng khiêm tốn hơn.

Các kết quả này mở rộng các khám phá trước đây của các tác giả sáng chế chứng tỏ là các kháng thể lưỡng đặc hiệu gắn kết TfR cải thiện hấp thu vào não của các động vật linh trưởng không phải là người. Ở các động vật linh trưởng, như ở chuột, có thể có ái lực tối ưu với TfR, sự tối ưu này cân đối tốt nhất giữa hấp thu vào não và độ thanh thải qua trung gian TfR. Trong ví dụ này, kháng TfR^1/BACE1 ái lực cao hơn chứng tỏ sự hấp thu vào não tốt, và bị ảnh hưởng bởi sự thanh thải qua trung gian đích ngoại vi. TfR^2/BACE1 ái lực giảm đi có cải thiện các tính chất thanh thải, nhưng dường như có mức gắn kết thấp với TfR này là không thể được vận chuyển có hiệu quả bởi TfR (cũng theo cách này kháng thể kháng TfR ái lực thấp nhất TfR^E trong US2012/0171120 vượt qua ngưỡng ái lực nhất định, ngoài ngưỡng này ái lực sẽ quá thấp để cho phép sự tương tác đủ giữa kháng thể này và TfR sao cho kháng thể này vẫn được liên hợp với TfR khi TfR bắt đầu quá trình chuyển vị). Từ các kết quả của thử nghiệm này, kháng thể lưỡng đặc hiệu TfR/BACE1 kháng người-khỉ Cynomolgus có ái lực với TfR trong khoảng ái lực của TfR^1 và TfR^2 được dự đoán có độ hấp thu và

các tính chất thanh thải được cải thiện so với kháng TfR^1/BACE1 hoặc kháng TfR^2/BACE1 ở hệ này.

Ví dụ 7: Tạo ra các đột biến không còn chức năng hiệu ứng khác nữa ở kháng thể thụ thể transferrin lưỡng đặc hiệu

Các đột biến kháng trong vùng Fc, mà làm huỷ bỏ chức năng hiệu ứng ngoài N297G và D265A được thử nghiệm về khả năng giảm thiểu hoặc ngăn ngừa suy kiệt hồng cầu lưới biểu hiện TfR của chúng. Cụ thể là, các đột biến trong vùng Fc L234A, L235A và P329G ("LALAPG") được mô tả trong Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2012/0251531, được viện dẫn ở đây để tham khảo, được hợp nhất vào kháng thể kháng TfR^D/BACE1 (được mô tả trong WO 2013/177062, và được viện dẫn ở đây để tham khảo).

Tiến hành phân tích dược động học và đếm số lượng hồng cầu lưới sau khi sử dụng kháng thể đơn nhất ở chuột như sau. Chuột nhắt C57B/6 giống cái, kiểu dại, 6-8 tuần tuổi được sử dụng cho tất cả các nghiên cứu. Chăm sóc chuột theo hướng dẫn. Chuột nhắt được tiêm tĩnh mạch liều duy nhất 50mg/kg kháng thể kháng gD (IgG2a của chuột) với các đột biến LALAPG, kháng thể kháng TfR^D/BACE1 (khảm của chuột cống/chuột nhắt) với các đột biến LALAPG. Thể tích tiêm tổng cộng không quá 250µL và các kháng thể được pha loãng trong D-PBS nếu cần thiết (Invitrogen). Sau 24 giờ, gom máu toàn phần trước khi truyền trong các ống vi lượng EDTA (BD Diagnostics), để yên trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, và ly tâm ở tốc độ 50000 m/s^2 trong 10 phút. Lớp phía trên của huyết tương được chuyển sang các ống nghiệm mới để đo nồng độ kháng thể.

Nồng độ kháng thể toàn phần trong huyết tương chuột được xác định bằng cách sử dụng ELISA IgG2a kháng chuột (alen chuỗi kháng thể a)/IgG2a kháng chuột (alen chuỗi kháng thể a). Các đĩa miễn dịch Maxisorp NUNC 384 lỗ (Neptune, NJ) được phủ bằng IgG2a kháng chuột alen chuỗi kháng thể A, kháng thể đặc hiệu alen chuỗi kháng thể A (BD/Pharmigen San Jose, CA), qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Phong bế các đĩa bằng PBS, 0,5% BSA trong 1 giờ ở nhiệt độ 25°C. Mỗi kháng thể (kháng gD và các biến thể lưỡng đặc hiệu kháng TfR/BACEl) được sử dụng làm chất chuẩn để định lượng nồng độ kháng thể tương ứng. Rửa các đĩa bằng PBS, 0,05% Tween-20 bằng cách sử dụng thiết bị rửa đĩa vi chuẩn độ (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT),

và mẫu chuẩn và mẫu thử được pha loãng trong PBS có chứa 0,5% BSA, 0,35M NaCl, 0,25% CHAPS, 5mM EDTA, 0,2% BgG, 0,05% Tween-20 và 15ppm Proclin® (Sigma-Aldrich) được thêm vào trong 2 giờ ở nhiệt độ 25°C. Phát hiện kháng thể đã gắn kết bằng IgG2a kháng chuột của chuột được tiếp hợp biotin alen chuỗi kháng thể A, kháng thể đặc hiệu alen chuỗi kháng thể A (BD/Pharmigen San Jose, CA). Phát hiện kháng thể được tiếp hợp biotin đã gắn kết bằng streptavidin được tiếp hợp peroxidaza củ cải ngựa (GE Helathcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Các mẫu được phát triển bằng cách sử dụng 3,3',5,5'-tetrametyl benzidin (TMB) (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) và độ hấp thụ được xác định ở 450nM trên thiết bị đọc Multiskan Ascent (Thermo Scientific, Hudson, NH). Các nồng độ được xác định từ đường cong chuẩn độ bằng cách sử dụng chương trình hồi quy không tuyến tính bốn tham số. Thử nghiệm này có ngưỡng định lượng dưới là 78,13ng/ml trong huyết tương. Phân tích thống kê mức chênh lệch giữa các nhóm thử nghiệm bằng cách sử dụng kiểm định t hai đuôi không đối xứng.

Khi sử dụng các kháng thể kháng TfR^D/BACE1 có chứa các đột biến LALAPG trong Fc, chuột nhắt không biểu hiện các triệu chứng lâm sàng như đã nhận thấy trước đó bằng cách sử dụng các kháng thể với chức năng hiệu ứng đầy đủ. Xem *Sci. Trans. Med.* 5:183ra57 (2013) Couch *et al.*, Fig.20 thể hiện các kết quả của phân tích dược động học.

Ngoài ra, số lượng hồng cầu lưới chưa trưởng thành và toàn phần được xác định bằng cách sử dụng Sysmex XT2000iV (Sysmex, Kobe, Japan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 24 giờ sau khi tiêm, không có khác biệt nhận thấy về số lượng hồng cầu lưới chưa trưởng thành hoặc số lượng hồng cầu lưới toàn phần với kháng thể bất kỳ được thử nghiệm như nhận thấy trên Fig.21. Các kết quả này gợi ý là đột biến LALAPG không chỉ huỷ bỏ chức năng hiệu ứng của kháng thể mà còn giảm thiểu sự gắn kết bổ thể và thanh thải hồng cầu lưới qua trung gian bổ thể được nhận thấy thậm chí với vùng khung kháng thể không có chức năng hiệu ứng (Couch *et al.* 2013). Điều này phù hợp với một báo cáo khác là hợp nhất đột biến LALA vào IgG1 của người có thể gây hạn chế sự gắn kết bổ thể (Nature 449:101-104 (2007) của Hessell *et al.*).

Ví dụ 8: Tạo ra các biến thể lưỡng đặc hiệu $FcRn^{cao}$

Để làm tăng thời gian bán thải của các kháng thể lưỡng đặc hiệu, và nhờ đó có thể tăng nồng độ của kháng thể trong não, các biến thể lưỡng đặc hiệu được tạo ra có

chứa các đột biến trong miền ổn định IgG và cụ thể là trong miền gắn kết thụ thể Fc-mới sinh (FcRn) (các đột biến $FcRn^{cao}$). Miền gắn kết FcRn có liên quan đến sự vận chuyển các kháng thể từ mẹ sang con. Xem *J. Exp. Med.*, 180:2377 2381, 1994 của Story *et al.*. Các thay thế axit amin trong miền gắn kết FcRn làm giảm ái lực của miền cố định với FcRn nhờ đó gia tăng thời gian bán thải của kháng thể.

Các đột biến miền gắn kết FcRn M252Y, S254T và T256E (YTE) đã được mô tả làm gia tăng gắn kết FcRn và do đó gia tăng thời gian bán thải của các kháng thể. Xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2003/0190311 và *J. Biol. Chem.* 281:23514-23524 (2006) của Dall'Acqua *et al.*. Ngoài ra, các đột biến miền gắn kết FcRn N434A và Y436I (AI) đã được mô tả cũng làm gia tăng gắn kết FcRn. *Xem J. Immunol.* 182: 7663-7671 (2009) của Yeung *et al.*. Các đột biến YTE (M252Y/S254T/T256E) và AI (N434/Y436I) được hợp nhất vào cả hai kháng thể lưỡng đặc hiệu kháng TfR^{52A}/BACE1 và kháng TfR^{2}/BACE1 có chứa IgG1 của người kiểu dại hoặc các đột biến LALAPG hoặc N297G không có chức năng hiệu ứng. Ngoài ra, đột biến $FcRn^{cao}$ được tạo ra trong kháng thể hIgG1 kháng gD để làm đối chứng. Xây dựng cấu trúc các đột biến bằng cách sử dụng gây đột biến Kunkel, các kháng thể được biểu hiện nhất thời trong các tế bào CHO, và các protein được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký protein A tiếp đó là sắc ký loại trừ kích cỡ (SEC).

Sự gắn kết của các kháng thể biến thể $FcRn^{cao}$ với FcRn được xác định bằng cách sử dụng BIAcore. Các protein FcRn của người và khỉ cynomolgus được biểu hiện ở CHO và tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký ái lực IgG. Thu thập dữ liệu trên thiết bị BIAcore T200. CM5 chíp cảm biến xêri S (GE Healthcare, Cat. BR100530) được hoạt hoá bằng chất thử EDC và NHS theo hướng dẫn của nhà cung cấp, và kháng thể kháng Fab (bộ bắt giữ Fab của người, GE Health care Bio-science. AB SE-75184, Upsala, Sweden) được ngẫu hợp để đạt đến khoảng 10000 đơn vị đáp ứng (RU), tiếp đó phong bế các nhóm chưa phản ứng bằng 1 Metanolamin. Để xác định ái lực, các kháng thể trước tiên được tiêm ở tốc độ 10µl/phút để bắt giữ khoảng 1000RU trên 3 tế bào đo dòng (FC) khác nhau, ngoại trừ FC1 (tham chiếu), và tiếp đó tiêm các dịch pha loãng theo dãy 2 lần FcRn của người (hoặc FcRn của khỉ) trong dịch đệm có độ pH = 6 (0,1M natri phosphat), từ nồng độ thấp (1nM) đến cao (25µM) (tốc độ chảy: 30µl/phút) lần lượt trong cùng chu trình không có tái tạo giữa các lần tiêm. Vẽ đồ thị theo mẫu tham chiếu và trừ kết quả của dịch đệm trước khi đánh giá bằng cách sử

dụng phần mềm đánh giá của BIAcore T200 (phiên bản 2.0). Xác định ái lực bằng cách phân tích mức gắn kết ở trạng thái ổn định dựa trên mô hình gắn kết 1:1. Ái lực gắn kết của các biến thể LALAPG, N297G, LALAPG.YTE, và LALAPG.AI của kháng TfR^{52A}/BACE1 được thể hiện trong Bảng 11 dưới đây. Dữ liệu thể hiện là các biến thể $FcRn^{cao}$ tăng cường ái lực ở nội bào (pH 6) với FcRn của người và khỉ Cynomolgus.

Bảng 11

Kháng thể	Chức năng hiệu ứng	FcRn cao	FcRn của người	FcRn của khỉ Cynomolgus
			KD ở pH6 (uM)	KD ở pH6 (uM)
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgG1	KIỂU DẠI	KIỂU DẠI		
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G	N297G	KIỂU DẠI	1,3	2,1
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgG1.LALAPG	LALAPG	KIỂU DẠI	0,8	1,2
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G.YTE	N297G	YTE		
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,2	0,2
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G.AI	N297G	N434A/Y436I		
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgLALAPG.AI	LALAPG	N434A/Y436I	0,6	0,4
Kháng TfR.52A/BACE1.hIgG1.N297G.A	N297G	N434A		
Kháng TfR2/BACE1.hIgG1.N297G	N297G	KIỂU DẠI	1,7	2,1
Kháng TfR2/BACE1.hIgG1.LALAPG	LALAPG	KIỂU DẠI	1,1	1,2
Kháng TfR2/BACE1.hIgG1.LALAPG.YTE	LALAPG	YTE	0,3	0,2

Kháng gD.hIgG1	KIỂU DẠI	KIỂU DẠI	0,7	0,9
Kháng gD.hIgG1.YTE	KIỂU DẠI	YTE		
Kháng gD.hIgG1.AI	KIỂU DẠI	N434A/Y436I	0,3	0,4
Kháng gD.hIgG1.A	KIỂU DẠI	N434A	0,1	0,7

Các biến thể FcRnHIGH chọn lọc sẽ được thử nghiệm ở khỉ Cynomologus để xác định liệu tăng cường ái lực với FcRn có thể gia tăng cải thiện các tính chất dược động học và/hoặc gia tăng nồng độ của các kháng thể kháng TfR/BACE1 trong não.

Để đánh giá tính an toàn của các đột biến không có chức năng hiệu ứng và $FcRn^{cao}$, các kháng thể lưỡng hiệu được sử dụng cho chuột ghép gen thụ thể transferrin của người biểu hiện thụ thể transferrin của người (huTfR). Chuột ghép gen huTfR được tạo ra như sau. Cấu trúc hướng đích ADN bổ trợ TfR*C* của người vào locus C57BL/6 *Tfrc* ở các tế bào gốc từ phôi (ES) được tạo ra bằng cách sử dụng tổ hợp các kỹ thuật tái tổ hợp (Molecular và Cellular Biology vol. 26 (18) pp. 6913-22 2006 Warming *et al.*; Genome Research (2003) vol. 13 (3) pp. 476-84 của Liu *et al*) và kỹ thuật tách dòng phân tử tiêu chuẩn.

Vắt tắt là, cat-xet (ADN bổ trợ TfRC của người, SV40 pA, và frt-PGK-em7-Neo-BGHpA-frt) đã ghép hai bên sườn bằng các đoạn tương đồng ngắn với gen *Tfrc* của chuột được sử dụng để cải biến *Tfrc* C57BL/6J BAC (RP23 BAC library) bằng cách tái tổ hợp. Cat-xet ADN bổ trợ TfRC của người được cài xen ở ATG nội sinh và phần còn lại của *Tfrc* exon 2 + đoạn bắt đầu của intron 2 được khuyết đoạn. Vùng hướng đích trong BAC tiếp đó được truy nhập vào pBlight-TK (Molecular and Cellular Biology vol. 26 (18) pp. 6913-22 2006 của Warming *et al.*) cùng với các trình tự *Tfrc* của hệ gen bên sườn như là các nhánh tương đồng để hướng đích tế bào ES. Cụ thể là, nhánh tương đồng 2950 cặp bazơ đầu 5' tương ứng với (thể ghép NCBI37/mm9): chr.16:32,610,333-32,613,282 và nhánh tương đồng 2599 cặp bazơ đầu 3' tương ứng với chr.16:32,613,320-32,615,918. Vectơ cuối cùng được xác nhận bằng cách xác định trình tự ADN.

Vectơ Tfrc/TFRC KI được sắp xếp thẳng hàng trình tự bằng NotI và các tế bào gốc từ phôi (ES) C57BL/6N C2 được hướng đích bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn (chọn lọc dương tính G418 và âm tính gancyclovir). Các dòng dương tính

được nhận biết bằng cách sử dụng PCR và phân tích taqman, và xác nhận bằng cách xác định trình tự locus được cải biến. Các tế bào ES đã hướng đích chính xác được chuyển nhiễm với plasmit Flpe để loại bỏ Neo và các tế bào ES tiếp đó được tiêm vào túi phôi bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn. Truyền nhiễm dòng tế bào mầm đạt được sau khi lai chéo các thể khảm thu được với chuột cái C57BL/6N.

Cụ thể là, các kháng thể nêu trong bảng dưới đây được sử dụng cho chuột ghép gen huTfR ở liều duy nhất 50mg/kg và 24 giờ sau đó, lấy mẫu máu và hồng cầu lưới. huIg1, N297G

Bảng 12

Kháng thể	Lớp kháng thể	Số lượng chuột
Kháng gD	huIg1, N297G	6
kháng TfR^{52A}/BACE1	huIgG1, N297G	6
kháng TfR^{52A}/BACE1	huIgG1, LALAPG	6
kháng TfR^{52A}/BACE1	huIgG1, LALAPG/YTE	6
kháng TfR^{52A}/BACE1	huIgG1, LALAPG/AI	6

Sau khi sử dụng các kháng thể kháng TfR^{52A}/BACE1 LALAPG, LALAPG/YTE hoặc LALAPG/AI (các nhóm 3-5 trong Bảng 12), chuột ghép gen TfR của người không biểu hiện các triệu chứng lâm sàng hoặc không mất hồng cầu lưới (Fig.22) như được nhận thấy trước đó bằng cách sử dụng các kháng thể kháng TfR có chức năng hiệu ứng đầy đủ (Couch *et al.* 2013). Các kết quả này cho thấy là hợp nhất đột biến LALAPG vào vùng khung IgG1 của người cũng loại bỏ chức năng hiệu ứng, và còn gợi ý là bổ sung thêm các đột biến YTE hoặc AI $FcRn^{cao}$ không ảnh hưởng đến các tính chất mong muốn của các đột biến LALAPG nhằm làm cho kháng thể này không còn chức năng hiệu ứng.

Cũng tiến hành các thử nghiệm ADCC để xác nhận trình trạng không có chức năng hiệu ứng của các tổ hợp đột biến LALAPG, LALAPG/YTE, và LALAPG/AI ở dòng tế bào thu được từ người. Như trước đó, dòng tế bào chứng tăng hồng cầu bạch cầu của người (HEL, ATCC) được sử dụng làm các tế bào đích với các PBMC từ người cho khoẻ mạnh mang kiểu gen F/V158 hoặc kiểu gen FcγRIIIA V/V158. Kiểu

gen V/V158 cũng được bao gồm trong thử nghiệm này do mối liên quan đã biết với hoạt tính ADCC qua trung gian tế bào giết tự nhiên gia tăng cũng như khả năng gắn kết các kháng thể IgG4 (Bowles và Weiner, 2005; Bruhns et al. 2008). Các tế bào được đếm số lượng và xác định khả năng sống còn bằng Vi-CELL® (Beckman Coulter; Fullerton, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các PBMC được phân lập bằng cách ly tâm gradien tỷ trọng bằng cách sử dụng ống nghiệm tách máu Uni-Sep™ (Accurate Chemical & Scientific Corp.; Westbury, NY). Các tế bào đích trong 50µl môi trường thử nghiệm (RPMI-1640 với BSA 1% và 100 đơn vị/mL penixilin và streptomyxin) được gây giống trong đĩa 96 lỗ, đáy tròn ở 4 x 10^4/lỗ. Các dịch pha loãng theo dãy chứa các kháng thể thử nghiệm và đối chứng (50µl/lỗ) được thêm vào các đĩa có chứa các tế bào đích, tiếp đó ủ ở nhiệt độ 37°C với 5% CO_2 trong 30 phút để cho phép opsonin hoá. Nồng độ cuối cùng của các kháng thể nằm trong khoảng từ 0,0051 đến 10.000ng/mL sau khi pha loãng theo dãy 5 lần cho tổng cộng 10 điểm lấy dữ liệu. Sau khi ủ, 1,0 x 10^6 tế bào hiệu ứng PBMC trong 100µl môi trường thử nghiệm được thêm vào mỗi lỗ để có tỷ lệ tế bào hiệu ứng:tế bào đích 25:1, và ủ các đĩa thêm 4 giờ. Ly tâm các đĩa khi kết thúc quá trình ủ và thử nghiệm các dịch nổi về hoạt tính lactat dehydrogenaza (LDH) bằng cách sử dụng Cytotoxicity Detection Kit™ (Roche Applied Science; Indianapolis, IN). Thêm hỗn hợp phản ứng LDH vào các dịch nổi và ủ các đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút kèm theo lắc liên tục. Ngừng phản ứng bằng 1M H_3PO_4, và xác định độ hấp thụ ở 490nM (mức nền, được xác định ở 650nM được trừ đi cho mỗi lỗ) bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa vi chuẩn độ SpectraMax Plus. Độ hấp thụ của các lỗ chỉ chứa các tế bào đích được dùng làm đối chứng cho mức nền (đối chứng mức thấp), trong khi đó các lỗ có chứa các tế bào đích được phân giải bằng Triton-X100 cho tín hiệu tối đa sẵn có (đối chứng mức cao). Độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (AICC) được xác định trong các lỗ có chứa các tế bào đích và hiệu ứng mà không có bổ sung thêm kháng thể. Mức độ ADCC cụ thể được tính như sau:

$$\% \text{ ADCC} = 100 \times \frac{A_{490} \text{ (Mẫu)} - A_{490} \text{ (AICC)}}{A_{490} \text{ (Đối chứng mức cao)} - A_{490} \text{ (Đối chứng mức thấp)}}$$

Vẽ đồ thị các giá trị ADCC của dịch pha loãng mẫu thử theo nồng độ kháng thể, và khớp đường cong đồ thị đáp ứng liều dùng vào mô hình bốn tham số bằng cách sử dụng SoftMax Pro.

Các kết quả của thử nghiệm ADCC được thể hiện trên Fig.23. Như mong đợi, kháng thể kháng TfR của người có chức năng hiệu ứng (IgG1 kháng TfR^1/gD kiểu dại) thể hiện hoạt tính ADCC đáng kể lên các tế bào HEL. Trái lại, các biến thể kháng thể kháng TfR^{52A}/BACE1 có chứa các đột biến LALAPG, LALAPG/YTE, hoặc LALAPG/AI không thể hiện hoạt tính ADCC ở các tế bào HEL, tương tự như mẫu đối chứng âm tính kháng thể kháng TfR^{52A}/gD N297G.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết bằng cách minh hoạ và ví dụ nhằm mục đích làm rõ, bản mô tả này và các ví dụ không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Các tài liệu viện dẫn nêu trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập gắn kết với thụ thể transferrin của người (TfR) và TfR của động vật linh trưởng, trong đó kháng thể này không ức chế sự gắn kết của transferrin với TfR, trong đó kháng thể này bao gồm lần lượt HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3, và HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3, bao gồm các trình tự axit amin của:

a) SEQ ID NO: 53, 54 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 52;

b) SEQ ID NO: 53, 156 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 52;

c) SEQ ID NO: 53, 157 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 52; hoặc

d) SEQ ID NO: 53, 54 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 155.

2. Kháng thể được phân lập gắn kết với TfR của người và TfR của động vật linh trưởng, trong đó kháng thể này không ức chế sự gắn kết của transferrin với TfR, và trong đó một hoặc nhiều đặc tính của kháng thể đã được cải biến để giảm thiểu hoặc loại bỏ tác động của kháng thể lên hồng cầu lưới và/hoặc giảm mức độ nghiêm trọng hoặc sự xuất hiện của các triệu chứng lâm sàng cấp tính ở một đối tượng hoặc động vật có vú được điều trị bằng kháng thể này, trong đó kháng thể này bao gồm lần lượt HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3, và HVR-L1, HVR-L2 và HVR-L3, bao gồm các trình tự axit amin của:

a) SEQ ID NO: 53, 54 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 52;

b) SEQ ID NO: 53, 156 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 52;

c) SEQ ID NO: 53, 157 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 52; hoặc

d) SEQ ID NO: 53, 54 và 55, và SEQ ID NO: 50, 51 và 155.

3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là kháng thể của người, kháng thể được nhân tính hóa hoặc kháng thể khảm.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này là mảnh kháng thể gắn kết với TfR của người và TfR của động vật linh trưởng.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này bao gồm:

a) trình tự VH có mức tương đồng trình tự ít nhất 95% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 108, 153, hoặc 154; hoặc

b) trình tự VL có mức tương đồng trình tự ít nhất 95% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 105 hoặc 151; hoặc

c) trình tự VH như trong (a) và trình tự VL như trong (b); hoặc

d) trình tự VH của SEQ ID NO: 108, 153, hoặc 154; hoặc

e) trình tự VL của SEQ ID NO: 105 hoặc 151.

7. Kháng thể bao gồm:

a) trình tự VH của SEQ ID NO:108 và trình tự VL của SEQ ID NO:105;

b) trình tự VH của SEQ ID NO: 153 và trình tự VL của SEQ ID NO: 105;

c) trình tự VH của SEQ ID NO: 154 và trình tự VL của SEQ ID NO: 105;

d) trình tự VH của SEQ ID NO: 108 và trình tự VL của SEQ ID NO: 151.

8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7, trong đó một hoặc nhiều đặc tính được chọn từ chức năng hiệu ứng của vùng Fc của kháng thể, chức năng hoạt hoá bổ thể của kháng thể, thời gian bán thải của kháng thể và ái lực của kháng thể với TfR.

9. Kháng thể theo điểm 8, trong đó một hoặc nhiều đặc tính được chọn từ chức năng hiệu ứng của vùng Fc của kháng thể và chức năng hoạt hoá bổ thể của kháng thể, và trong đó chức năng hiệu ứng hoặc chức năng hoạt hoá bổ thể đã được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ so với kháng thể kiểu dại có cùng lớp kháng thể.

10. Kháng thể theo điểm 9, trong đó chức năng hiệu ứng được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ bằng phương pháp được chọn từ phương pháp làm giảm glycosyl hoá của kháng thể, phương pháp cải biến lớp kháng thể của kháng thể thành lớp kháng thể một cách tự nhiên có chức năng hiệu ứng giảm đi hoặc bị loại bỏ, và phương pháp cải biến vùng Fc.

11. Kháng thể theo điểm 10, trong đó sự glycosyl hoá của kháng thể được làm giảm đi bằng phương pháp được chọn từ: phương pháp sản xuất kháng thể trong môi trường không cho phép glycosyl hoá kiểu dại, phương pháp loại bỏ các nhóm hydrat cacbon đã có trên kháng thể này, và phương pháp cải biến kháng thể sao cho sự glycosyl hoá kiểu dại không xảy ra.

12. Kháng thể theo điểm 11, trong đó vùng Fc của kháng thể bao gồm đột biến ở vị trí 297 sao cho gốc asparagin kiểu dại ở vị trí đó được thay thế bằng một axit amin khác gây ảnh hưởng đến sự glycosyl hoá ở vị trí đó.

13. Kháng thể theo điểm 10, trong đó chức năng hiệu ứng được làm giảm đi hoặc bị loại bỏ bằng cách làm khuyết đoạn toàn bộ hoặc một phần của vùng Fc, hoặc bằng cách thiết kế di truyền kháng thể này sao cho nó không bao gồm vùng Fc hoặc vùng không phải Fc có khả năng có chức năng hiệu ứng hoặc chức năng hoạt hoá bổ thể.

14. Kháng thể theo điểm 13, trong đó cải biến này được chọn từ: đột biến điểm của vùng Fc làm yếu sự gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc được chọn từ các vị trí sau đây: 234, 235, 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, và 439; đột biến điểm của vùng Fc làm yếu sự gắn kết với C1q được chọn từ các vị trí sau đây: 270, 322, 329, và 321; loại bỏ một phần hoặc toàn bộ vùng Fc, và đột biến điểm ở vị trí 132 của miền CH1.

15. Kháng thể theo điểm 14, trong đó cải biến này là N297G; D265A và N297A; hoặc D265A và N297G; hoặc L234A, L235A, và P329G.

16. Kháng thể theo điểm 8, trong đó thời gian bán thải được làm gia tăng bằng cách cải biến trong miền gắn kết FcRn của kháng thể ở vị trí được chọn từ: 252, 254, 256, 434 và 436.

17. Kháng thể theo điểm 16, trong đó cải biến này là M252Y, S254T và T256E; hoặc N434A và Y436I.

18. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó kháng thể này được ngẫu hợp với hợp chất trị liệu.

19. Kháng thể theo điểm 18, trong đó kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu.

20. Kháng thể theo điểm 19, trong đó hợp chất trị liệu tạo thành một phần của kháng thể đa đặc hiệu.

21. Kháng thể theo điểm 19 hoặc điểm 20, trong đó kháng thể đa đặc hiệu bao gồm điểm gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết TfR và điểm gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết kháng nguyên não.

22. Kháng thể theo điểm 21, trong đó kháng nguyên não được chọn từ nhóm bao gồm: beta-secretaza 1 (BACE1), Abeta, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì 2 của người (HER2), tau, apolipoprotein E (ApoE), alpha-synuclein, CD20, huntingtin, prion protein (PrP), kinaza đoạn lặp giàu lơxin 2 (LRRK2), parkin, presenilin 1, presenilin 2, gamma secretaza, thụ thể chết 6 (DR6), protein tiền chất amyloit (APP), thụ thể neurotrophin p75 (p75NTR), và caspaza 6.

23. Kháng thể theo điểm 22, trong đó kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và BACE1, hoặc trong đó kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và Abeta.

24. Kháng thể theo điểm 18, trong đó hợp chất trị liệu là thuốc rối loạn thần kinh.

25. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24.

26. Tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo điểm 25.

27. Phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 26 sao cho kháng thể này được sản sinh.

28. Phương pháp theo điểm 27, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi kháng thể từ tế bào chủ.

29. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24 và chất mang dược dụng.

30. Chế phẩm để vận chuyển hợp chất qua hàng rào máu-não ở đối tượng bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 24, trong đó chế phẩm này được cho tiếp xúc với hàng rào máu-não sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ngẫu hợp với nó đi qua hàng rào máu-não.

31. Chế phẩm để làm gia tăng sự tiếp xúc của hợp chất với hệ thần kinh trung ương ở đối tượng, bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 24, trong

đó chế phẩm này được cho tiếp xúc với hàng rào máu-não sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ngẫu hợp với nó đi qua hàng rào máu-não.

32. Chế phẩm để làm gia tăng sự lưu giữ hợp chất được sử dụng cho đối tượng trong hệ thần kinh trung ương bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 24, trong đó chế phẩm này được cho tiếp xúc với hàng rào máu-não sao cho sự lưu giữ hợp chất gia tăng trong hệ thần kinh trung ương.

33. Thuốc để điều trị rối loạn thần kinh ở động vật có vú bao gồm kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 24.

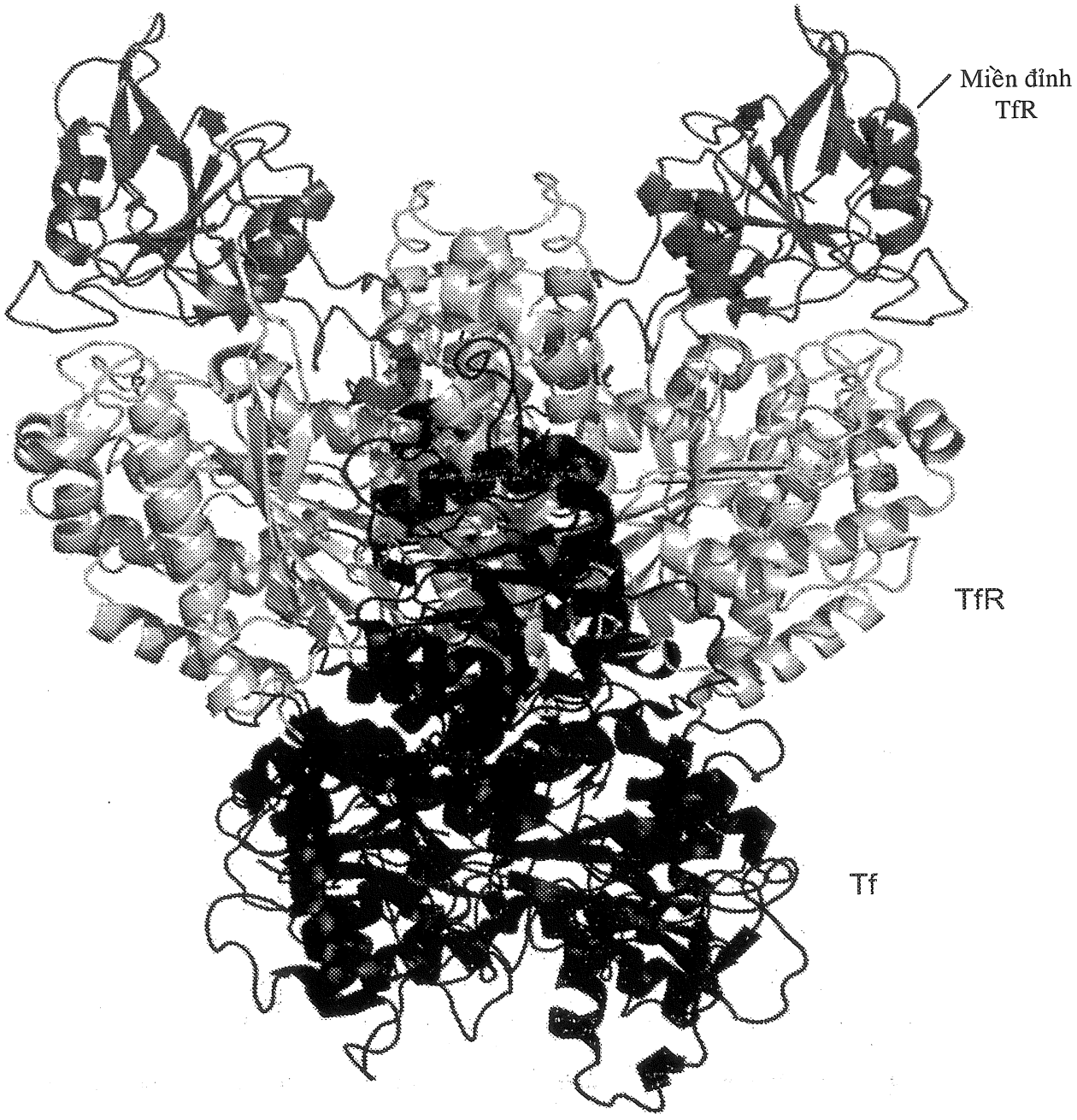


FIG. 1

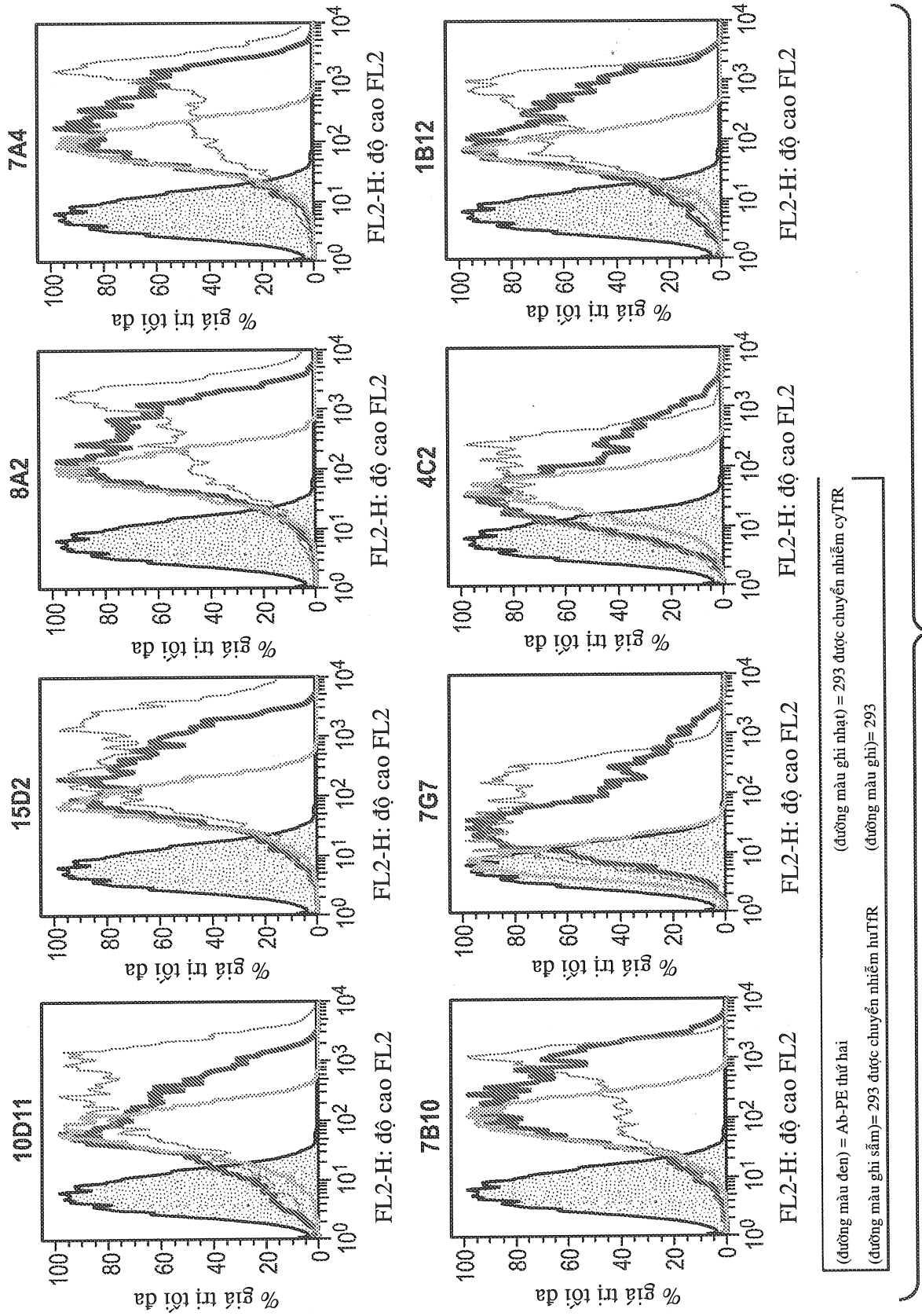

10D11
15D2
8A2
7A4
7B10
7G7
4C2
1B12
% giá trị tối đa
FL2-H: độ cao FL2
(đường màu đen) = Ab-PE thứ hai
(đường màu ghi nhạt) = 293 được chuyển nhiễm cyTfR
(đường màu ghi sẫm)= 293 được chuyển nhiễm huTfR
(đường màu ghi)= 293

FIG. 2A

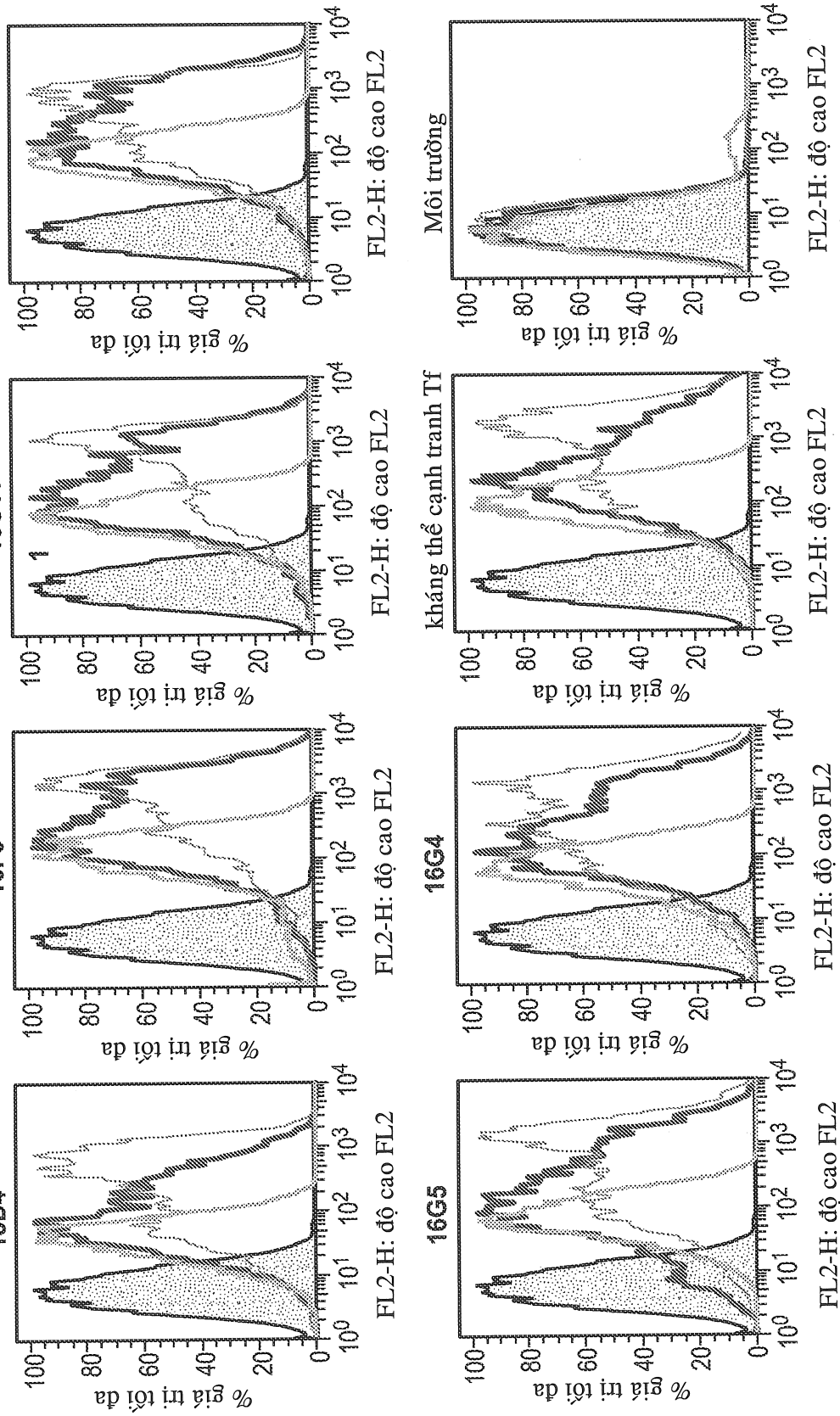

13D4
16F6
15G11
13C3
16G5
16G4
Môi trường
kháng thể cạnh tranh Tf
% giá trị tối đa
FL2-H: độ cao FL2
(đường màu đen) = Ab-PE thứ hai
(đường màu ghi sẫm)= 293 được chuyển nhiễm huTfR
(đường màu ghi nhạt) = 293 được chuyển nhiễm cyTfR
(đường màu ghi)= 293

FIG. 2B

Xác định đặc tính các dòng tế bào lai kháng TfR phản ứng chéo giữa người và khỉ Cynomolgous mà không cạnh tranh với sự gắn kết Tf với TfR

		Cạnh tranh với chất gắn kết miền đỉnh	Gắn kết theo ELISA với huTfR	Gắn kết theo ELISA với cyno TfR	Kết quả theo Biacore của IgG lai hoặc khảm						
					huTfR			CynoTfR			Tỷ lệ KD cy/hu
					Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
Lớp I	**7A4**	+++	+++	+++	2.11E+06	4.34E-04	2.06E-10	1.06E+06	6.63E-04	6.27E-10	3.04
	8A2	+++	+++	+++	1.22E+06	2.17E-04	1.79E-10	7.91E+05	7.15E-04	9.04E-10	5.06
	7A4 HC/8A2 LC	+++	+++	+++	3.01E+06	3.35E-04	1.12E-10	1.32E+06	1.22E-03	9.25E-10	8.29
	1502	+++	+++	+++							
	10D11	+++	+++	+++	1.66E+05	3.44E-04	2.08E-09	6.46E+04	5.81E-03	8.99E-08	43.32
	7B10	+++	+++	+++							
Lớp II	**15G11**	+++	+++	+++	8.90E+05	8.83E-04	9.92E-10	1.29E+06	3.35E-03	2.60E-09	2.62
	13C3	+++	+++	+++							
	16G5	+++	+++	+++							
	16G4	+++	+++	+++	4.77E+05	1.62E-03	3.40E-09	2.33E+05	5.23E-03	2.24E-08	6.59
Lớp III	**16F6**	+++	+++	+++	1.36E+05	2.81E-04	2.07E-09	1.23E+05	9.13E-04	7.45E-09	3.6
Lớp IV	**7G7**	-	+++	+++	1.33E+05	6.08E-03	4.57E-08	4.63E+04	1.21E-02	2.62E-07	5.73E
	4C2	-	+++	+++							
	1B12	-	+++	++	1.36E+05	2.76E-04	2.03E-09	1.34E+05	5.80E-03	4.34E-08	21.35
	13D4	-	+++	++	9.99E+04	9.49E-04	9.50E-09	7.06E+04	5.98E-04	8.47E-09	0.89

FIG. 2C

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

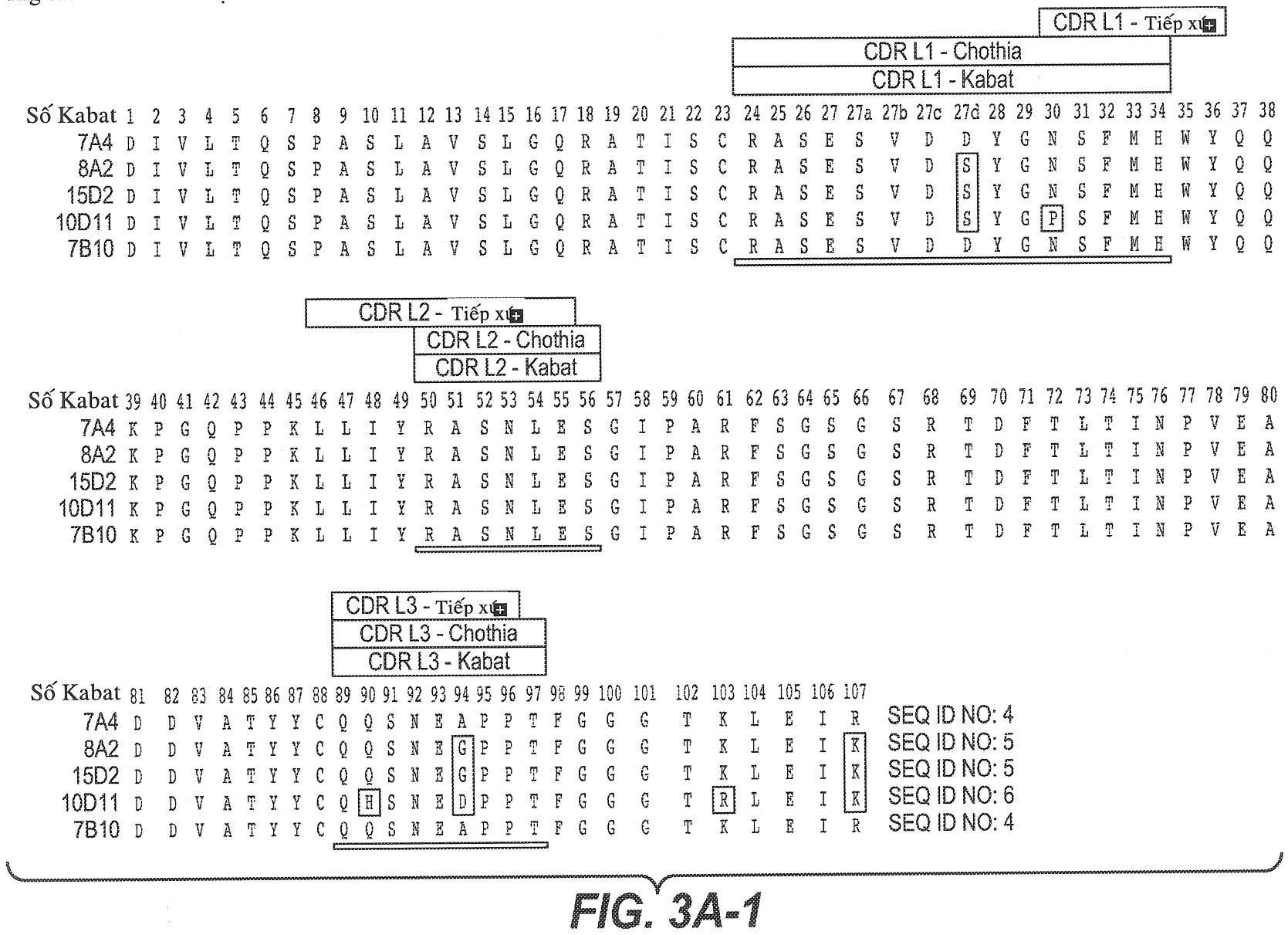


FIG. 3A-1

Vùng biến đổi chuỗi nặng

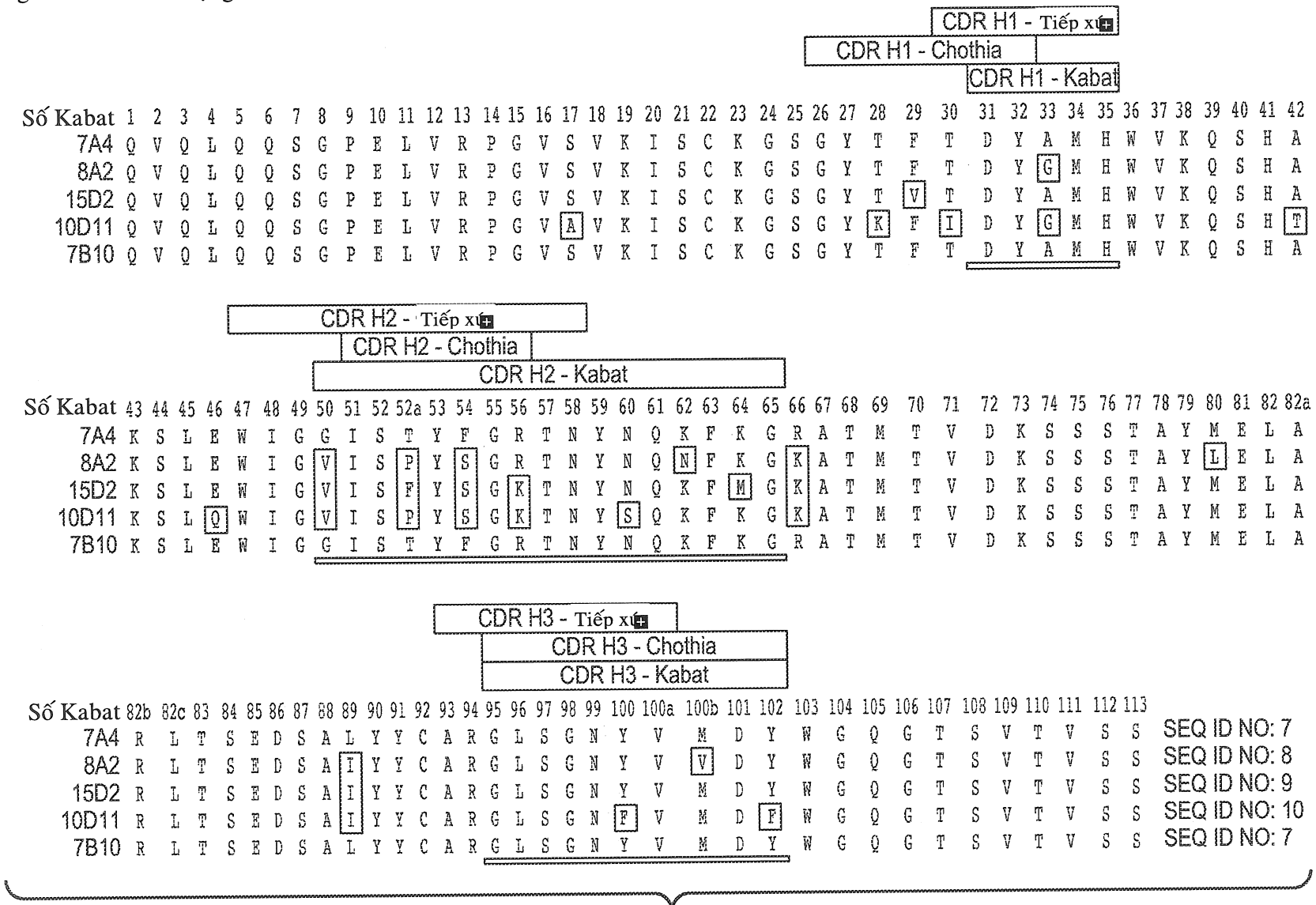


FIG. 3A-2

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

CDR L1 - Tiếp xúc
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

Số Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
15G11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	L	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K
16G5	D	I	Q	L	T	Q	T	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	E	N	I	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K
13G3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	I	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K
16G4	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	S	V	S	V	G	E	T	V	T	I	T	C	R	A	S	D	N	I	Y	S	N	L	A	W	Y	Q	Q	K	Q	G	K

CDR L2 - Tiếp xúc
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

Số Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
15G11	S	P	Q	L	L	V	Y	D	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G
16G5	S	P	Q	L	L	V	Y	A	A	T	D	L	A	D	G	V	P	S	R	F	R	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G
13G3	S	P	Q	L	L	V	Y	A	A	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G
16G4	S	P	Q	L	L	V	Y	A	V	T	N	L	A	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	Q	Y	S	L	K	I	N	S	L	Q	S	E	D	F	G

CDR L3 - Tiếp xúc
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

Số Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
15G11	T	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	SEQ ID NO: 11
16G5	S	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	I	SEQ ID NO: 12
13G3	S	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	M	F	G	S	G	T	K	L	E	L	K	SEQ ID NO: 13
16G4	S	Y	Y	C	Q	H	F	W	G	T	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	SEQ ID NO: 14

FIG. 3B-1

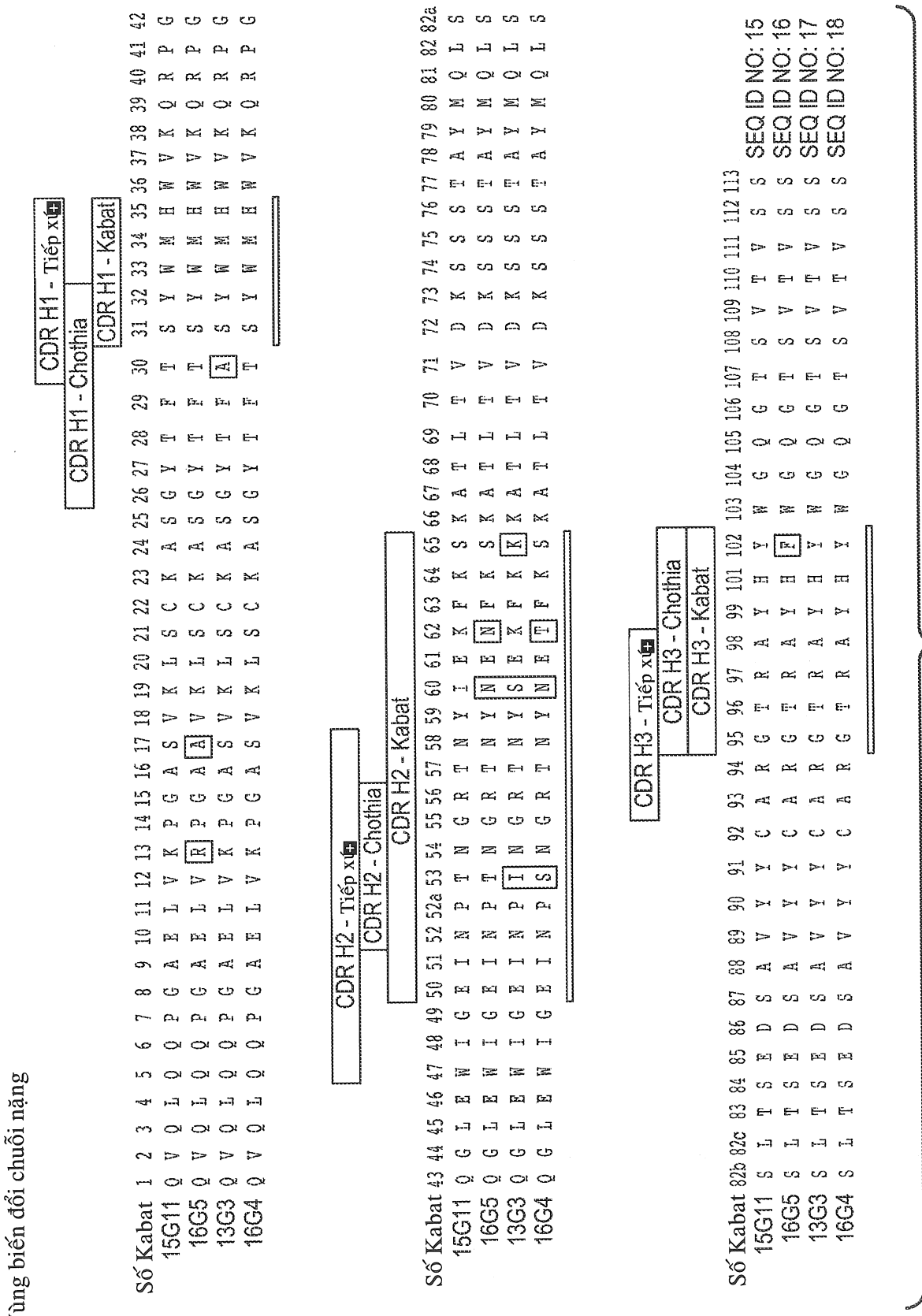
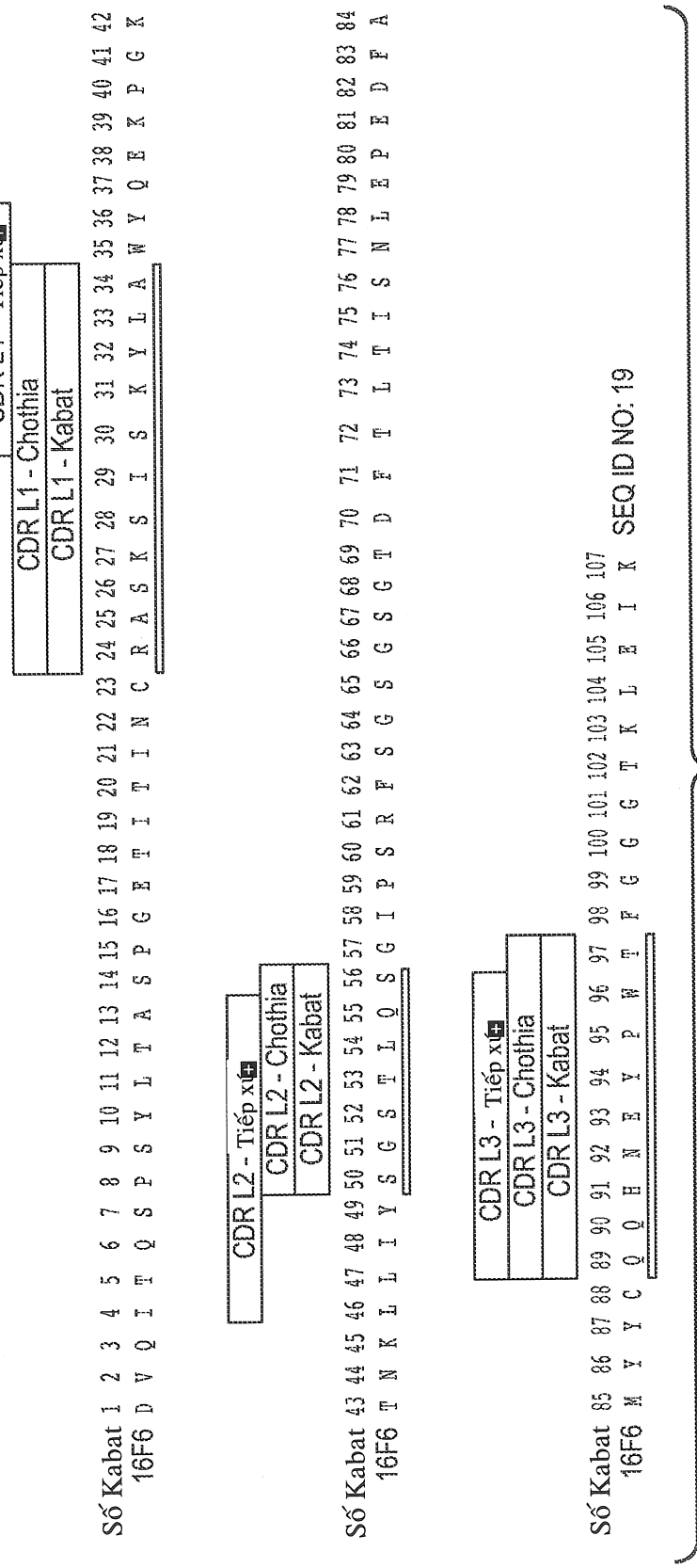

Vùng biến đổi chuỗi nặng
CDR H1 - Tiếp xúc
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat
CDR H2 - Tiếp xúc
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat
CDR H3 - Tiếp xúc
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - Kabat
Số Kabat
15G11
16G5
13G3
16G4
SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 18

FIG. 3B-2

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ



SEQ ID NO: 19

FIG. 3C-1

Vùng biến đổi chuỗi nặng

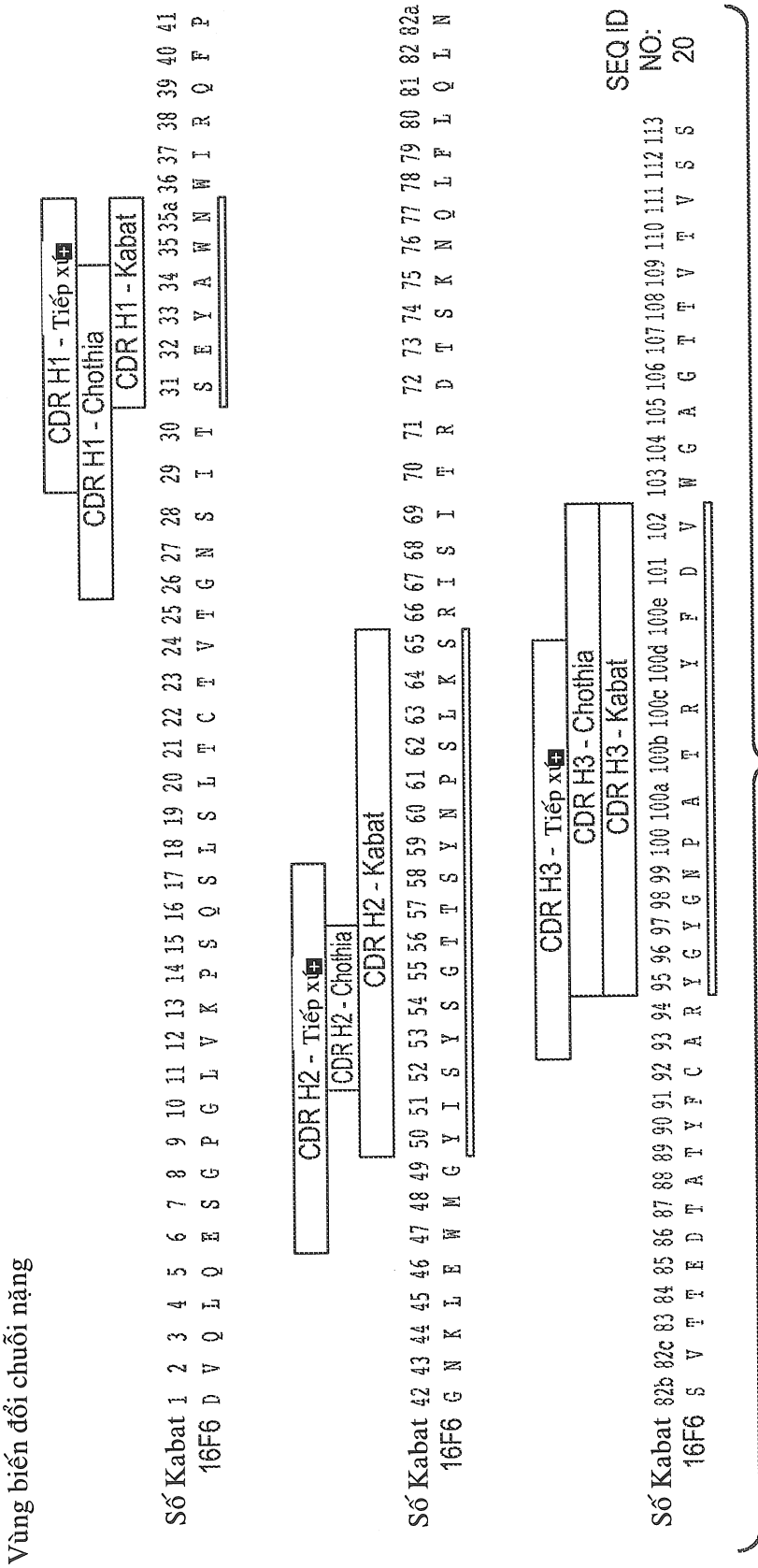


FIG. 3C-2

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

CDR L1 - Tiếp xúc
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

Số Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
7G7	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	S	S	Y	S	F	M	H	W	Y	R	Q
4C2	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	R	Q	S	V	S	T	S	S	Y	S	F	M	H	W	Y	Q	Q
1B12	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	L	G	G	R	V	T	M	T	C	T	T	S	S	S	.	.	.	V	P	S	S	Y	F	H	W	Y	Q	Q
13D4	D	I	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	N	C	R	A	G	Q	.	.	.	.	D	I	T	N	Y	L	N	W	F	Q	Q

CDR L2 - Tiếp xúc
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

Số Kabat	39	40	41	41	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
7G7	K	A	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	I	Q	E	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	L	P	V	E	E
4C2	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	I	Q	E	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	L	P	V	E	E
1B12	K	P	G	S	S	P	K	L	W	I	Y	S	T	S	N	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	A
13D4	K	P	D	G	T	V	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	T	N	L	E	Q

CDR L3 - Tiếp xúc
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

Số Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
7G7	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	H	T	W	E	I	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 21
4C2	E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	H	T	W	E	I	P	F	T	F	G	S	G	T	N	L	E	I	K	SEQ ID NO: 22
1B12	E	D	A	A	T	Y	Y	C	H	Q	Y	H	R	S	P	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 23
13D4	E	D	I	A	T	Y	F	C	Q	Q	A	N	T	L	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	SEQ ID NO: 24

FIG. 3D-1

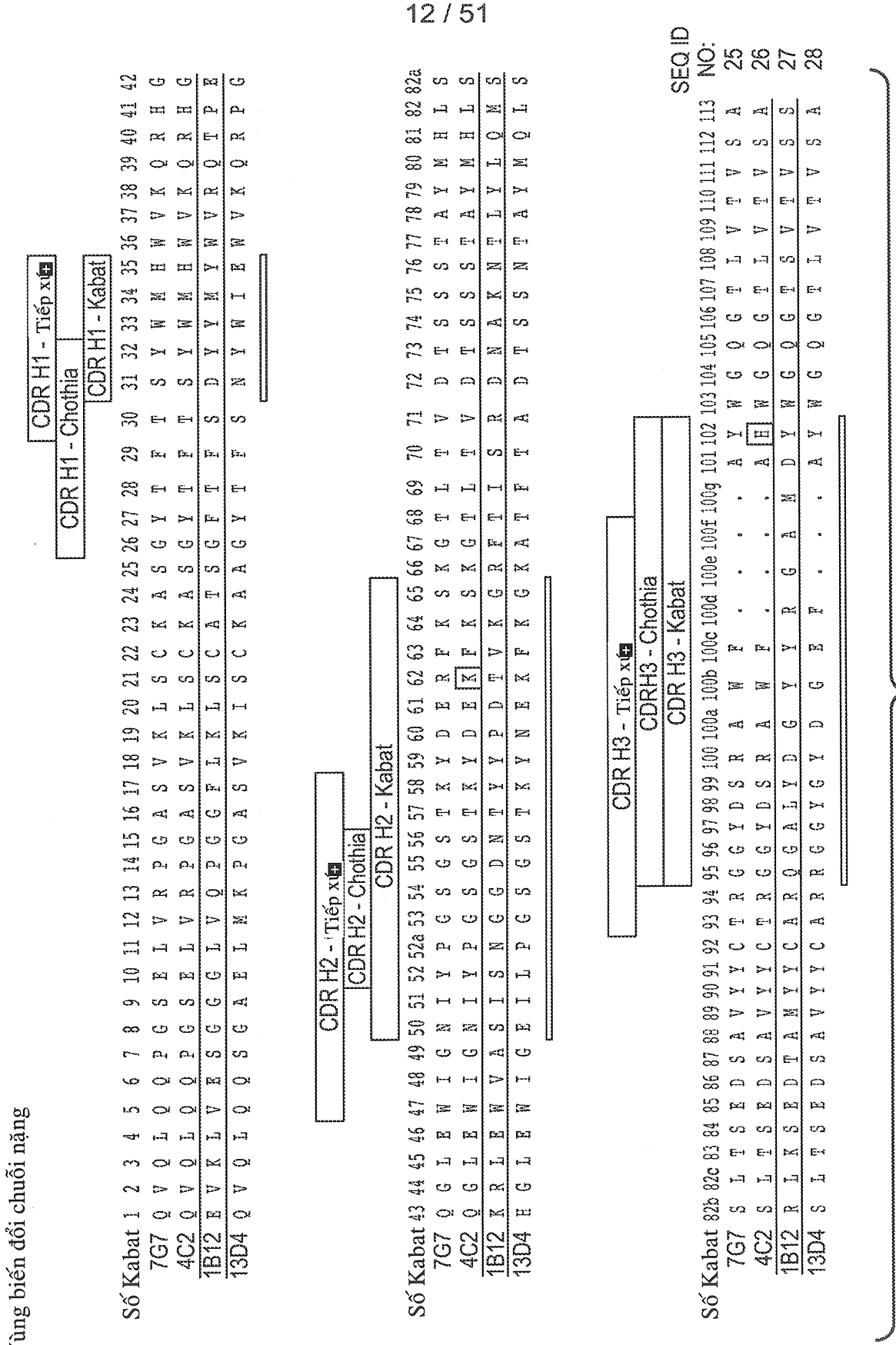

Vùng biến đổi chuỗi nặng
CDR H1 - Tiếp xúc
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat
CDR H2 - Tiếp xúc
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat
CDR H3 - Tiếp xúc
CDRH3 - Chothia
CDR H3 - Kabat
SEQ ID NO:
Số Kabat
7G7
4C2
1B12
13D4

FIG. 3D-2

Nhân tính hóa 15G11 để tạo ra hu15G11.v5

Chuỗi nhẹ, Kappa: kháng thể của chuột được bắt cặp với dòng tế bào mầm của người

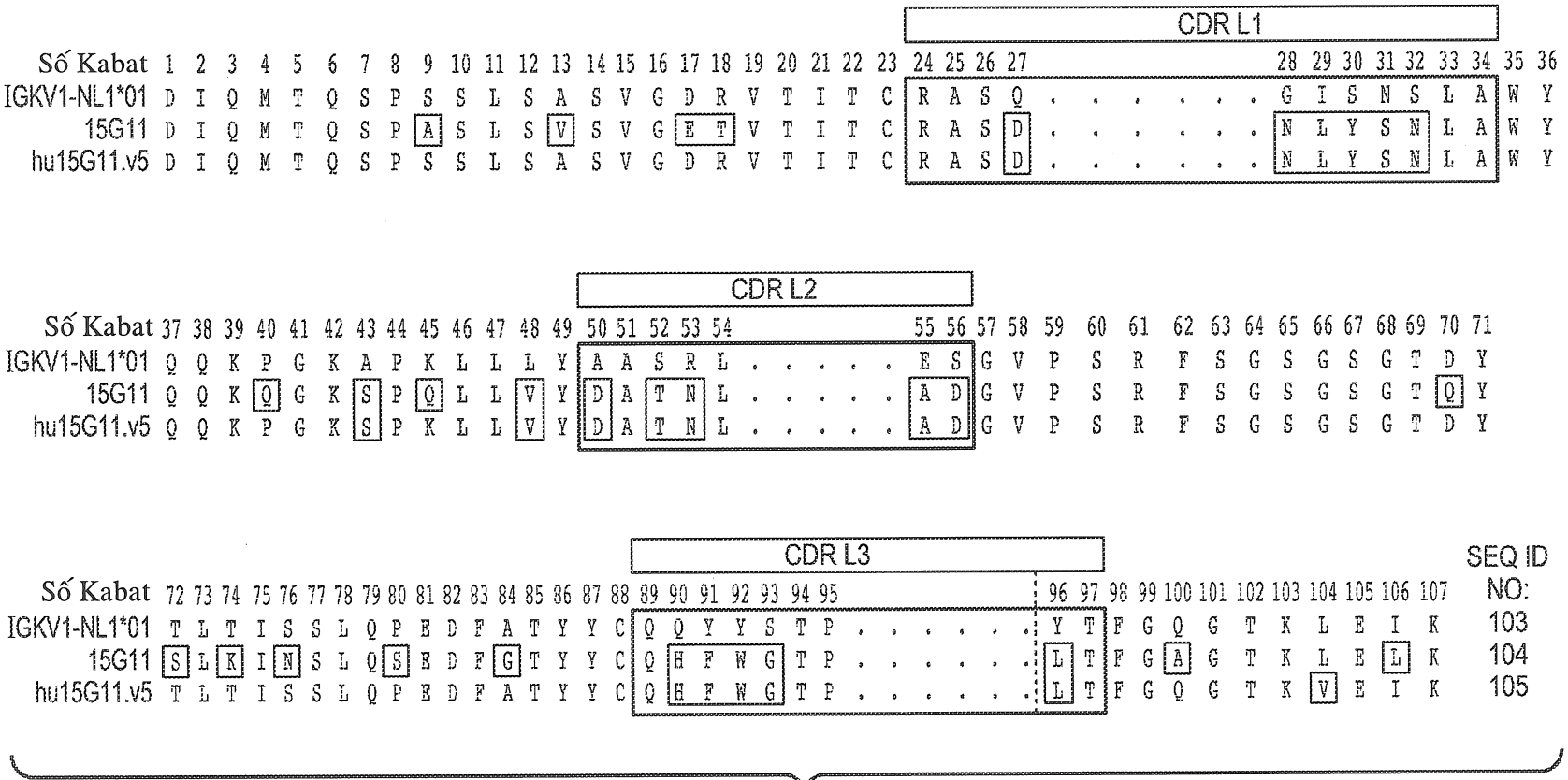


FIG. 4A-1

Nhân tính hóa 15G11 để tạo ra hu15G11.v5

Chuỗi nặng: kháng thể của chuột được bắt cặp với dòng tế bào mầm của người

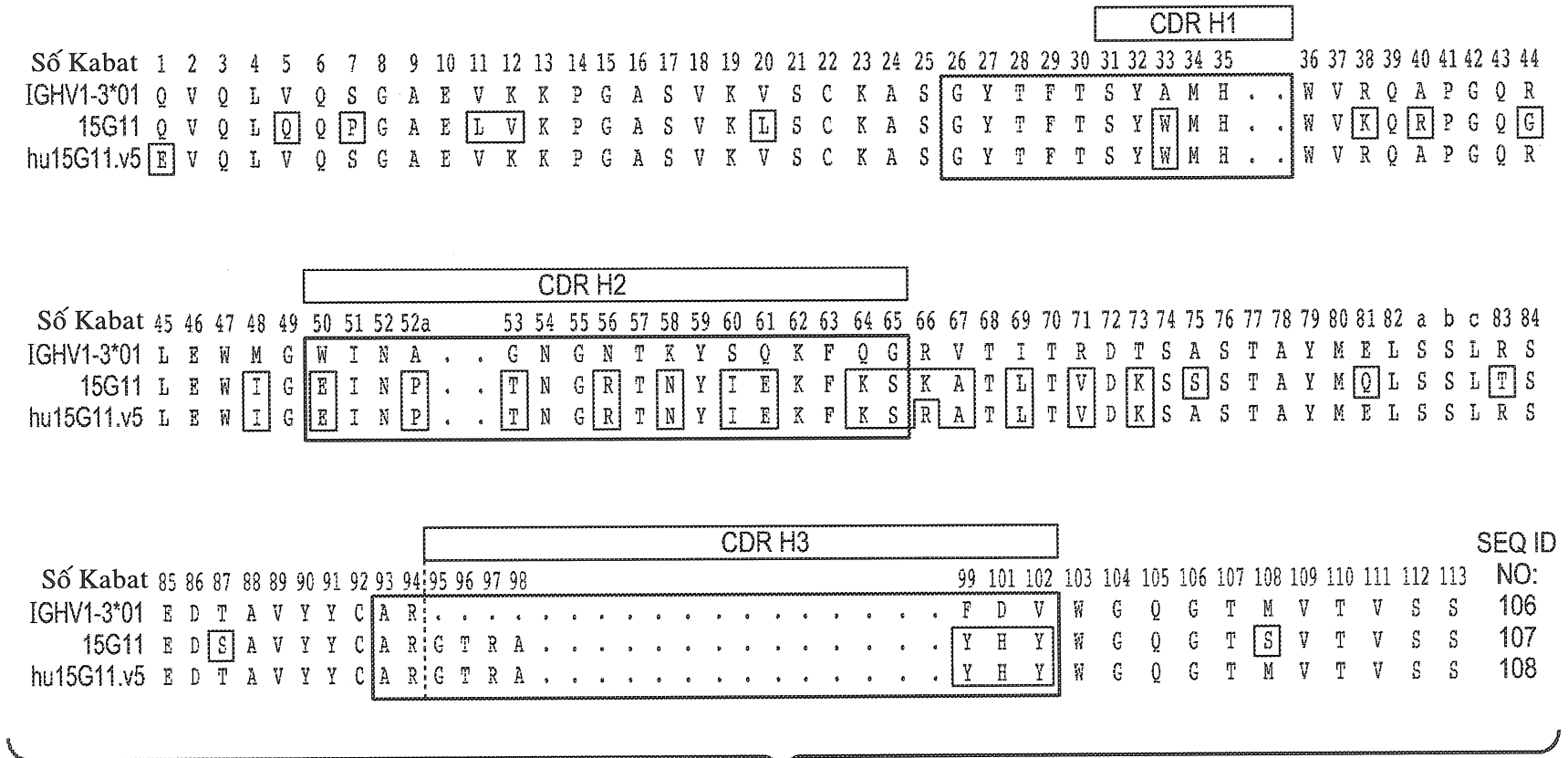


FIG. 4A-2

Nhân tính hóa 7A4/8A2 để tạo ra hu7A4.v15

Chuỗi nhẹ, Kappa: kháng thể của chuột được bắt cặp với dòng tế bào mầm của người

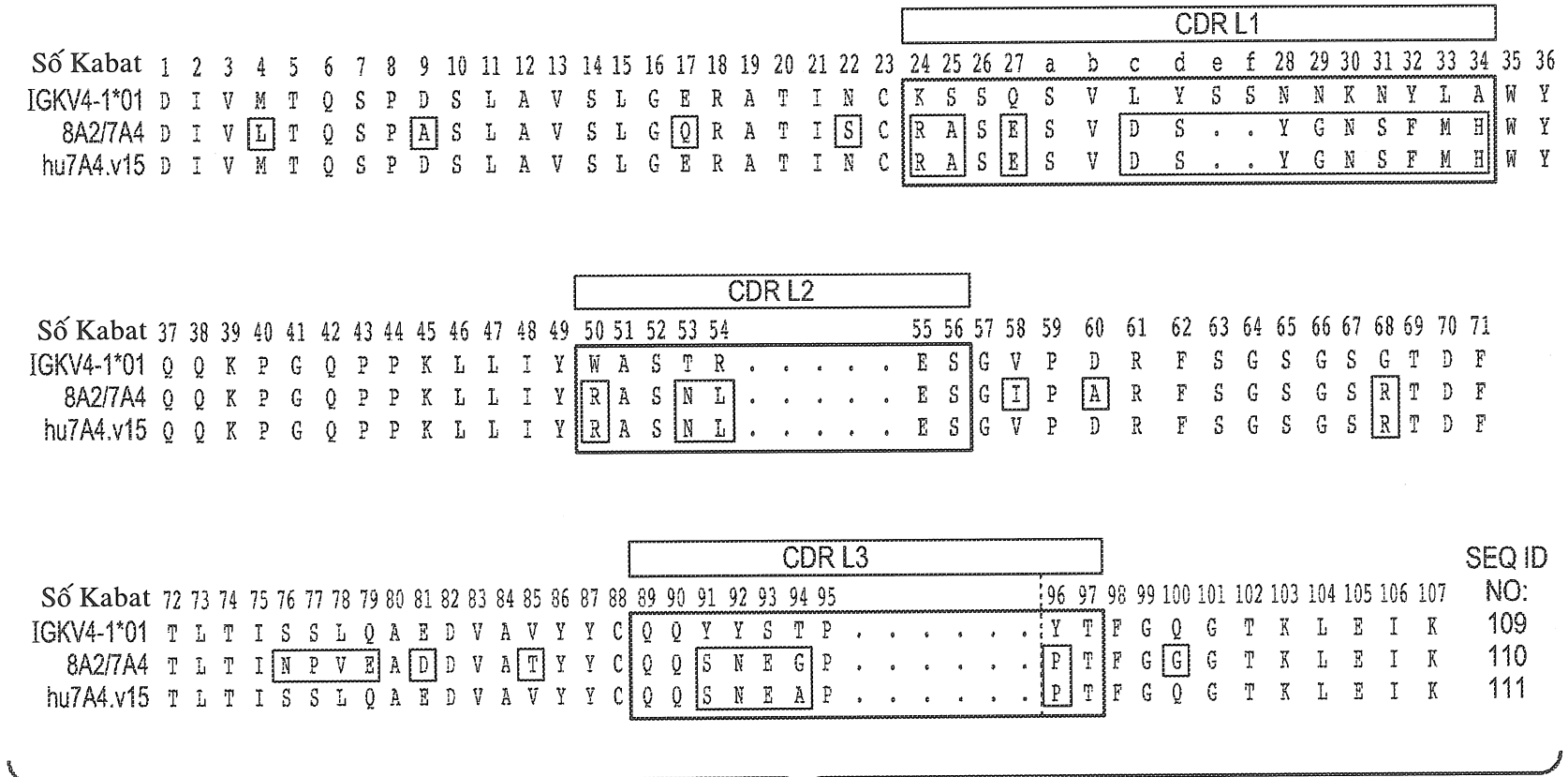


FIG. 4B-1

Nhân tính hóa 7A4/8A2 để tạo ra hu7A4.v15

Chuỗi nặng: kháng thể của chuột được bắt cặp với dòng tế bào mầm của người

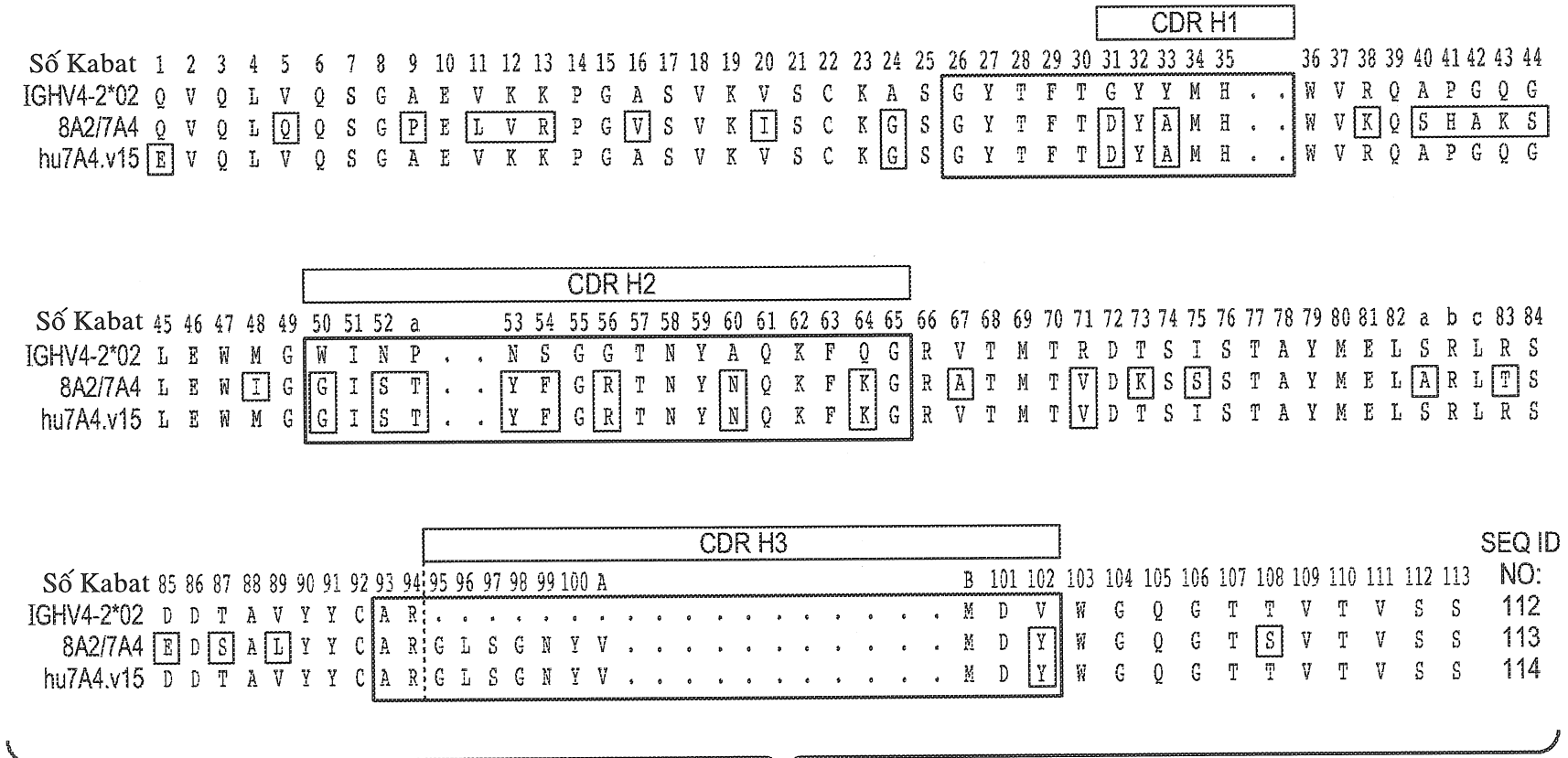


FIG. 4B-2

Nhân tính hóa 7G7 để tạo ra 7G7.v1

Chuỗi nhẹ, Kappa: kháng thể của chuột được bắt cặp với K4H1

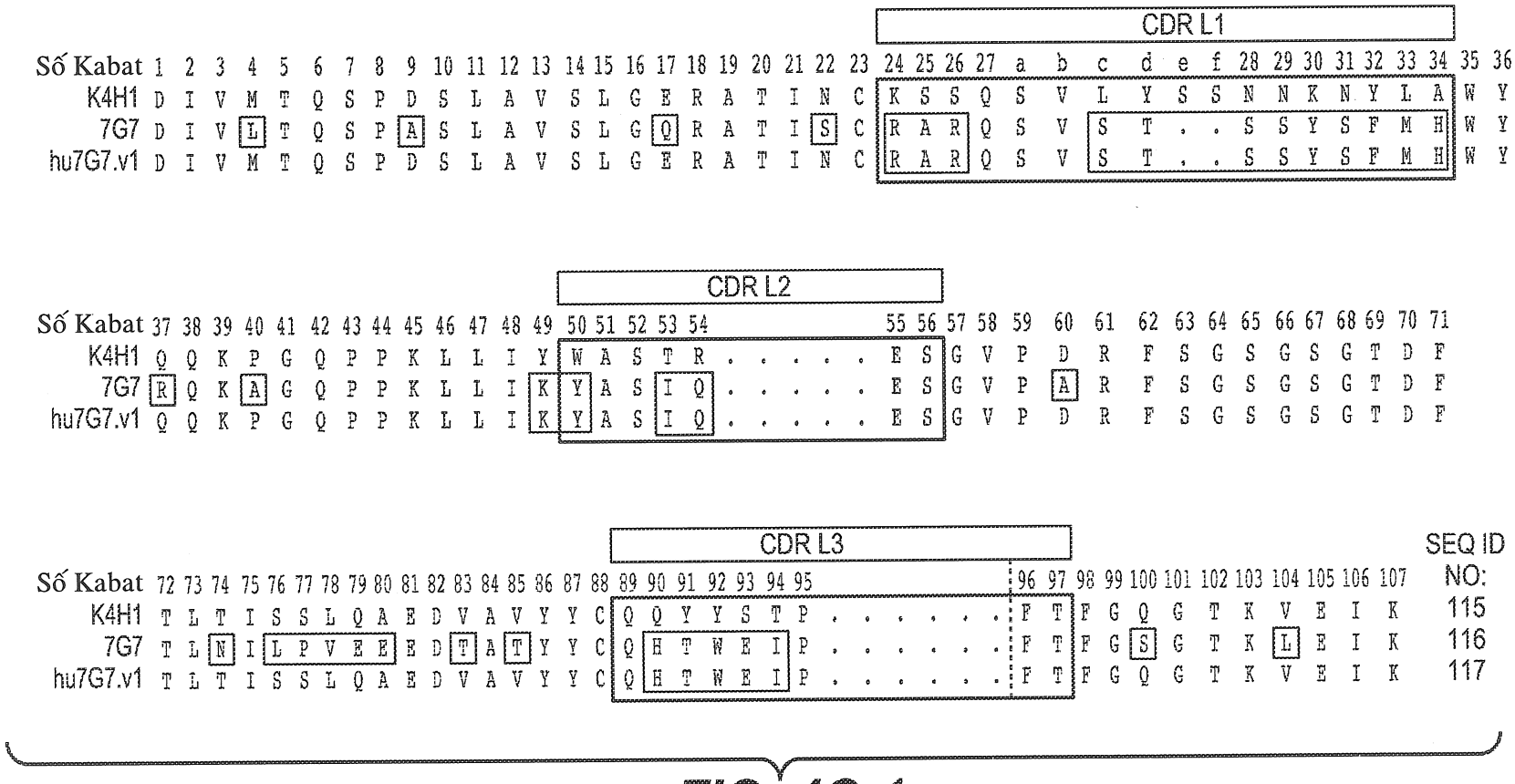


FIG. 4C-1

Nhân tính hóa 7G7 để tạo ra 7G7.v1

Chuỗi nặng: kháng thể của chuột được bắt cặp với K4H1

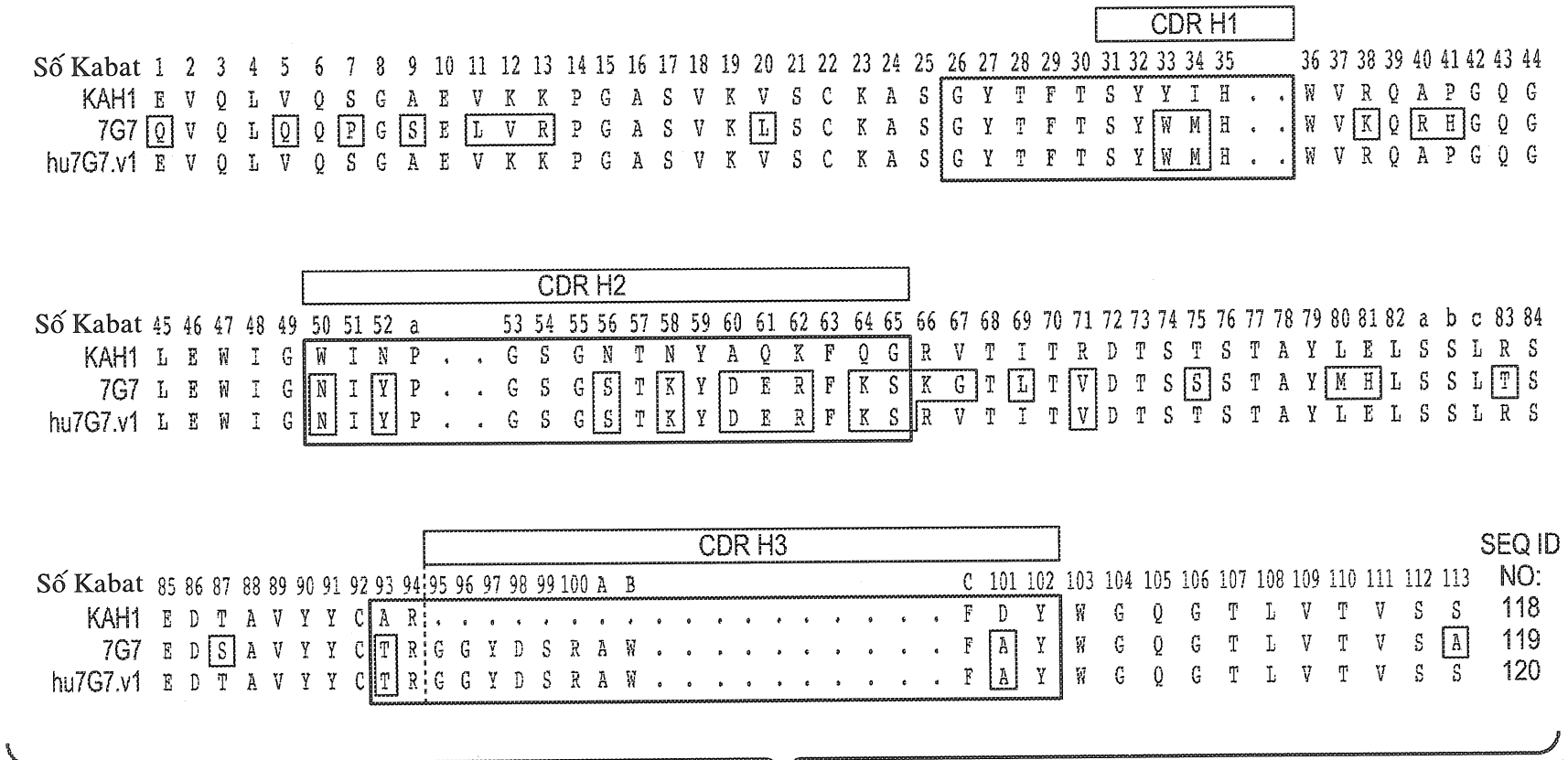


FIG. 4C-2

Nhân tính hóa 16F6 để tạo ra hu16F6.v4

Chuỗi nhẹ, Kappa: kháng thể của chuột được bắt cặp với dòng tế bào mầm của người

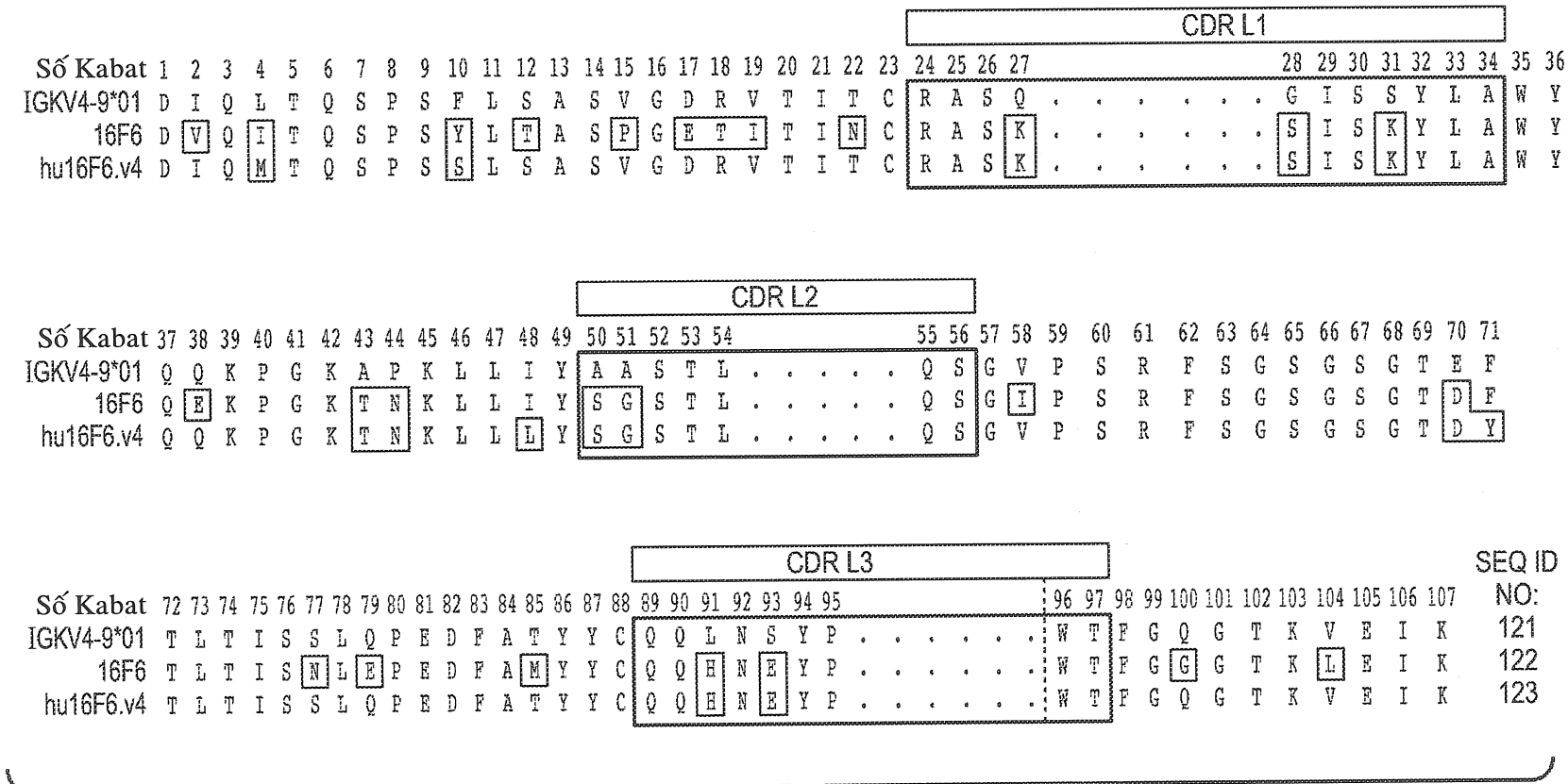


FIG. 4D-1

Nhân tính hóa 16F6 để tạo ra hu16F6.v4

Chuỗi nặng: kháng thể của chuột được bắt cặp với dòng tế bào mầm của người

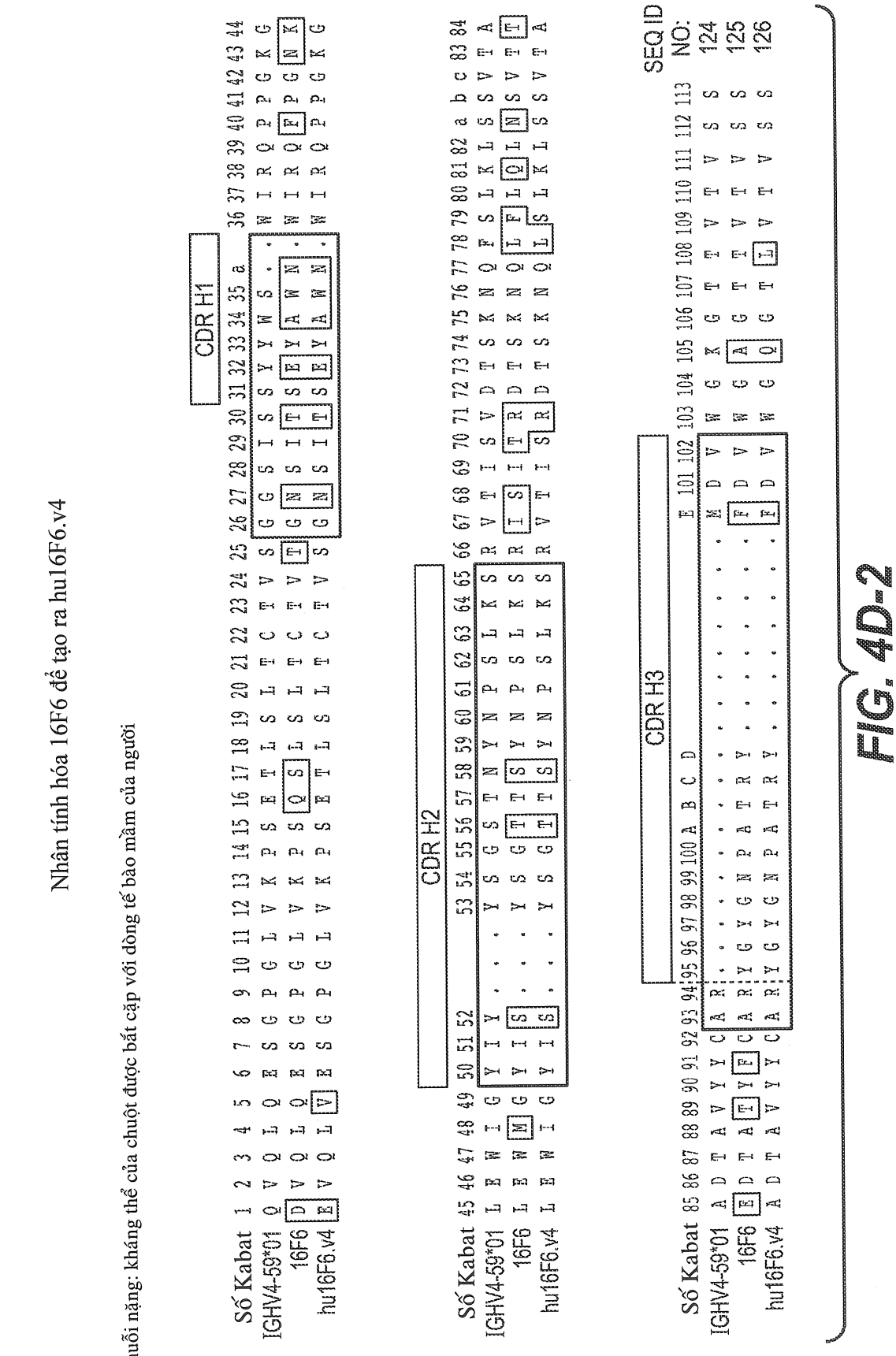


FIG. 4D-2

FIG. 4E-1

FIG. 4E-2

FIG. 4E

FIG. 4E-1

Các biến thể nhân tính hóa 15G11, 7A4, 16G6

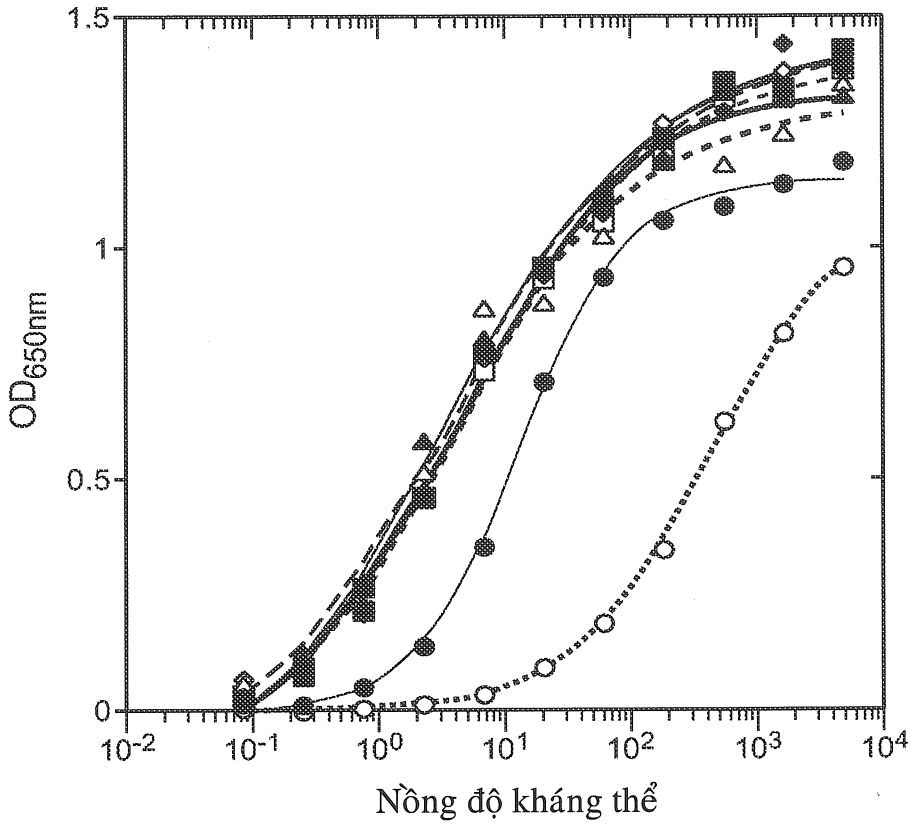
	LC		HC					huTfR			CynoTfR			Tỷ lệ khỉ/người
	43	48	48	67	69	71	73	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
mu15G11	S	V	I	A	L	V	K	8.900E+05	8.825E-04	9.916E-10	1.288E+06	3.349E-03	2.600E-09	2.6
hu15G11.v1	A	L	M	V	I	R	T	6.240E+05	3.194E-03	5.119E-09	8.571E+05	8.670E-03	1.012E-08	2.0
hu15G11.v2	A	L	M	V	I	V	T	3.520E+05	3.290E-03	9.347E-09	4.554E+05	8.021E-03	1.761E-08	1.9
hu15G11.v3	S	V	M	V	I	R	T	5.703E+05	2.347E-03	4.115E-09	8.044E+05	4.292E-03	5.336E-09	1.3
hu15G11.v4	S	V	M	V	I	V	T	4.773E+05	1.855E-03	3.886E-09	5.732E+05	4.033E-03	7.036E-09	1.8
hu15G11.v5	S	V	I	A	L	V	K	6.46E+05	0.00215	3.33E-09	5.43E+05	0.00641	1.18E-08	3.5

	LC		HC				huTfR			CynoTfR			Tỷ lệ khỉ/người
	27d	58	68	94	24	71	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
ch 7A4	D	I	R	A	G	V	2.11E+06	4.34E-04	2.06E-10	1.06E+06	6.63E-04	6.27E-10	3.04
ch7A4/8A2	S	I	R	G	G	V	3.007E+06	3.353E-04	1.115E-10	1.315E+06	1.216E-03	9.247E-10	8.3
hu7A4.v1	S	V	G	G	A	R	1.41E+06	3.94E-04	2.79E-10	9.15E+05	1.53E-03	1.67E-09	6.0
hu7A4.v2	S	V	G	G	G	R	1.60E+06	3.71E-04	2.32E-10	9.62E+05	1.17E-03	1.22E-09	5.3
hu7A4.v3	S	V	G	G	A	V	6.24E+05	3.39E-04	5.43E-10	3.22E+05	9.34E-04	2.90E-09	5.3
hu7A4.v4	S	V	G	G	G	V	4.82E+05	2.95E-04	6.12E-10	2.52E+05	9.66E-04	3.83E-09	6.3
hu7A4.v5	S	I	G	G	A	R	1.748E+06	6.363 E-04	3.640E-10	1.461E+06	1.757E-03	1.203E-09	3.3
hu7A4.v6	S	I	G	G	G	R	2.845E+06	7.396 E-04	2.600E-10	1.780E+06	1.883E-03	1.058E-09	4.1

hu7A4.v7	S	I	G	G	A	V	1.113E+06	5.735E-04	5.153E-10	2.428E+06	2.855E-03	1.176E-09	2.3
hu7A4.v8	S	I	G	G	G	V	8.326E+05	1.077E-03	1.294E-09	2.768E+05	3.411E-03	1.232E-08	9.5
hu7A4.v9	S	V	R	G	A	R	1.930E+06	2.304E-04	1.194E-10	1.280E+06	5.477E-04	4.279E-10	3.6
hu7A4.v10	S	V	R	G	G	R	1.684E+06	2.407E-04	1.429E-10	1.115E+06	5.632E-04	5.051E-10	3.5
hu7A4.v11	S	V	R	G	A	V	1.487E+06	2.323E-04	1.562E-10	8.049E+05	7.588E-04	9.427E-10	6.0
hu7A4.v12	S	V	R	G	G	V	9.159E+05	1.833E-04	2.001E-10	4.587E+05	9.580E-04	2.089E-09	10.4
hu7A4.v13	S	V	G	A	G	V	4.51E+05	6.14E-04	1.36E-09	2.13E+05	2.42E-03	1.14E-08	8.3
hu7A4.v14	S	I	G	A	G	V	6.14E+05	7.33E-04	1.19E-09	2.30E+05	3.61E-03	1.57E-08	13.2
hu7A4.v15	S	V	R	A	G	V	6.73E+05	3.77E-04	5.61E-10	2.90E+05	2.26E-03	7.80E-09	13.9

	LC		HC		huTfR			CynoTfR			Tỷ lệ khỉ/người
	43	44	71	78	Ka	Kd	KD	Ka	Kd	KD	
mu16F6	T	N	R	L	1.36E+05	2.81E-04	2.07E-09	1.23E+05	9.13E-04	7.45E-09	3.6
hu16F6.v1	A	P	V	F	4.10E+04	7.67E-04	1.87E-08	4.64E+04	0.009242	1.99E-07	10.7
hu16F6.v2	A	P	R	L	4.62E+04	1.97E-04	4.25E-09	4.38E+04	0.002981	6.81E-08	16.0
hu16F6.v3	T	N	V	F	7.86E+04	3.23E-04	4.11E-09	7.26E+04	0.002503	3.45E-08	8.4
hu16F6.v4	T	N	R	L	8.99E+04	7.94E-05	8.84E-10	8.30E+04	9.13E-04	1.10E-08	12.5

FIG. 4E-2



Gắn kết kháng thể khi có (biểu tượng rỗng, vạch đứt) hoặc khi không có 6,3μM holo-Tf (biểu tượng đặc, vạch liền)

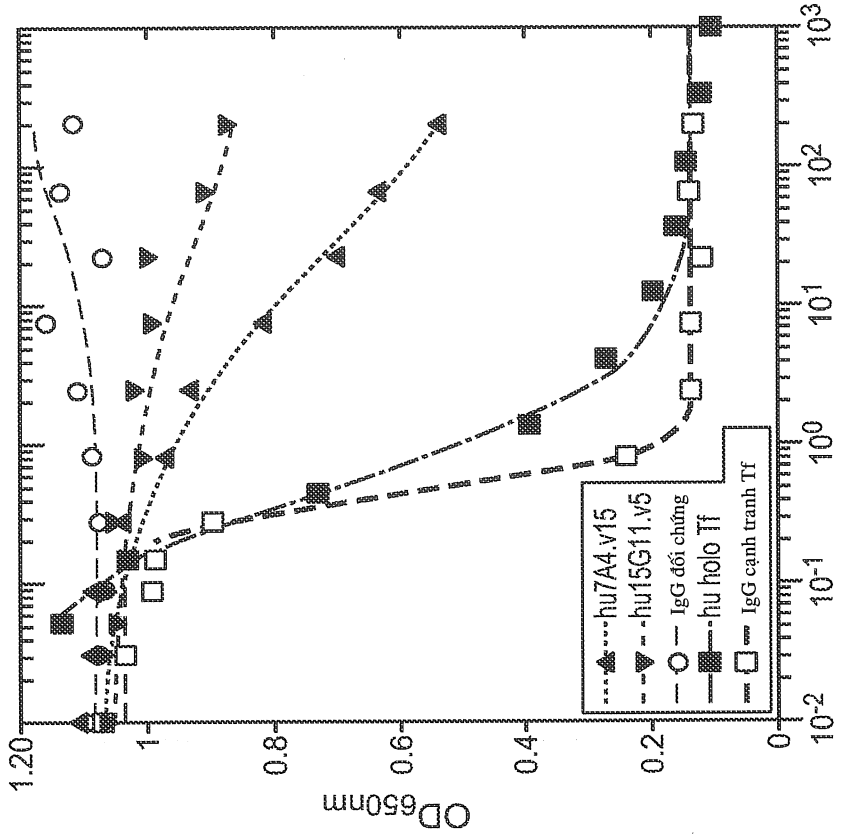
hu7A4.v15 – hình vuông

hu15G11.v5 – hình thoi

hu7G7.v1 – hình tam giác

kháng thể cạnh tranh Tf – hình tròn

FIG. 5


OD650nm
Nồng độ kháng thể (ug/ml)
hu7A4.v15
hu15G11.v5
IgG đối chứng
hu holo Tf
IgG cạnh tranh Tf

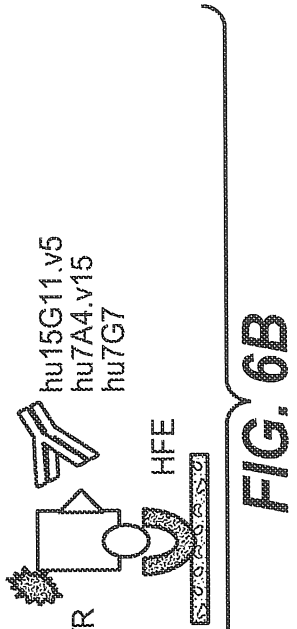
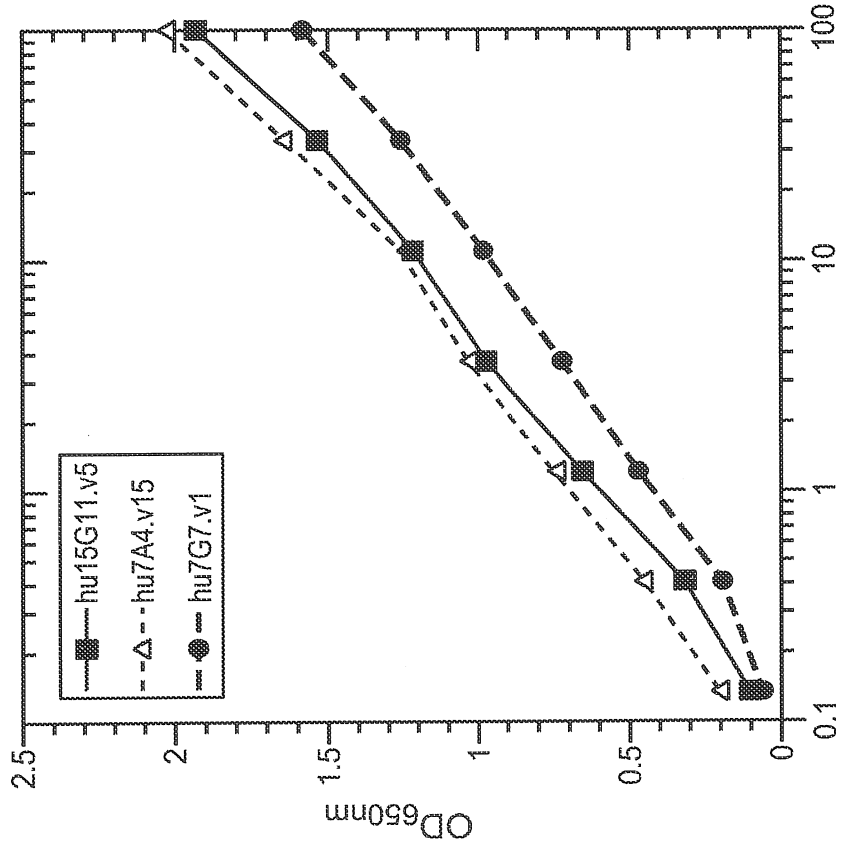

hu15G11.v5
hu7A4.v15
hu7G7
huTfR
HFE

FIG. 6B


OD650nm
Nồng độ kháng thể (ug/ml)
hu15G11.v5
hu7A4.v15
hu7G7.v1

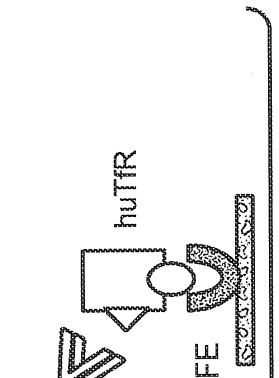

hu15G11.v5
hu7A4.v15
hu7G7
huTfR
HFE

FIG. 6A

IgG biến thể 15G11		ELIZA (EC50) Sử dụng IgG huTfR (ng/ml)	ELIZA (EC50) Sử dụng IgG CynoTfR (ng/ml)	Biacore (SCK) Khớp số liệu 1:1 (IgG) huTfR (nM)	Biacore (SCK) Khớp số liệu 1:1 (IgG) CynoTfR (nM)	Biacore Trạng thái ổn định (IgG) huTfR (nM)	Biacore Trạng thái ổn định (IgG) CynoTfR (nM)	Biacore (Fab) huTfR (nM)	Biacore (Fab) CynoTfR (nM)
	15G11.v5	16± 1	20± 2	3.3	12			4.7	16
CDR-H3	T96A	274	3378	173		433			
	V99A	16.1	21.8						
	H101A	14.2	21.6						
	V102A	15.7	22.3						
CDR-L3	Q89A	30	506	125	268	212	591		
	H90A	13	24						
	F91A	45.8	953.3	167 ± 69		228 ± 152		383	
	W92A	11.8	44.1	31	32	123	327	280	370
	G93A	14.5	50.8	40	61	150	412	245	1300
	T94A	16.8	29.3						
	P95A	10.6	40.6	29	57	94	258	170	886
	L96A	9.9	18						
	T97A	13.4	15.7						

CDR L3									SEQ ID
89	90	91	92	93	94	95	96	97	NO:
Q	H	F	W	G	T	P	L	T	128

CDR H3							SEQ ID
95	96	97	98	99	101	102	NO:
G	T	R	A	Y	H	Y	129

FIG. 7A

	IgG biến thể 7A4	ELIZA (EC50) Sử dụng IgG huTfR (ng/ml)	ELIZA (EC50) Sử dụng IgG CynoTfR (ng/ml)	Biacore (SCK) Khớp số liệu 1:1 (IgG) huTfR (nM)	Biacore (SCK) Khớp số liệu 1:1 (IgG) CynoTfR (nM)	Biacore Trạng thái ổn định (IgG) huTfR (nM)	Biacore Trạng thái ổn định (IgG) CynoTfR (nM)	Biacore (Fab) huTfR (nM)	Biacore (Fab) CynoTfR (nM)
	7A4.v15	14.8	14.2	0.58	7.8			0.4	4.3
CDR-H3	G95A	13.5	41.8						
	L96A	15.5	28.7						
	S97A								
	G98A	19.4	24.7						
	N99A	17	82.2	11	22	19	77		
	Y100A	15.9	24						
	V100aA								
	M100bA	16.1	16.9						
	D101A	17.3	18.5						
	Y102A	12.6	17.8						
CDR-L3	Q89A	10.9	13.8						
	Q90A	9.3	181	16	570	41	329	130	760
	S91A	11.3	16.3						
	N92A	8.7	13.7						
	E93A	12.2	17.6						
	P95A	9.7	15.9						
	P96A	10	16.2						
	T97A	12	22.6						

CDR L3									SEQ ID
89	90	91	92	93	94	95	96	97	NO:
Q	Q	S	N	E	A	P	P	T	130

CDR H3											SEQ ID
95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102	NO:
G	L	S	G	N	Y	V	M	D	Y	131

FIG. 7B

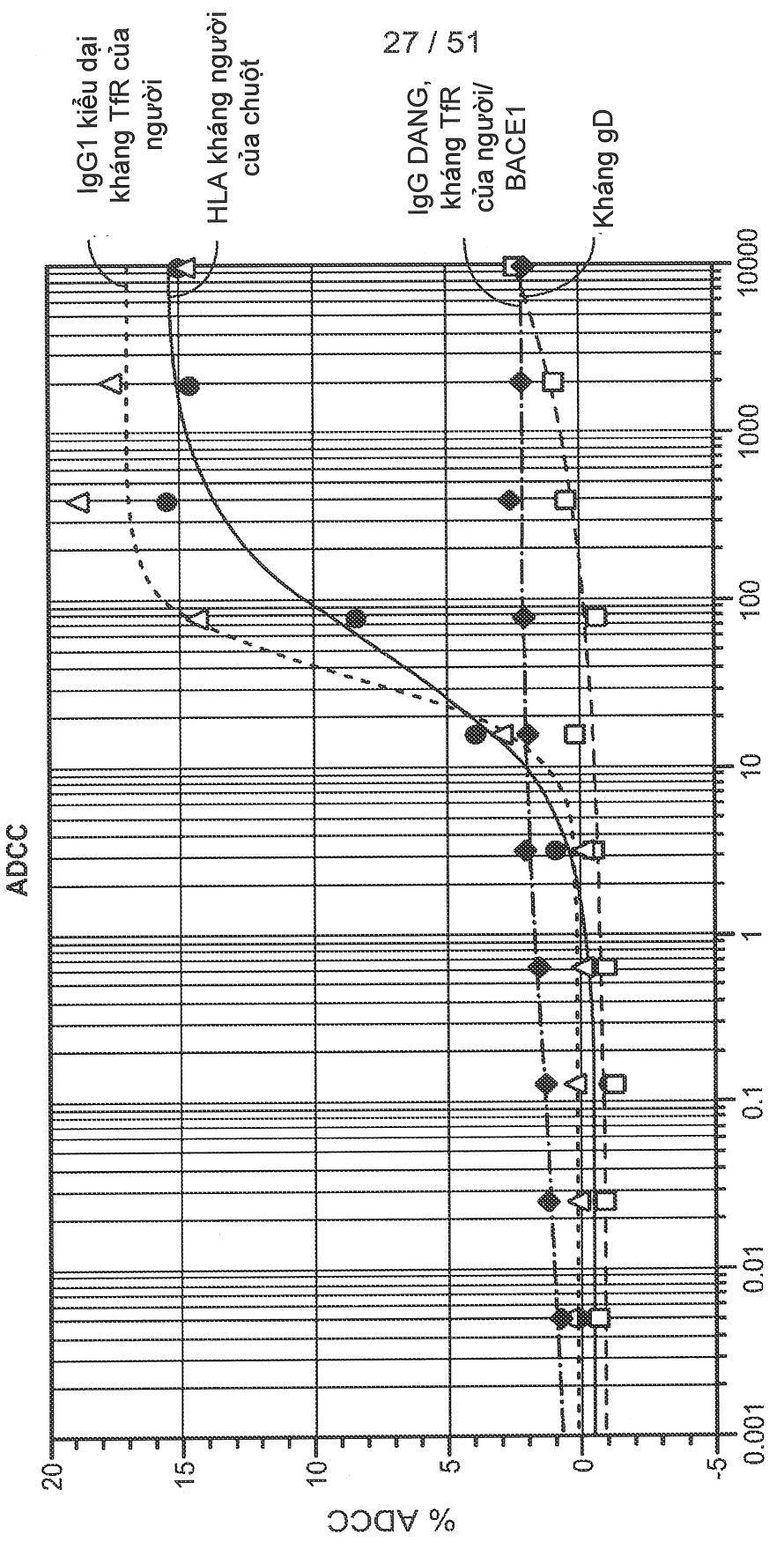

27 / 51
IgG1 kiểu dại kháng TfR của người
HLA kháng người của chuột
IgG DANG, kháng TfR của người/ BACE1
Kháng gD
ADCC
% ADCC
Nồng độ (ng/ml)
20
15
10
5
0
-5
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000

FIG. 8A

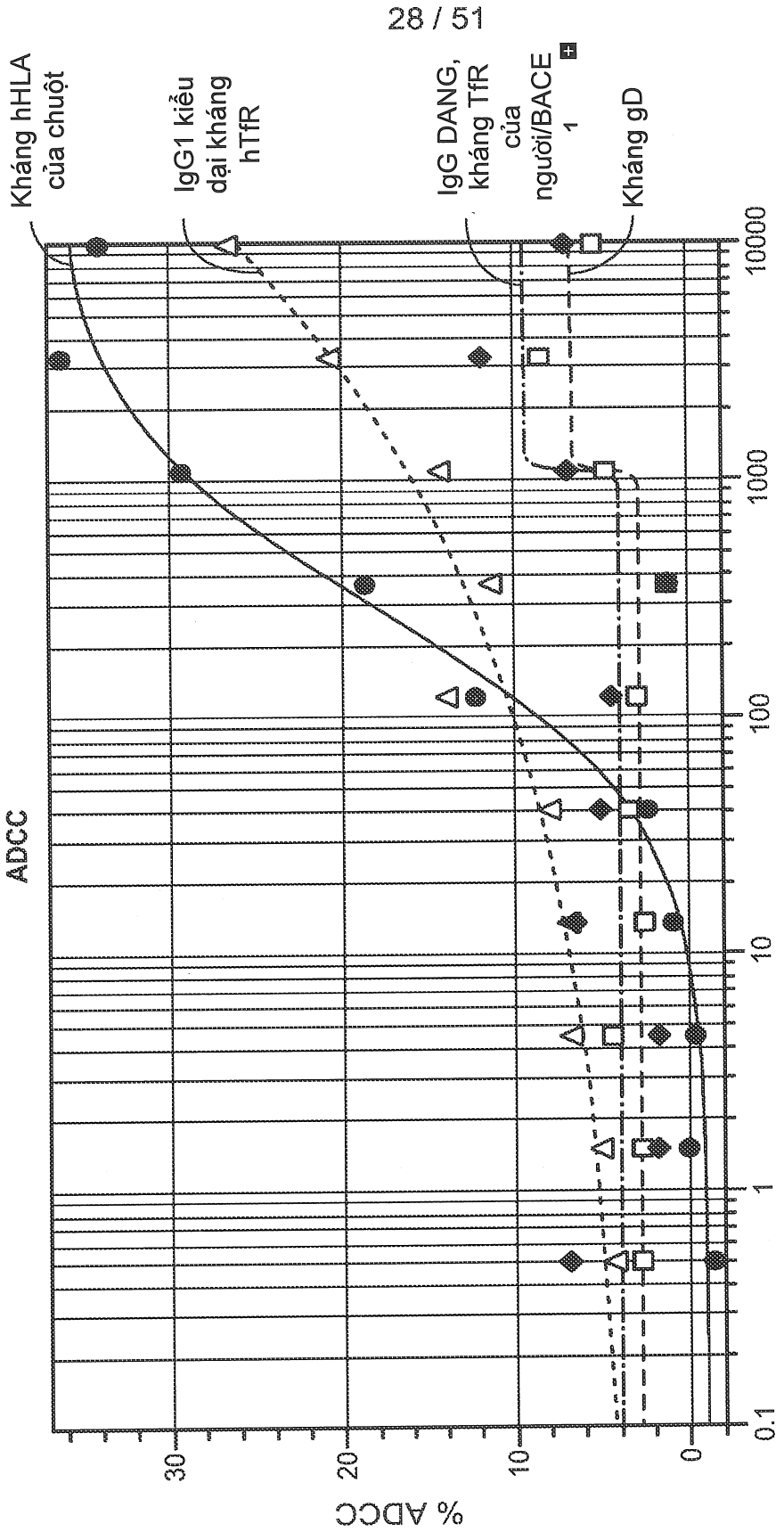

28 / 51
Kháng hHLA của chuột
IgG1 kiểu dại kháng hTfR
IgG DANG, kháng TfR của người/BACE 1
Kháng gD
ADCC
% ADCC
0
10
20
30
0.1
1
10
100
1000
10000
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 8B

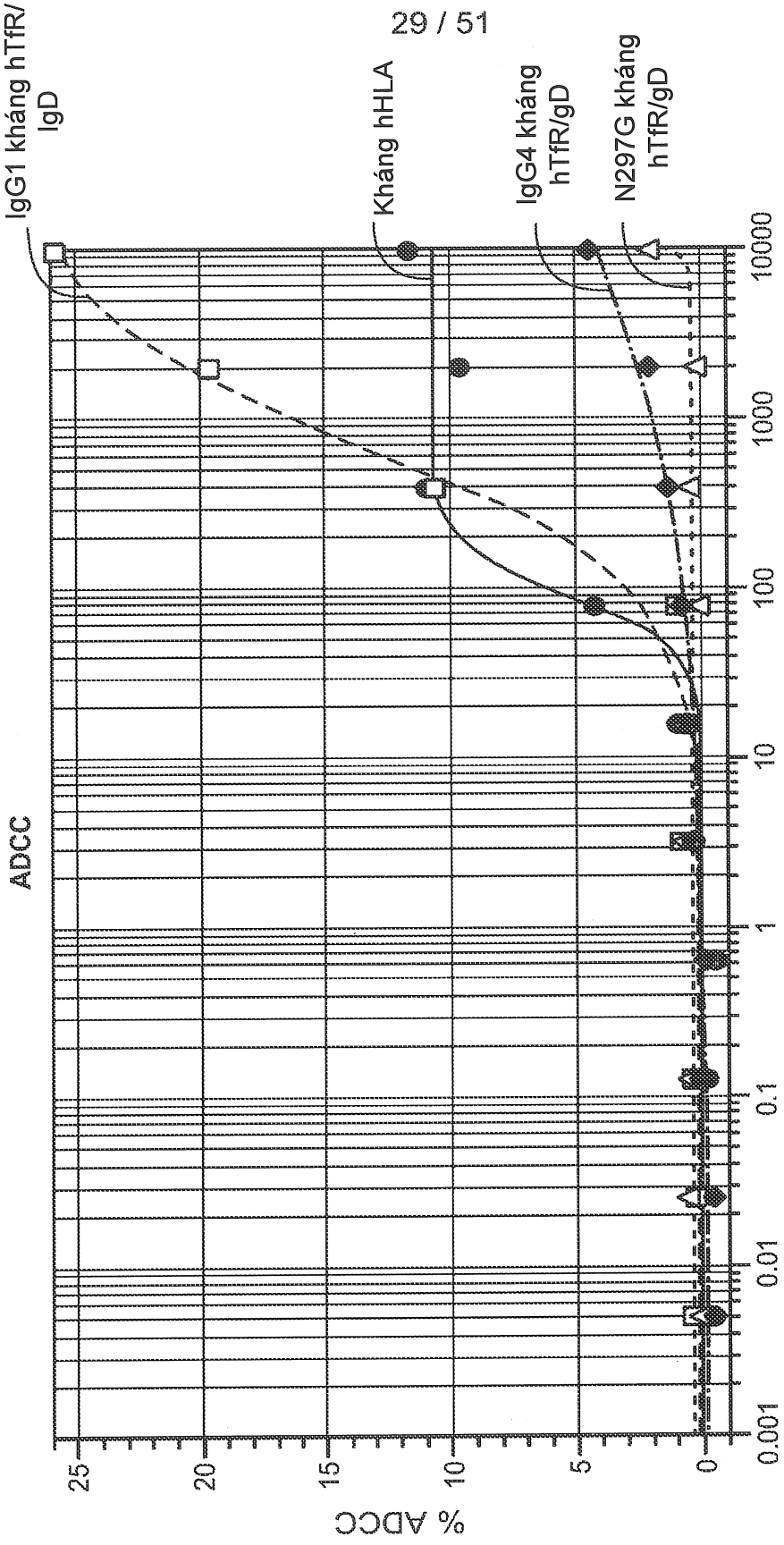

29 / 51
IgG1 kháng hTfR/ IgD
Kháng hHLA
IgG4 kháng hTfR/gD
N297G kháng hTfR/gD
ADCC
% ADCC
Nồng độ (ng/ml)
25
20
15
10
5
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000

FIG. 9A

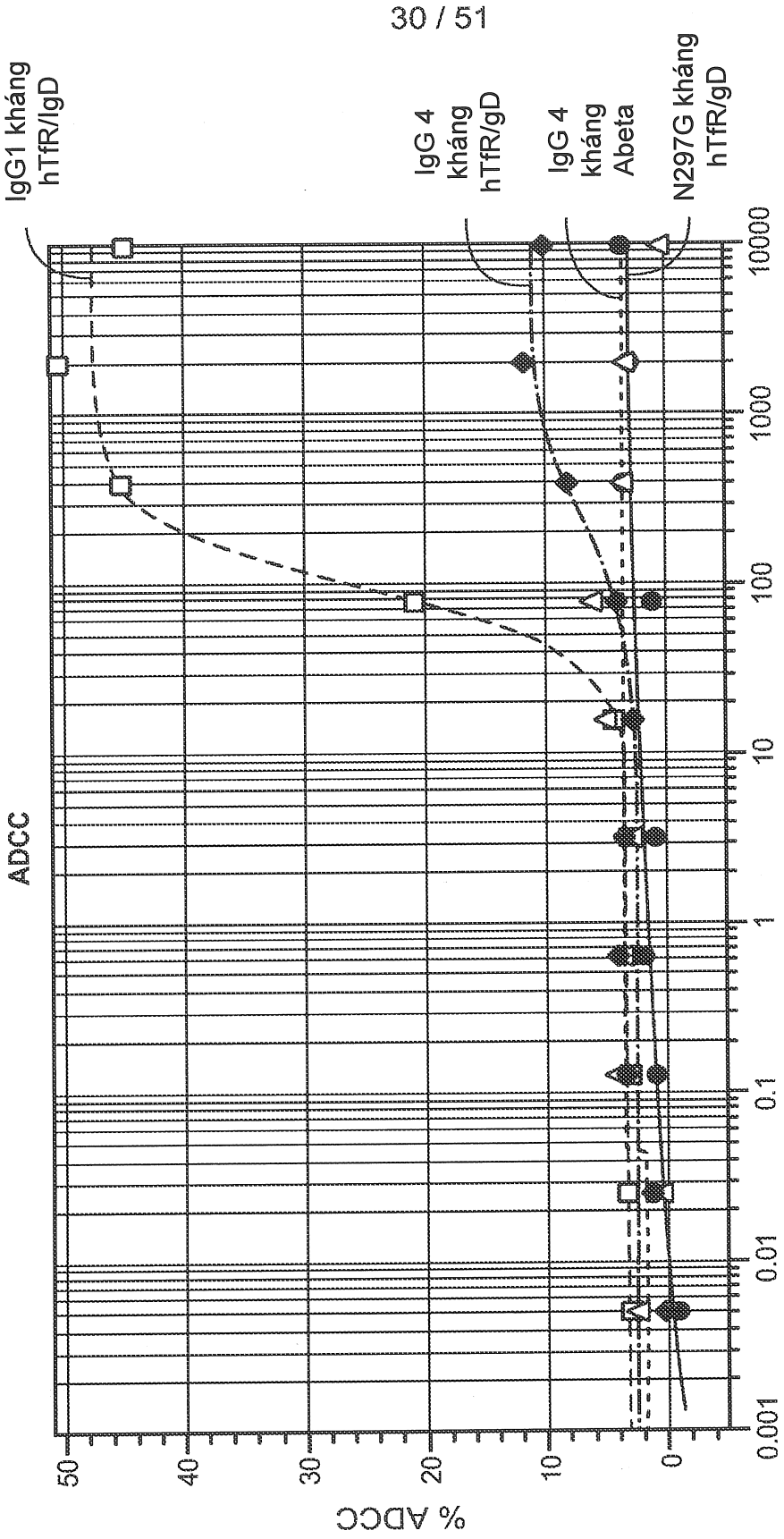

IgG1 kháng hTfR/IgD
IgG 4 kháng hTfR/gD
IgG 4 kháng Abeta
N297G kháng hTfR/gD
ADCC
% ADCC
Nồng độ (ng/ml)
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000

FIG. 9B

Nhóm	N	Tx	Isotyp	Liều lượng (mg/kg)	Biến thể TfR	Biacore huTfR (nM, Fab)	Biacore CynoTfR (nM, Fab)
1	5	Kháng gD	hIgG1	30			
2	5	Kháng TfR1/ BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.v5	6 ± 2	19 ± 9
3	5	Kháng TfR1/ BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.LC92A	230 ± 140	440 ± 160

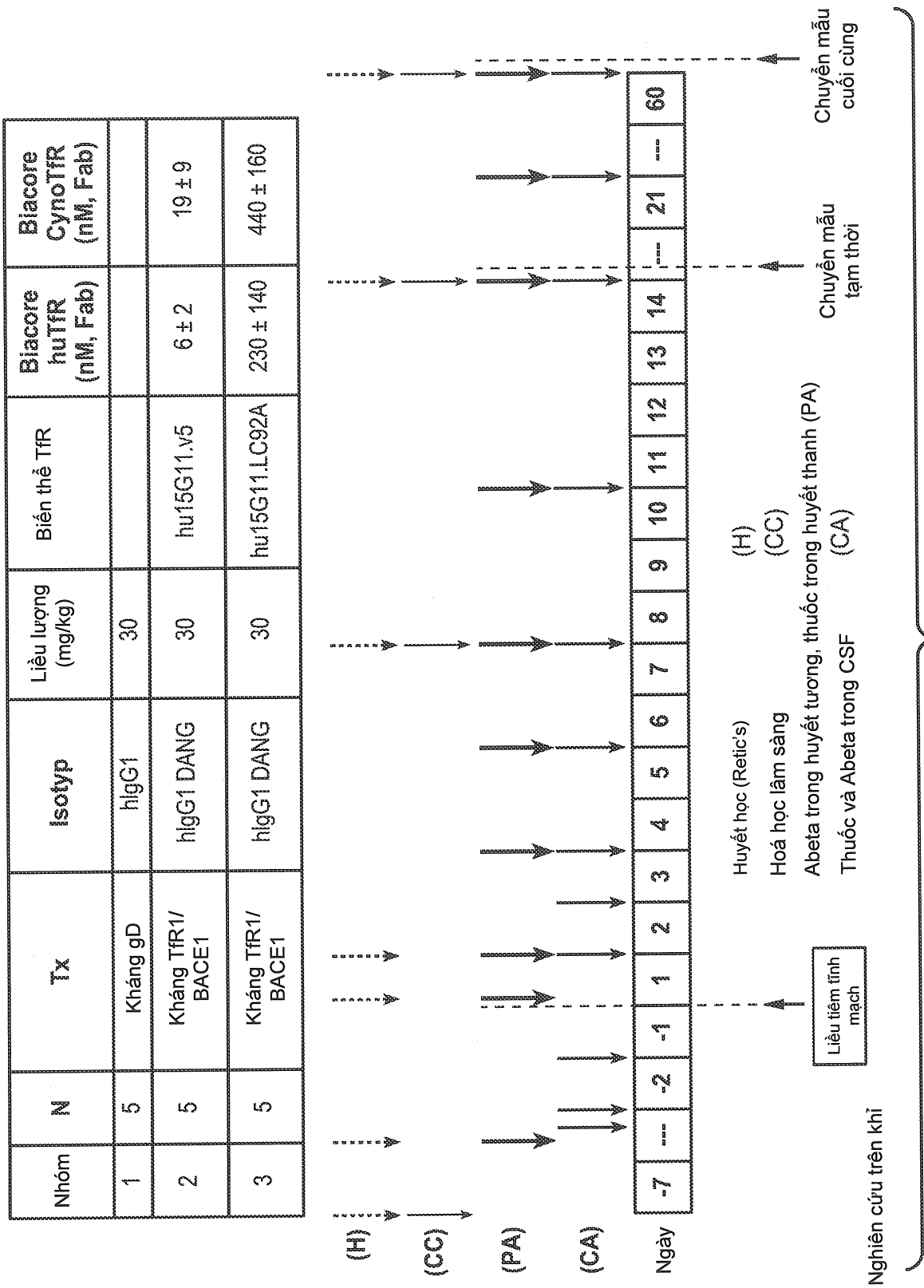


FIG. 10

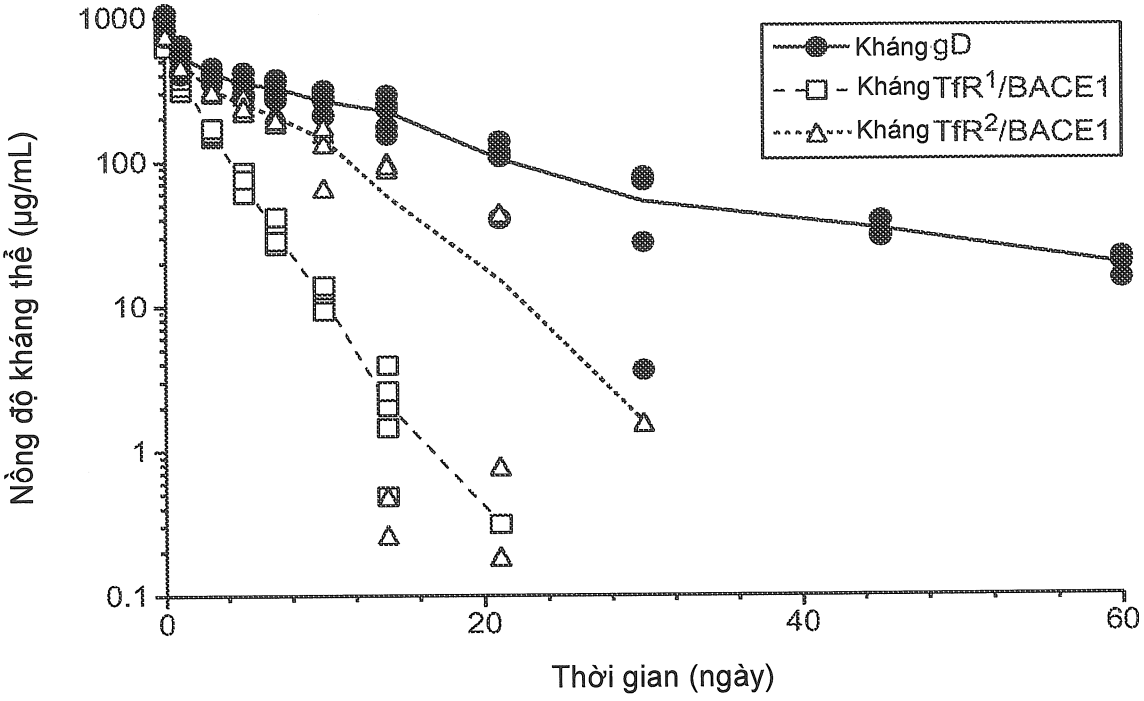


FIG. 11A

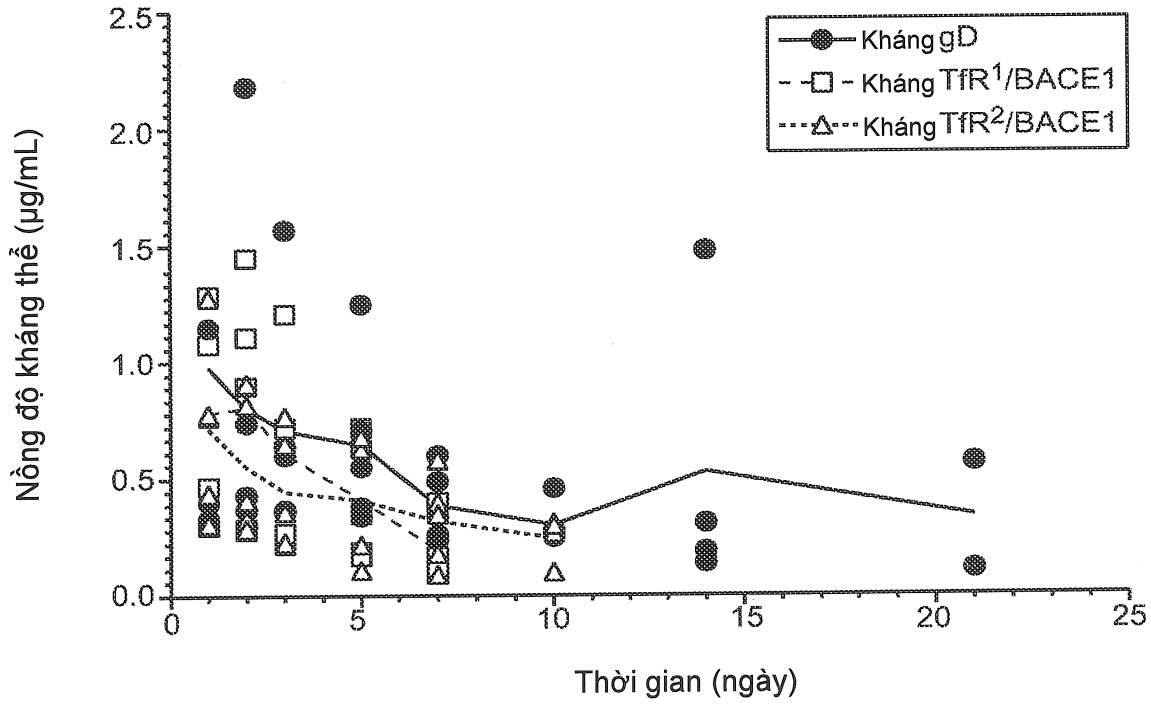


FIG. 11B

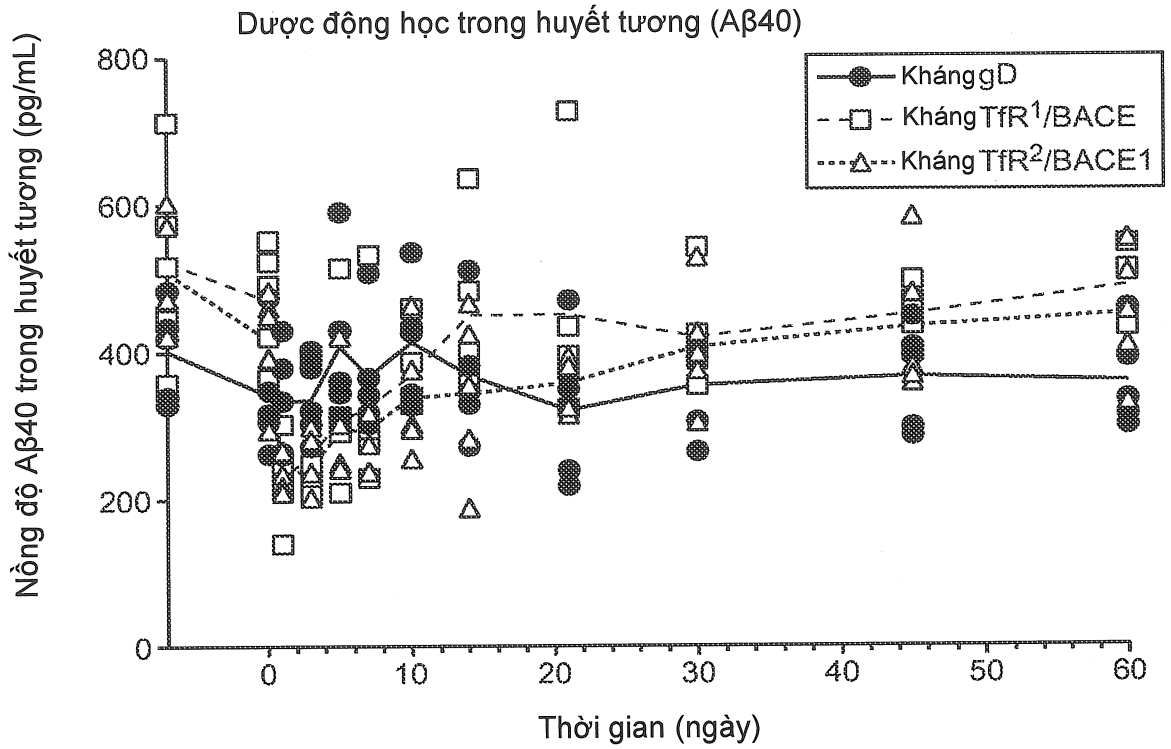


FIG. 12A

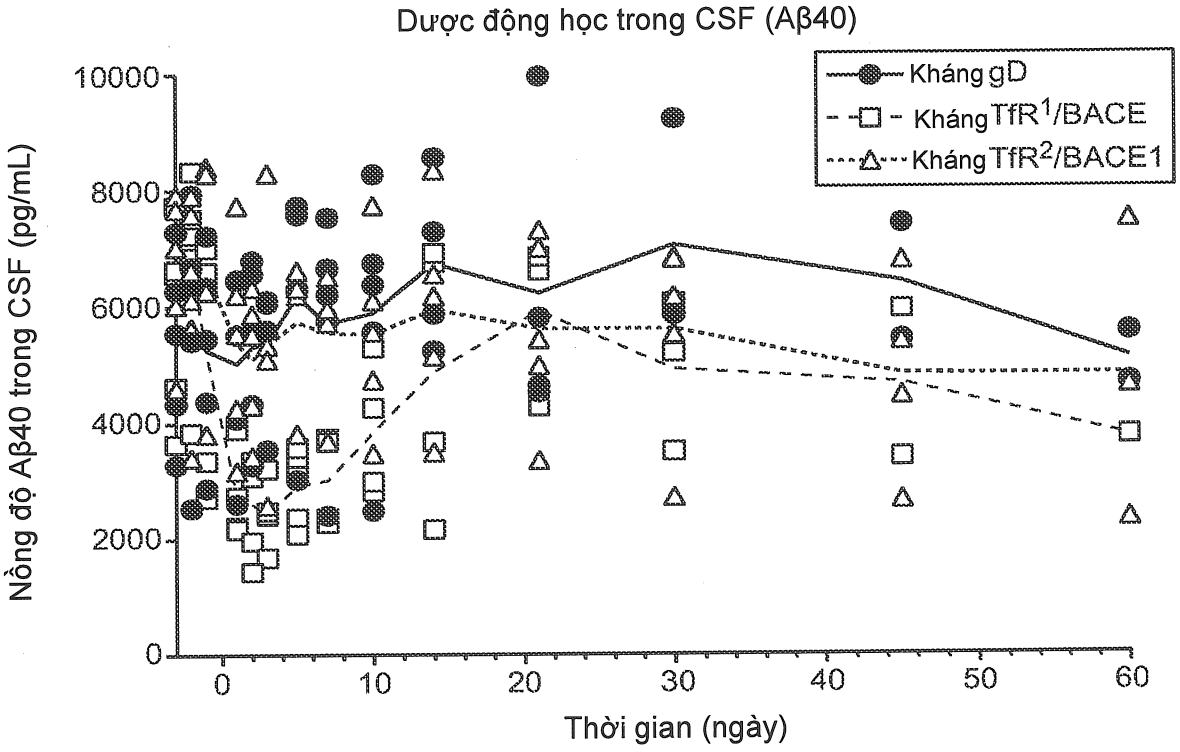


FIG. 12B

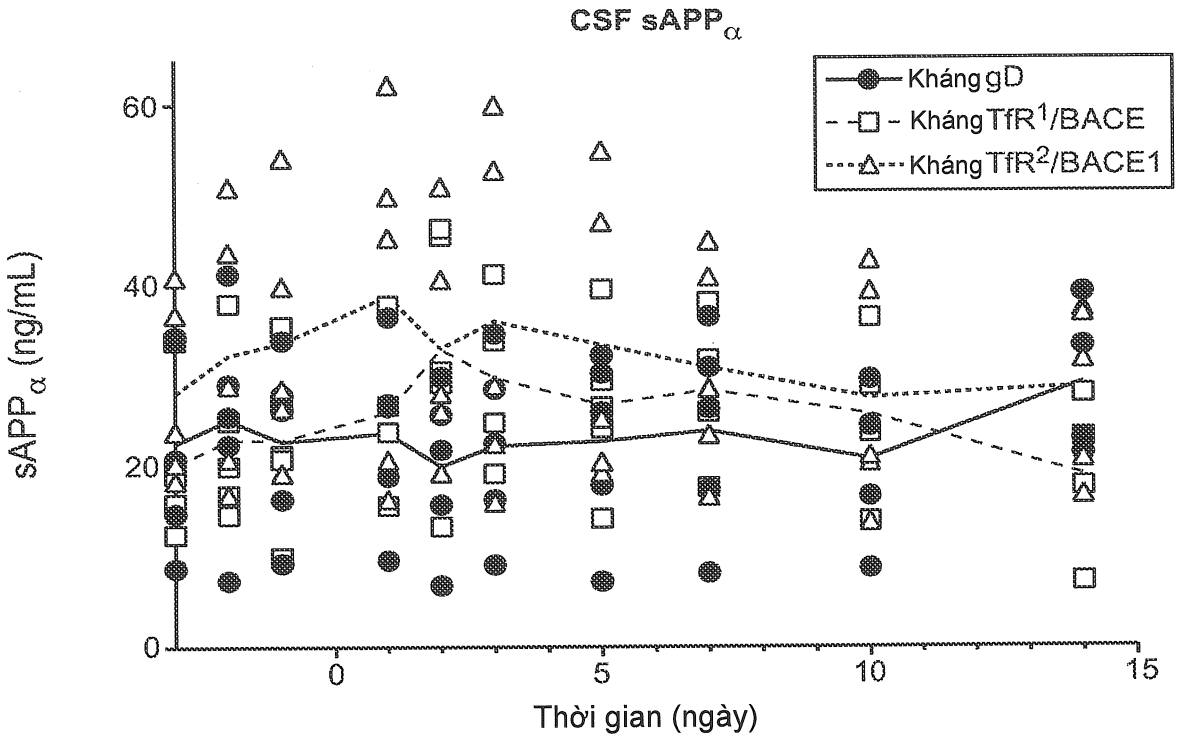


FIG. 12C

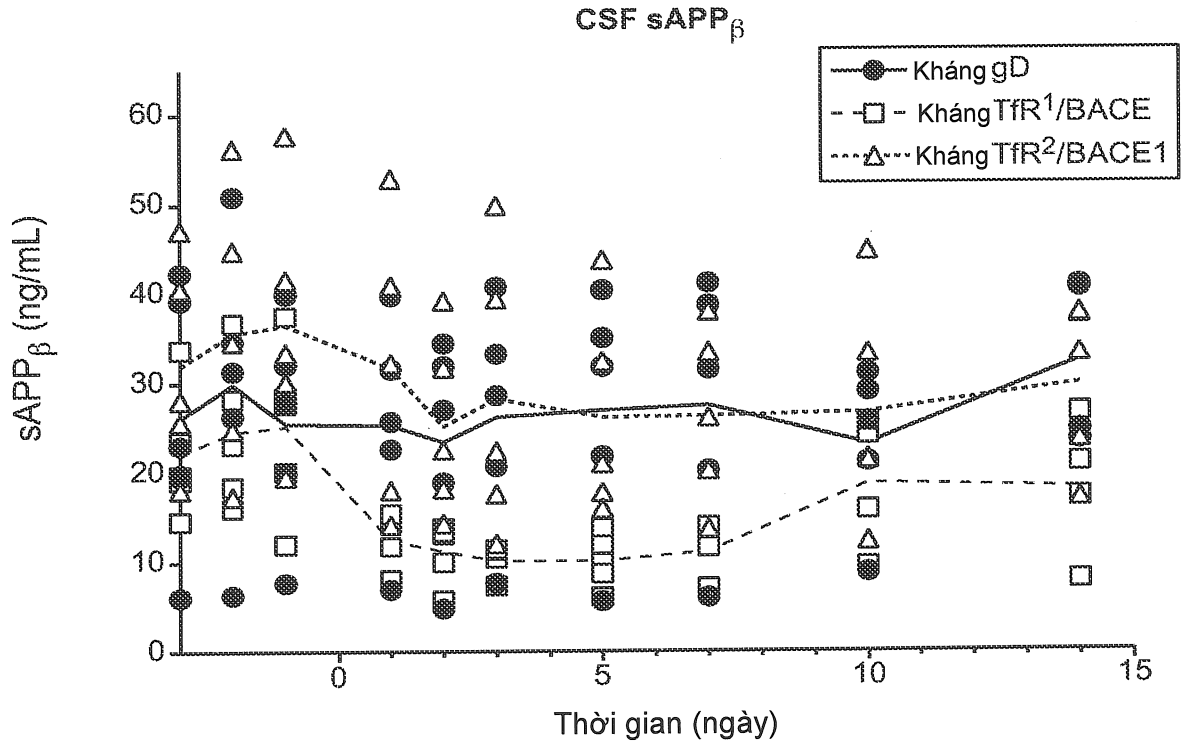


FIG. 12D

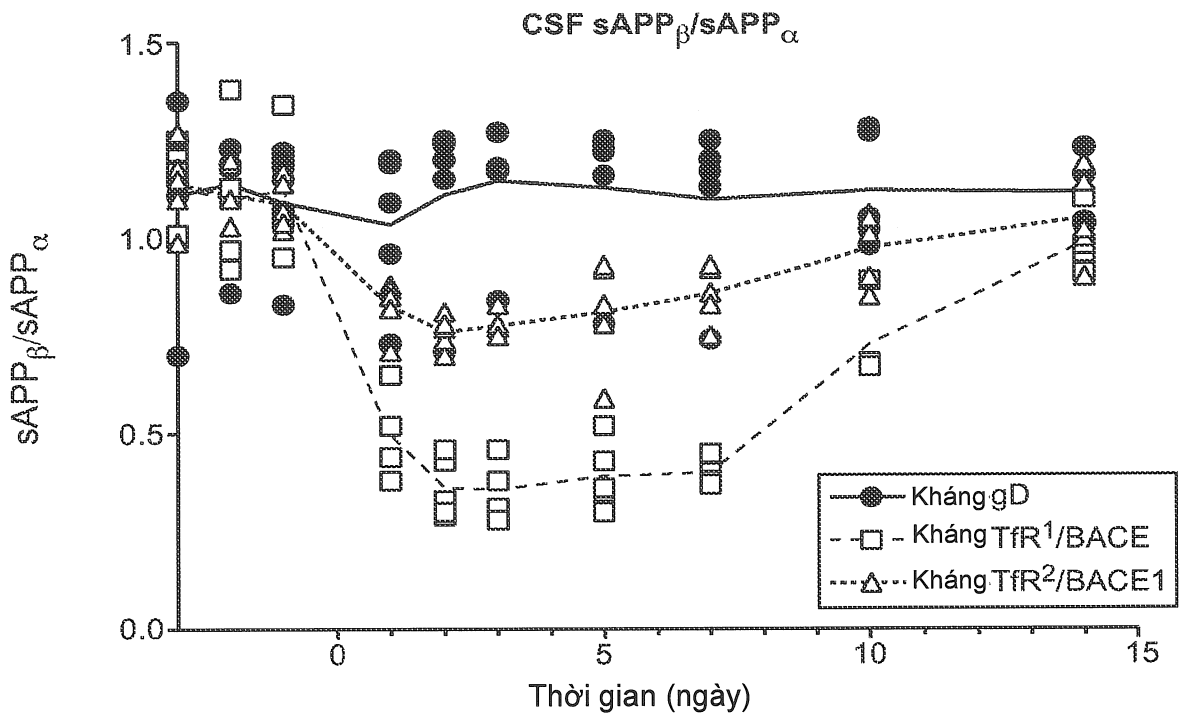

CSF sAPPβ/sAPPα
sAPPβ/sAPPα
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
Thời gian (ngày)
Kháng gD
Kháng TfR1/BACE
Kháng TfR2/BACE1

FIG. 12E

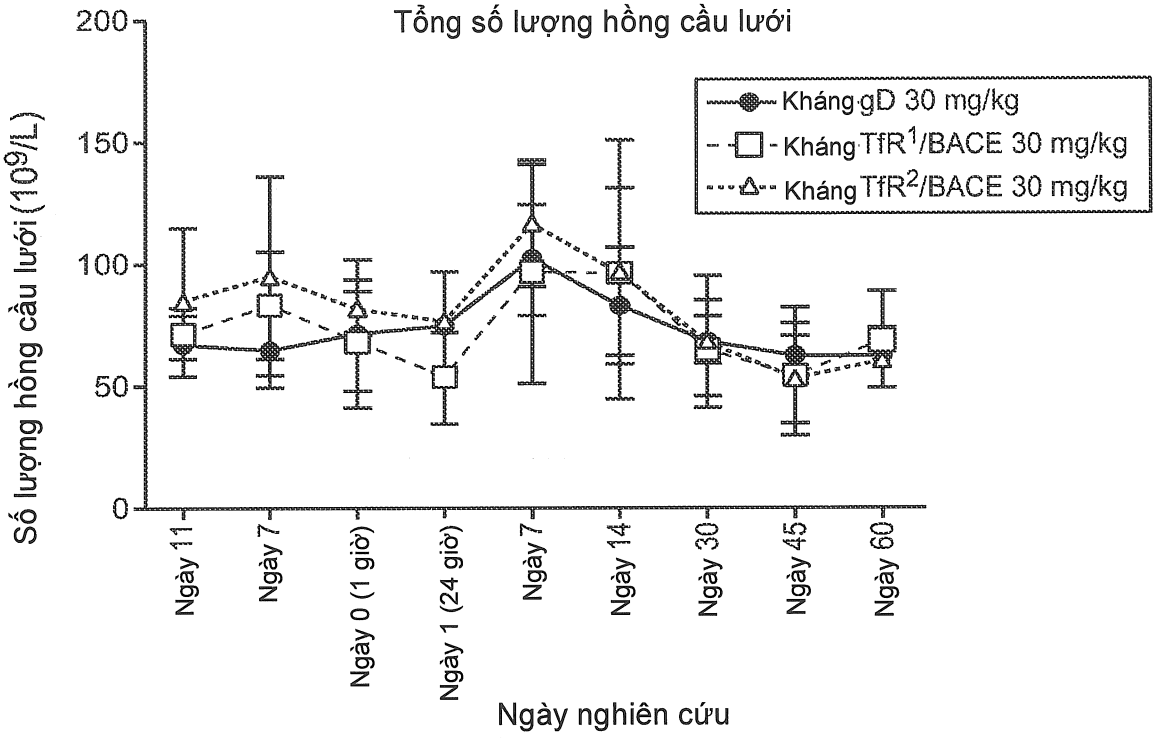


FIG. 13A

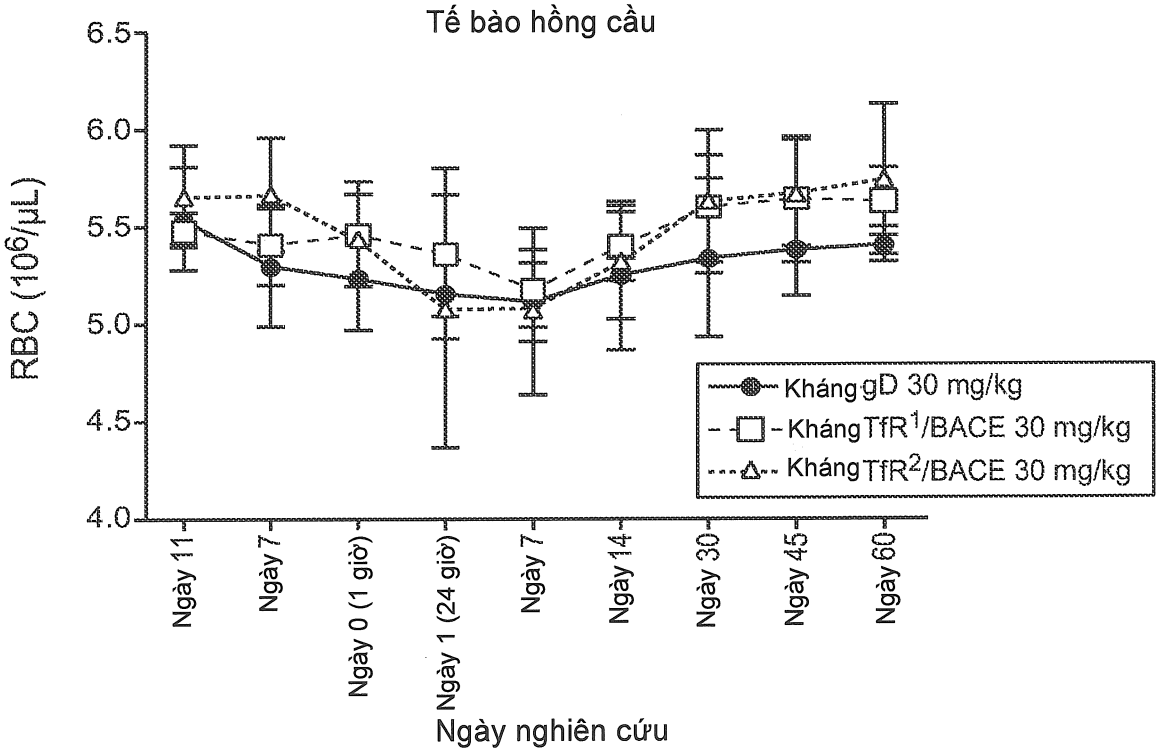


FIG. 13B

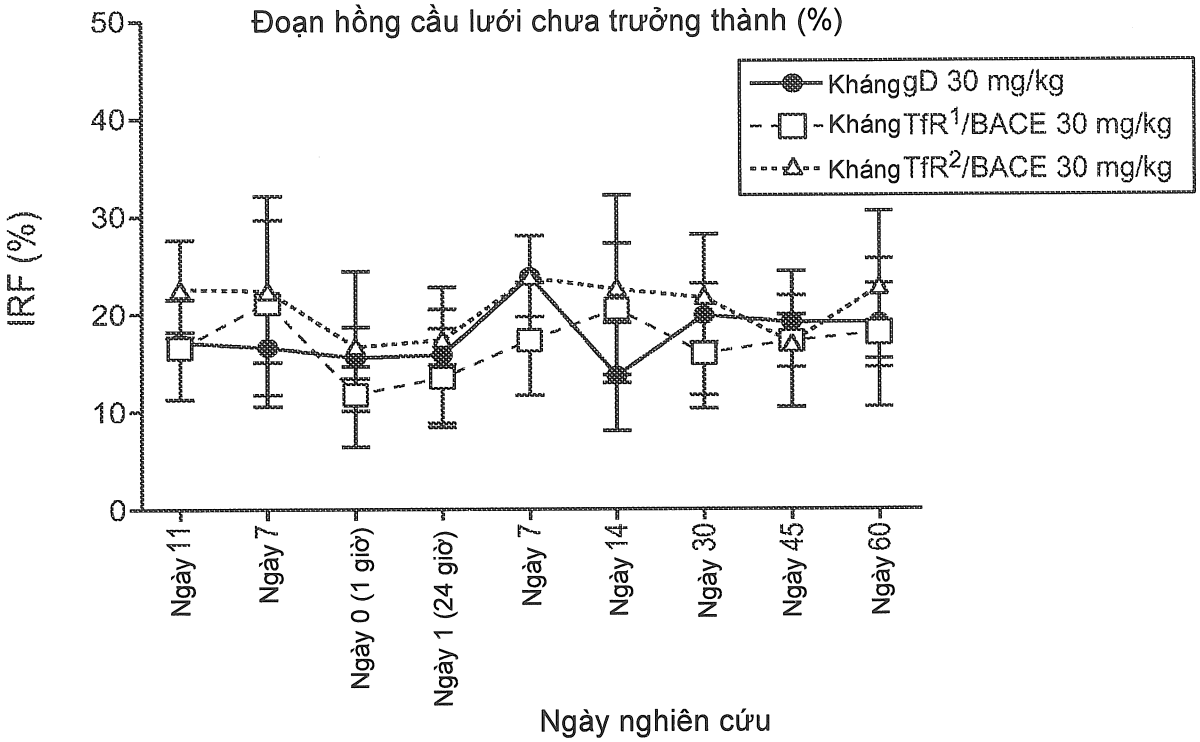


FIG. 13C

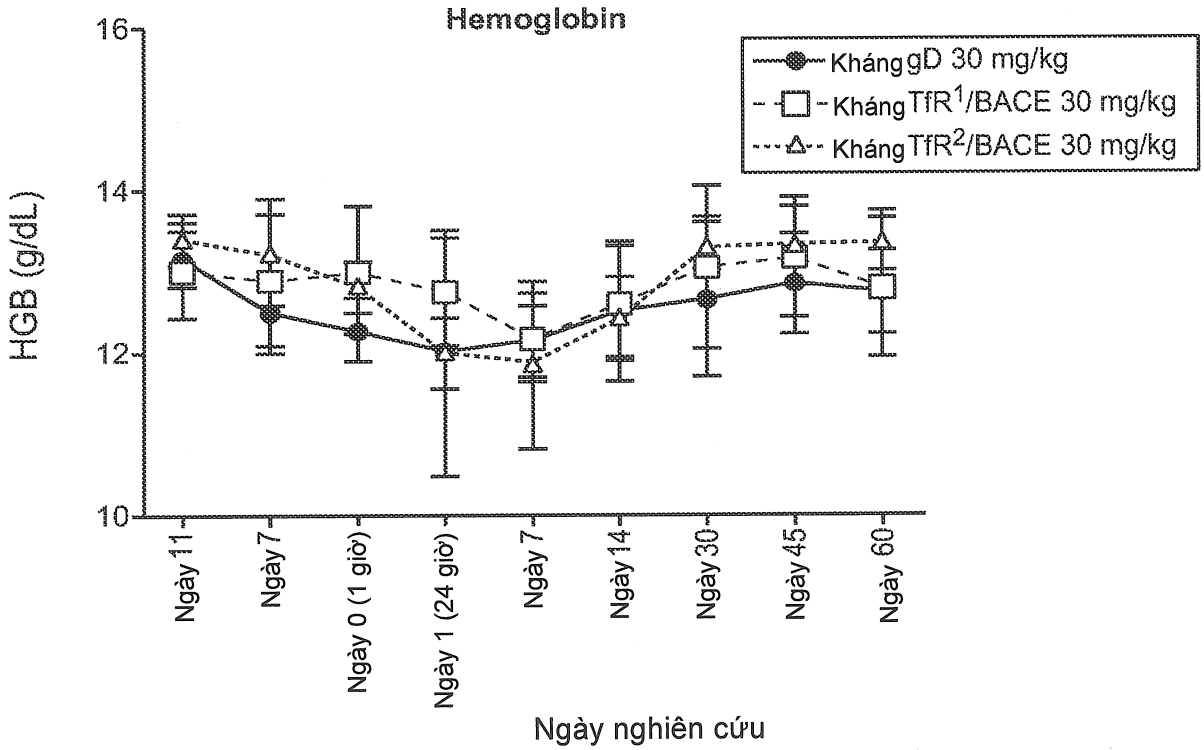


FIG. 13D

Nhóm	N	Tx	Isotyp	Liều lượng (mg/kg)	Biến thể TfR	Biacore huTfR (nM, Fab)	Biacore CynoTfR (nM, Fab)
1	5	Kháng gD	hIgG1	30			
2	5	Kháng TfR[1]/BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.v5	6 ± 2	19 ± 9
3	5	Kháng TfR[2]/BACE1	hIgG1 DANG	30	hu15G11.LC92A	230 ± 140	440 ± 160
4	5	Kháng BACE1	hIgG1	30	N/A	-	-

FIG. 14

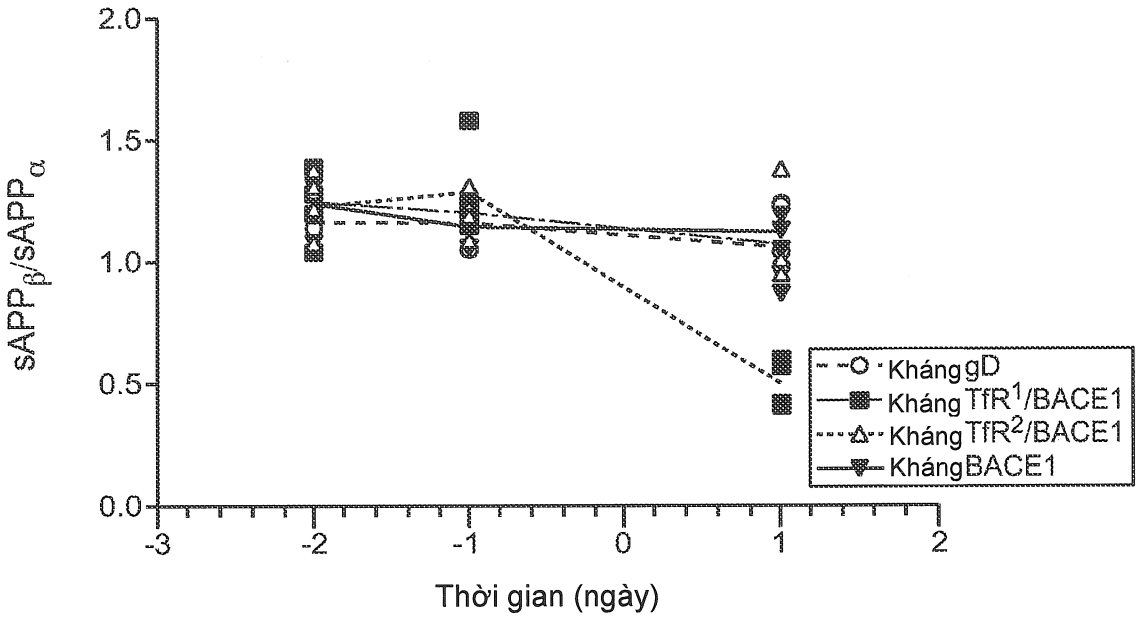


FIG. 15A

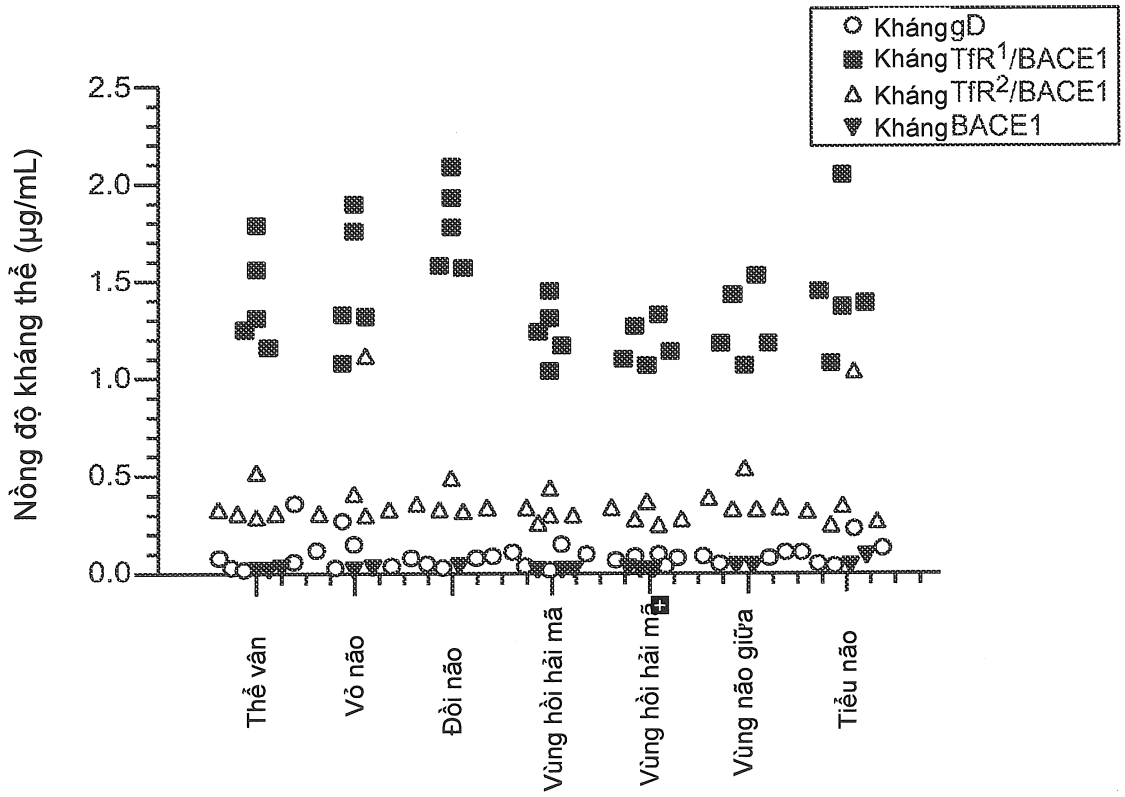


FIG. 15B

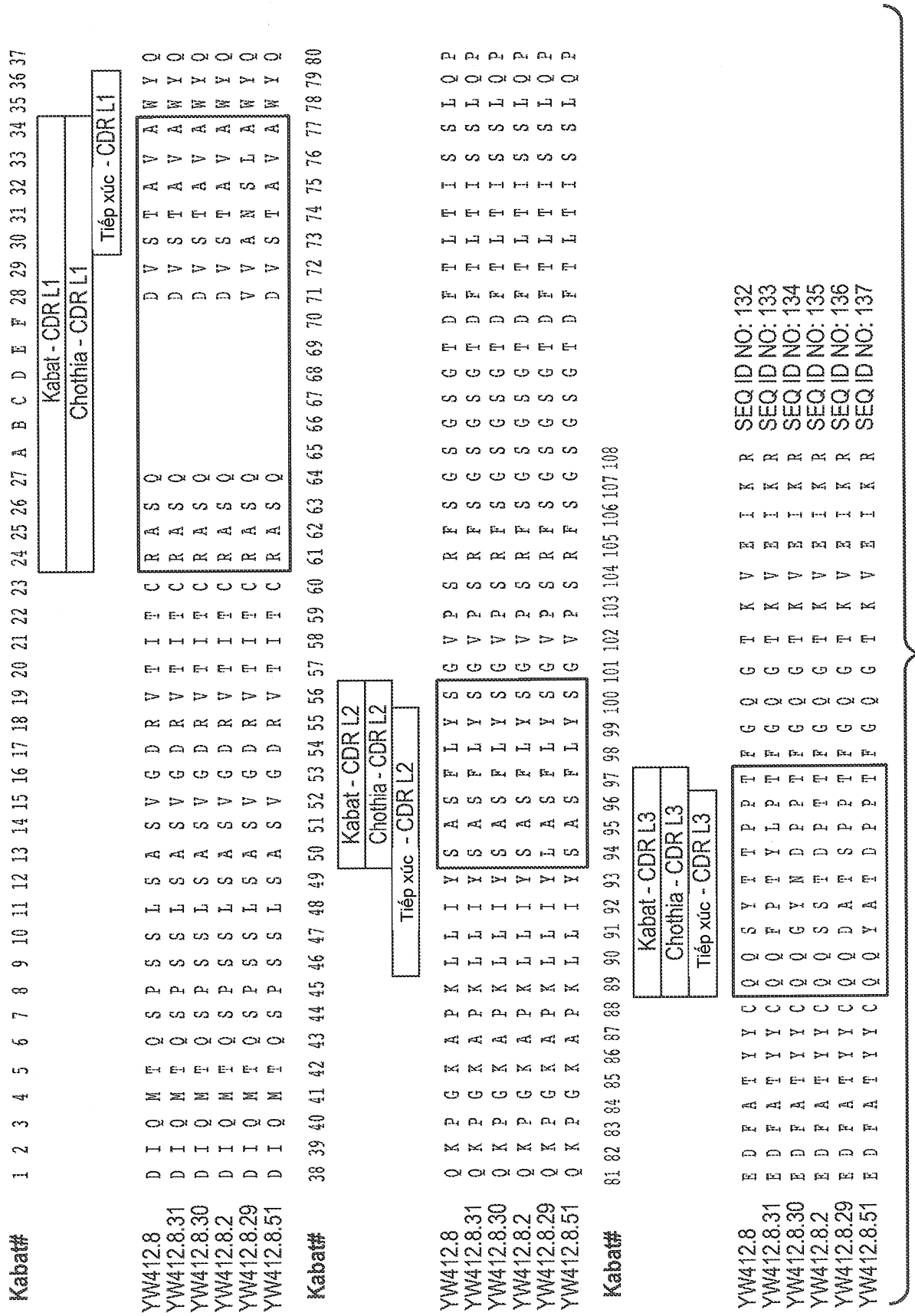

Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Tiếp xúc - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Tiếp xúc - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Tiếp xúc - CDR L3
Kabat#
YW412.8
YW412.8.31
YW412.8.30
YW412.8.2
YW412.8.29
YW412.8.51
SEQ ID NO: 132
SEQ ID NO: 133
SEQ ID NO: 134
SEQ ID NO: 135
SEQ ID NO: 136
SEQ ID NO: 137

FIG. 16A

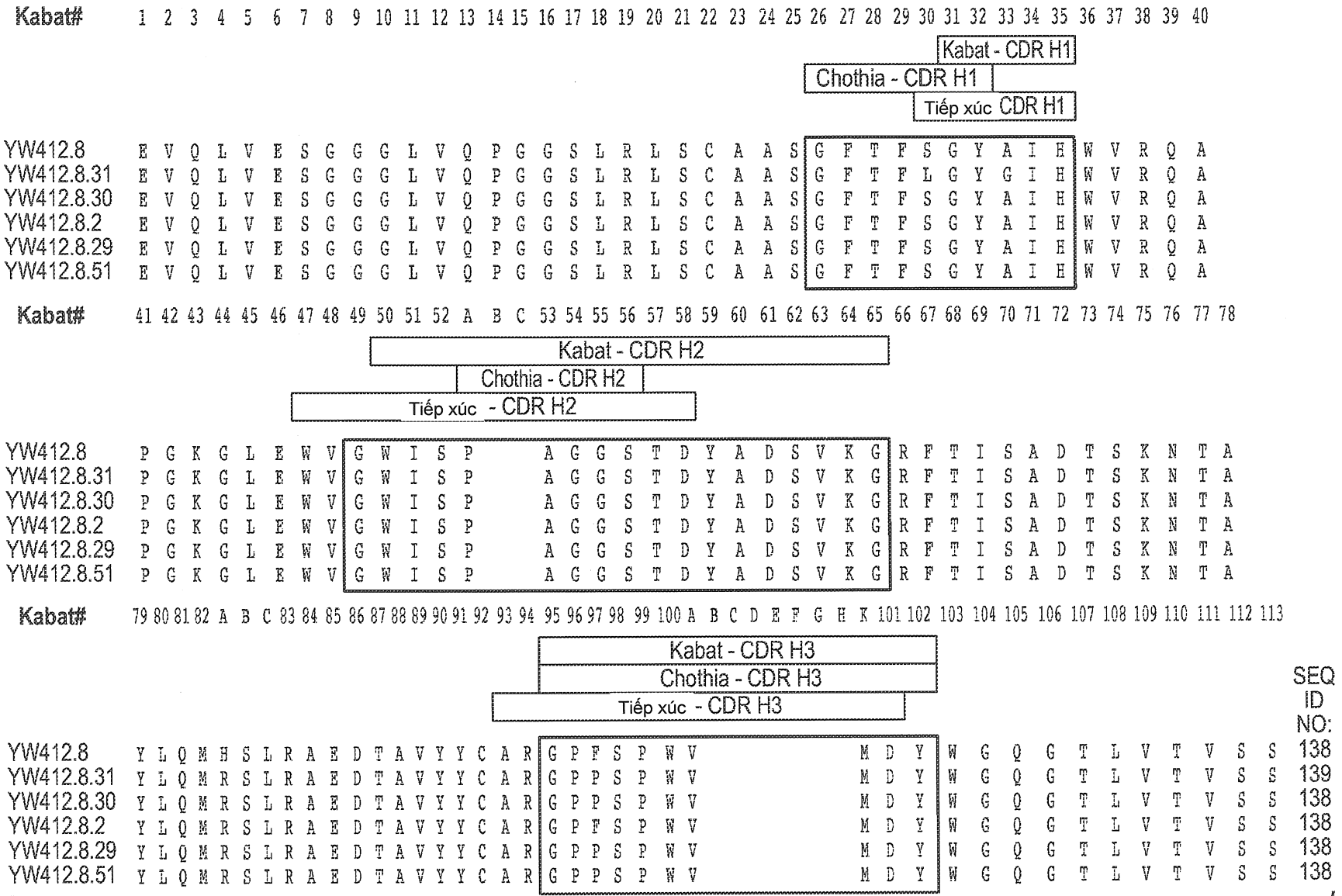

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Tiếp xúc CDR H1
YW412.8 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.31 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F L G Y G I H W V R Q A
YW412.8.30 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.2 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.29 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
YW412.8.51 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S G Y A I H W V R Q A
Kabat#
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Tiếp xúc - CDR H2
YW412.8 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.31 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.30 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.2 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.29 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
YW412.8.51 P G K G L E W V G W I S P A G G S T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A
Kabat#
79 80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Tiếp xúc - CDR H3
SEQ ID NO:
YW412.8 Y L Q M H S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 138
YW412.8.31 Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R G P P S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 139
YW412.8.30 Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R G P P S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 138
YW412.8.2 Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R G P F S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 138
YW412.8.29 Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R G P P S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 138
YW412.8.51 Y L Q M R S L R A E D T A V Y Y C A R G P P S P W V M D Y W G Q G T L V T V S S 138

FIG. 16B

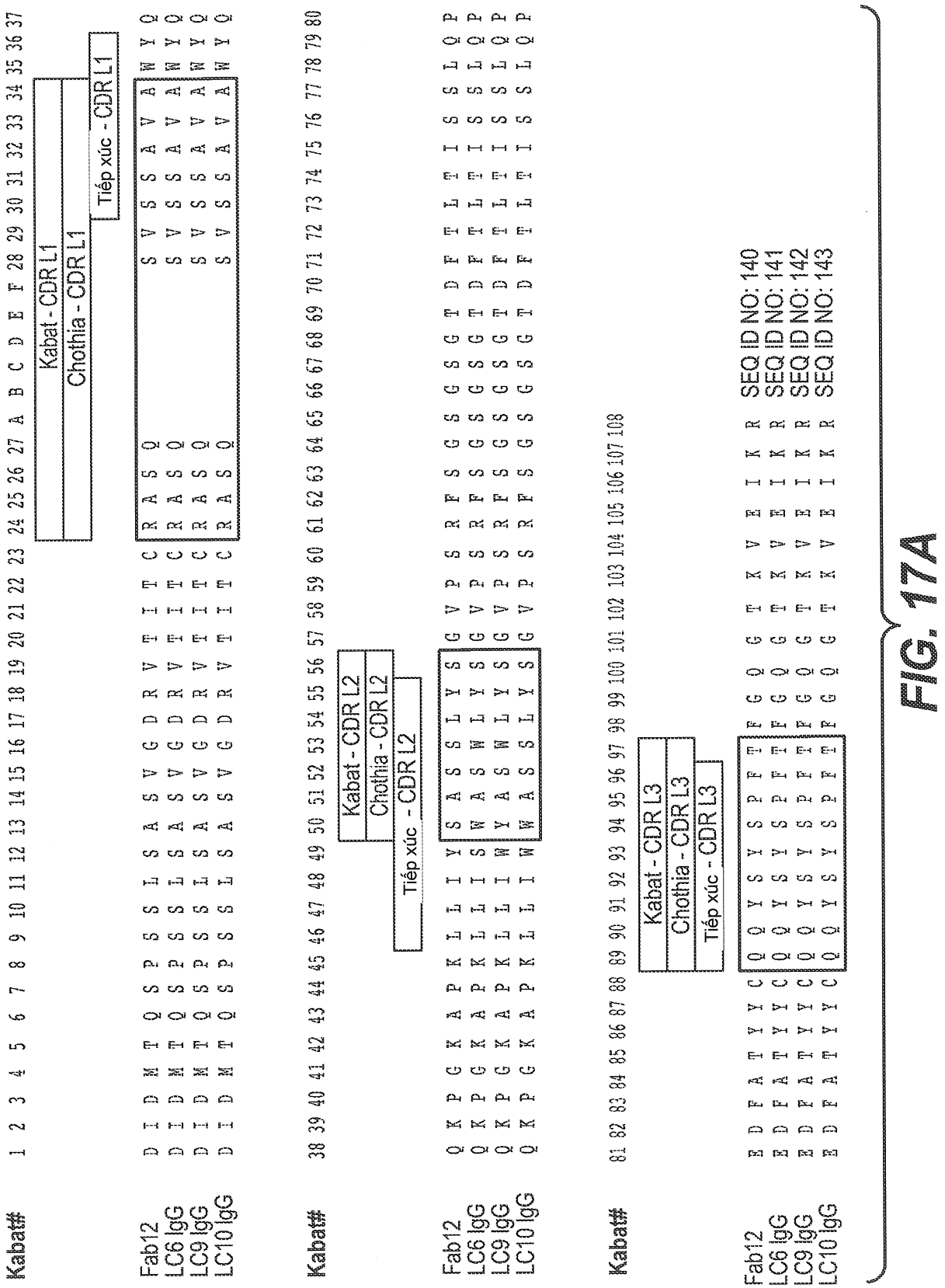

Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Tiếp xúc - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Tiếp xúc - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Tiếp xúc - CDR L3
Kabat#
Fab12
LC6 IgG
LC9 IgG
LC10 IgG
SEQ ID NO: 140
SEQ ID NO: 141
SEQ ID NO: 142
SEQ ID NO: 143

FIG. 17A

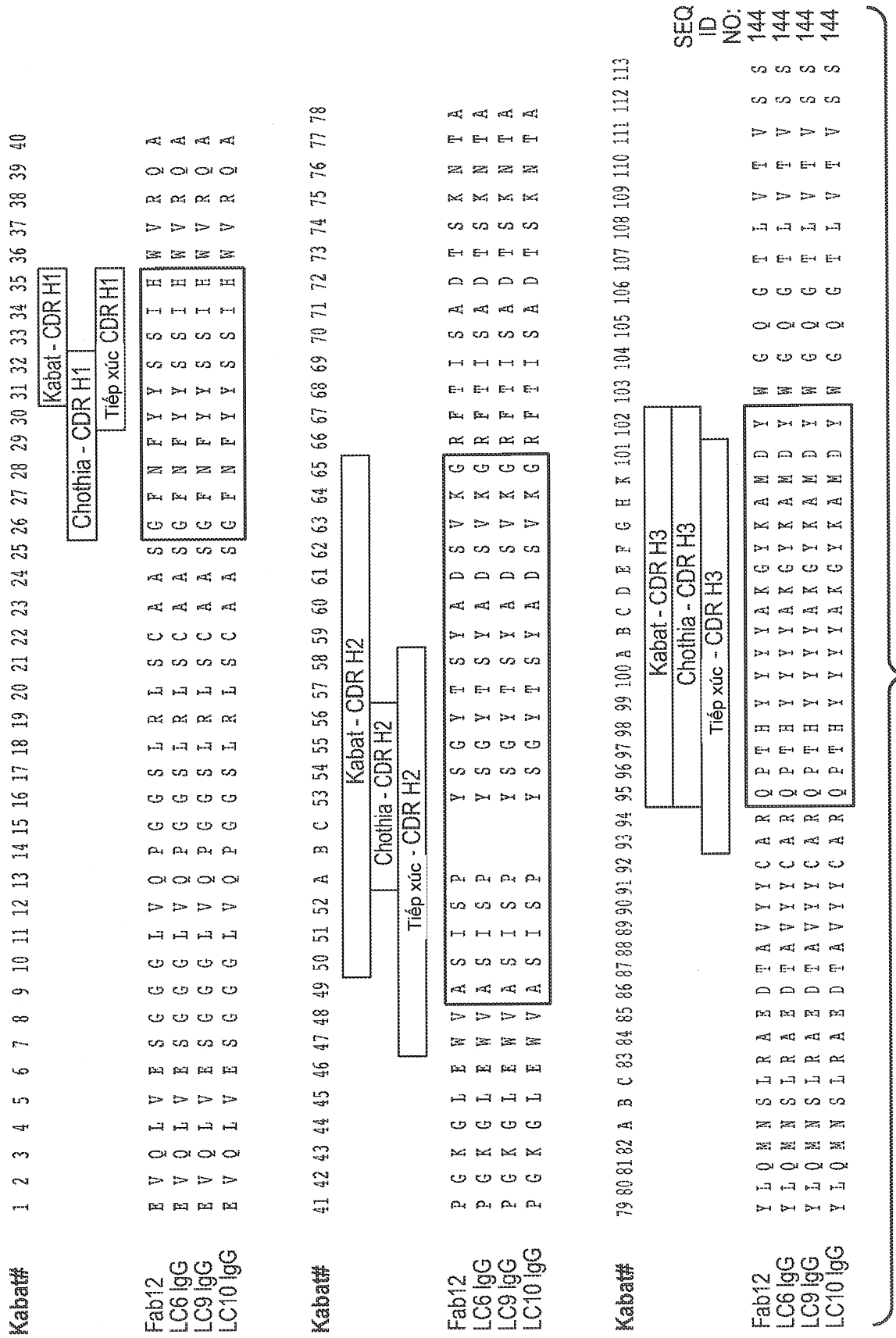

Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Tiếp xúc CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Tiếp xúc - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Tiếp xúc - CDR H3
SEQ ID NO:
144
144
144
144

FIG. 17B

```
  1  EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLELVAS
 51  INSNGGSTYY PDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCASGD
101  YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT
151  VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT KTYTCNVDHK
201  PSNTKVDKRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
251  VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV
301  LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM
351  TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS
401  RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLG  (SEQ 10 NO: 145)
```

FIG. 18A

```
  1  DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLV YSNGDTYLHW YLQKPGQSPQ
 51  LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQSTHVP
101  WTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151  VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201  VTHQGLSSPV TKSFNRGEC  (SEQ 10 NO: 146)
```

FIG. 18B

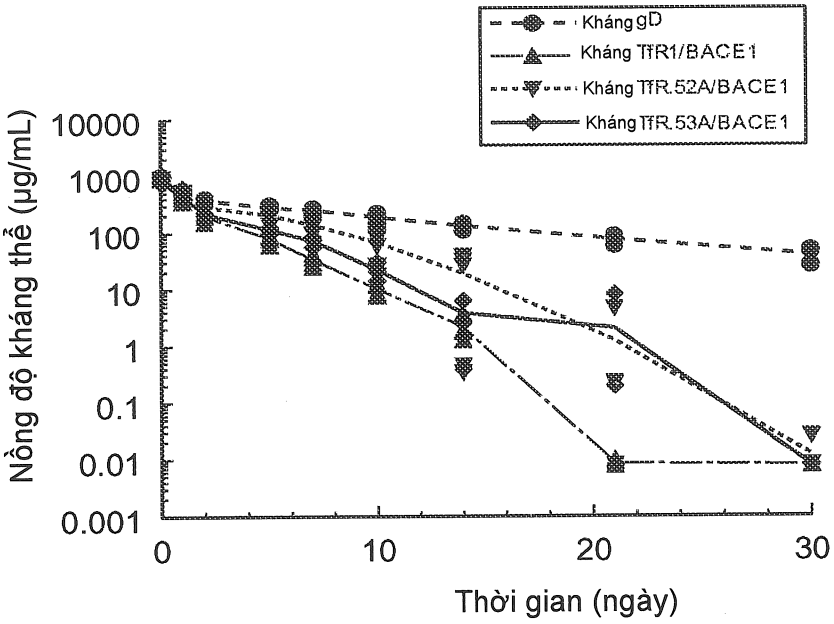

Kháng gD
Kháng TfR1/BACE1
Kháng TfR.52A/BACE1
Kháng TfR.53A/BACE1
Nồng độ kháng thể (µg/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
10
20
30
Thời gian (ngày)

FIG. 19

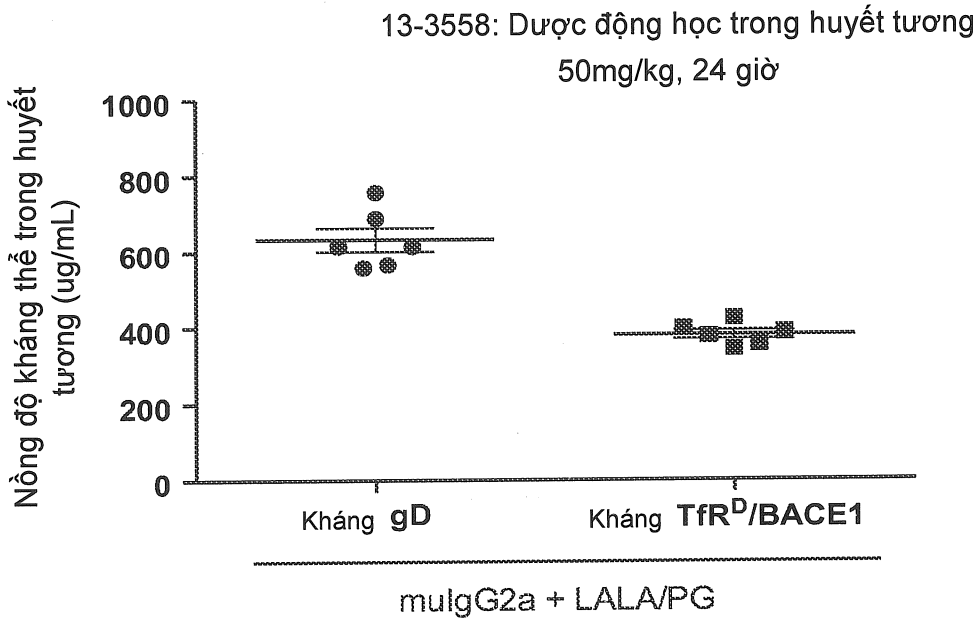

13-3558: Dược động học trong huyết tương
50mg/kg, 24 giờ
Nồng độ kháng thể trong huyết tương (ug/mL)
1000
800
600
400
200
0
Kháng gD
Kháng TfRD/BACE1
mulgG2a + LALA/PG

FIG. 20

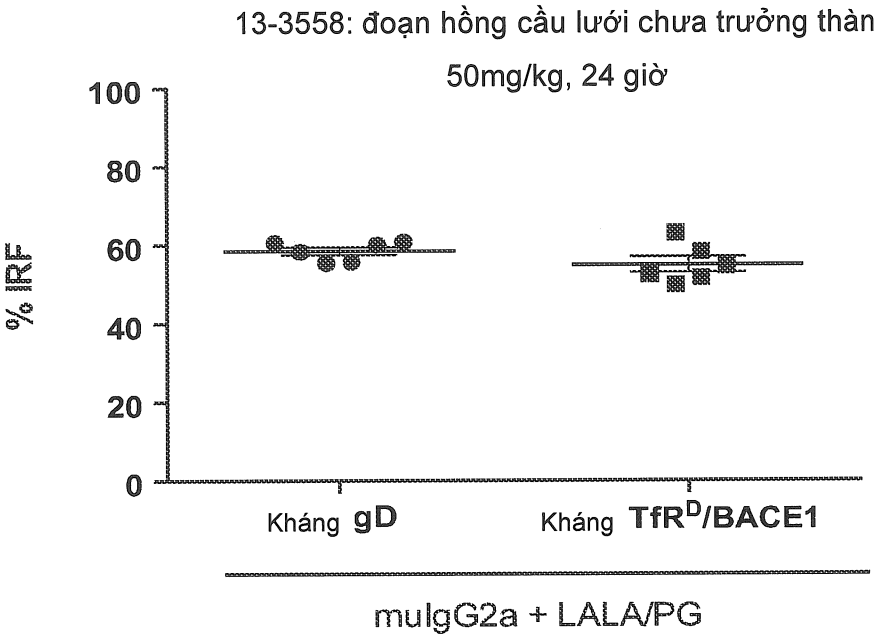


FIG. 21A

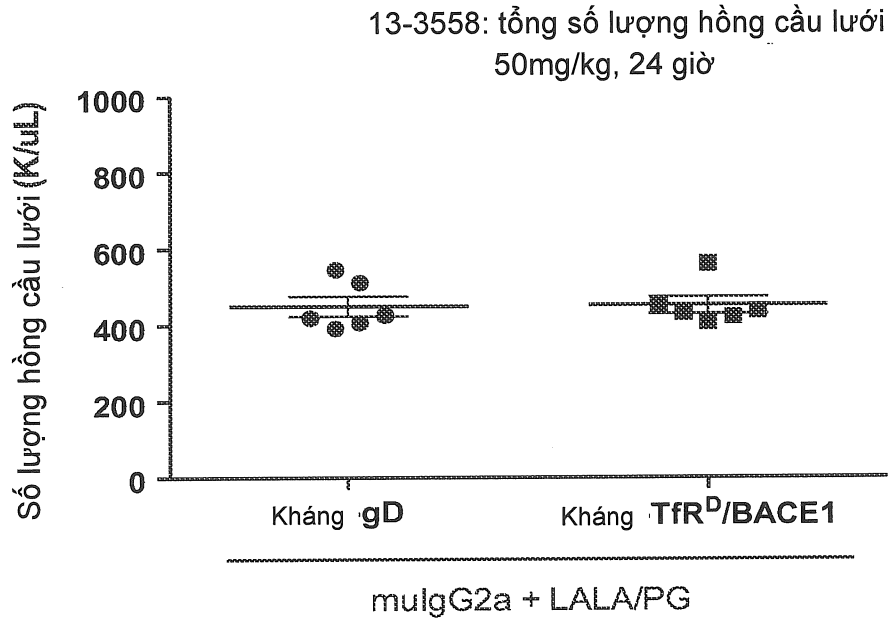


FIG. 21B

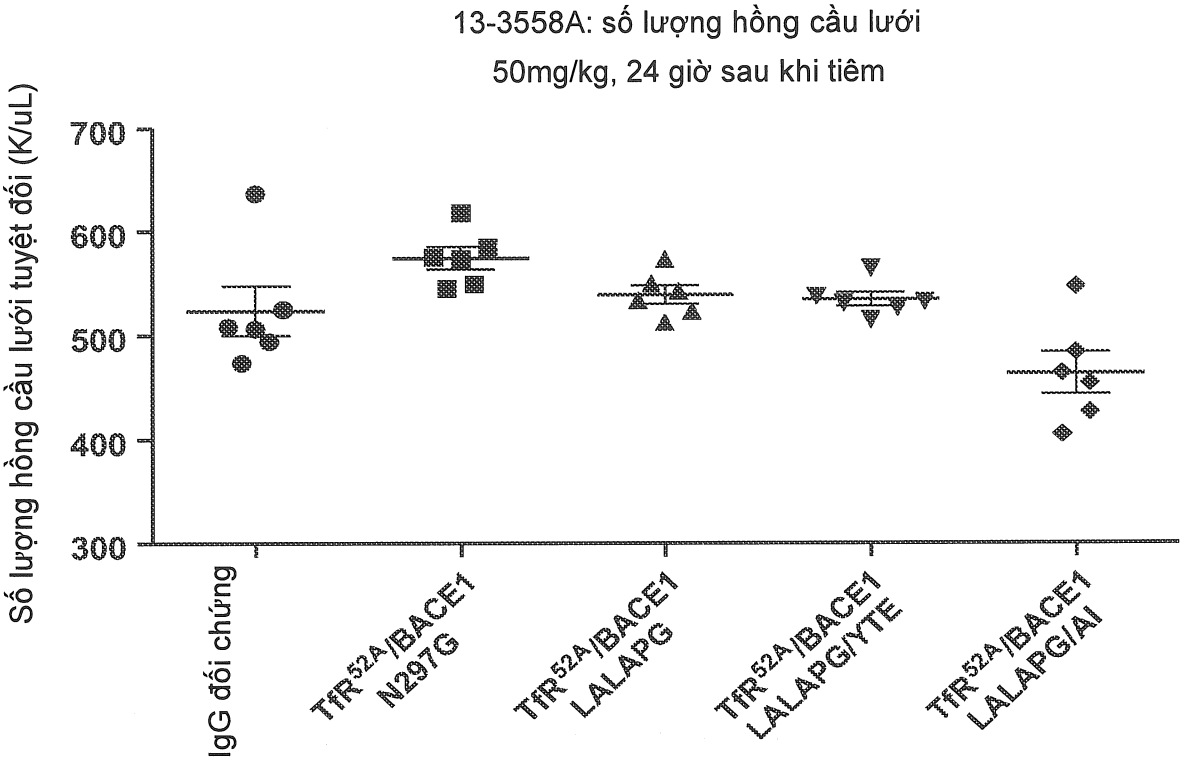

13-3558A: số lượng hồng cầu lưới
50mg/kg, 24 giờ sau khi tiêm
Số lượng hồng cầu lưới tuyệt đối (K/uL)
700
600
500
400
300
IgG đối chứng
TfR52A/BACE1 N297G
TfR52A/BACE1 LALAPG
TfR52A/BACE1 LALAPG/YTE
TfR52A/BACE1 LALAPG/AI

FIG. 22

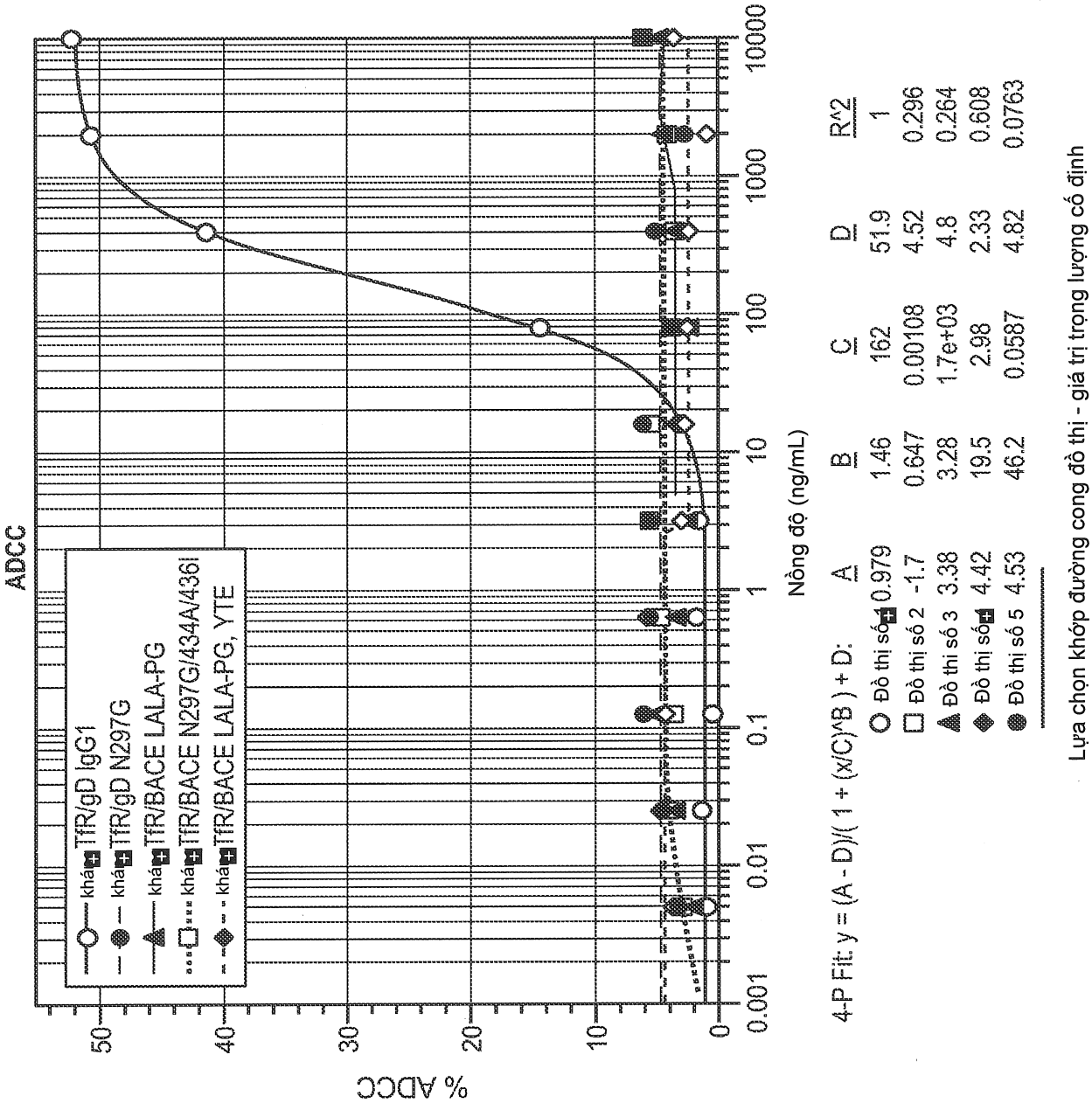

ADCC
khá TfR/gD IgG1
khá TfR/gD N297G
khá TfR/BACE LALA-PG
khá TfR/BACE N297G/434A/436I
khá TfR/BACE LALA-PG, YTE
% ADCC
Nồng độ (ng/mL)
4-P Fit: y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D:
A B C D R^2
Đồ thị số 1 0.979 1.46 162 51.9 1
Đồ thị số 2 -1.7 0.647 0.00108 4.52 0.296
Đồ thị số 3 3.38 3.28 1.7e+03 4.8 0.264
Đồ thị số 4 4.42 19.5 2.98 2.33 0.608
Đồ thị số 5 4.53 46.2 0.0587 4.82 0.0763
Lựa chọn khớp đường cong đồ thị - giá trị trọng lượng cố định

FIG. 23

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

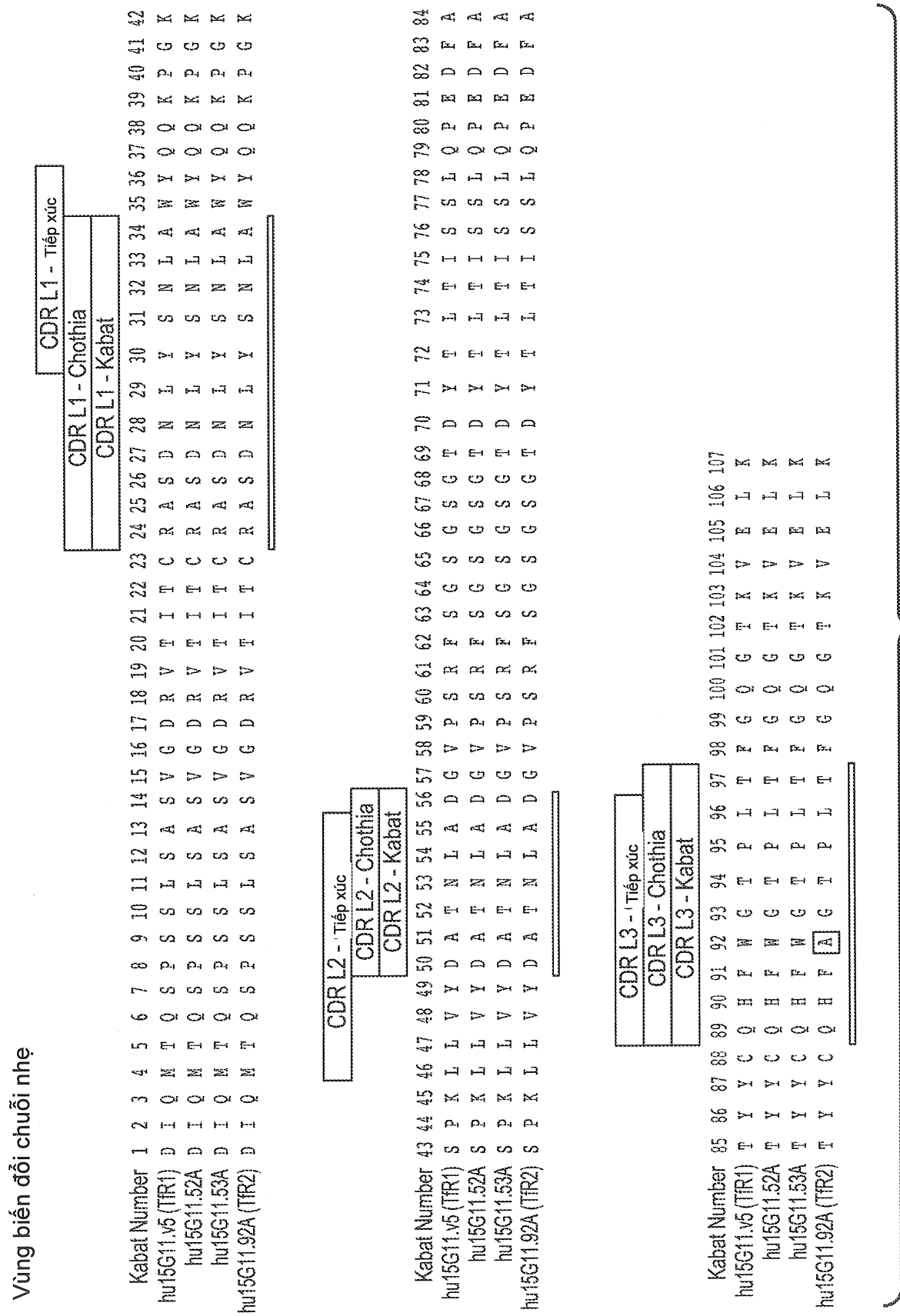


FIG. 24A

Vùng biến đổi chuỗi nặng

CDR H1 - Tiếp xúc
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat

Kabat Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
hu15G11.v5 (TfR1)	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.52A	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.53A	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
hu15G11.92A (TfR2)	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	R	Q	A	P	G

CDR H2 - Tiếp xúc
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat

Kabat Number	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
hu15G11.v5 (TfR1)	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.52A	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	A	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.53A	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	A	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S
hu15G11.92A (TfR2)	Q	R	L	E	W	I	G	E	I	N	P	T	N	G	R	T	N	Y	I	E	K	F	K	S	R	A	T	L	T	V	D	K	S	A	S	T	A	Y	M	E	L	S

CDR H3 - Tiếp xúc
CDRH3 - Chothia
CDR H3 - Kabat

Kabat Number	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
hu15G11.v5 (TfR1)	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
hu15G11.52A	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
hu15G11.53A	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S
hu15G11.92A (TfR2)	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	R	A	Y	H	Y	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S

FIG. 24B

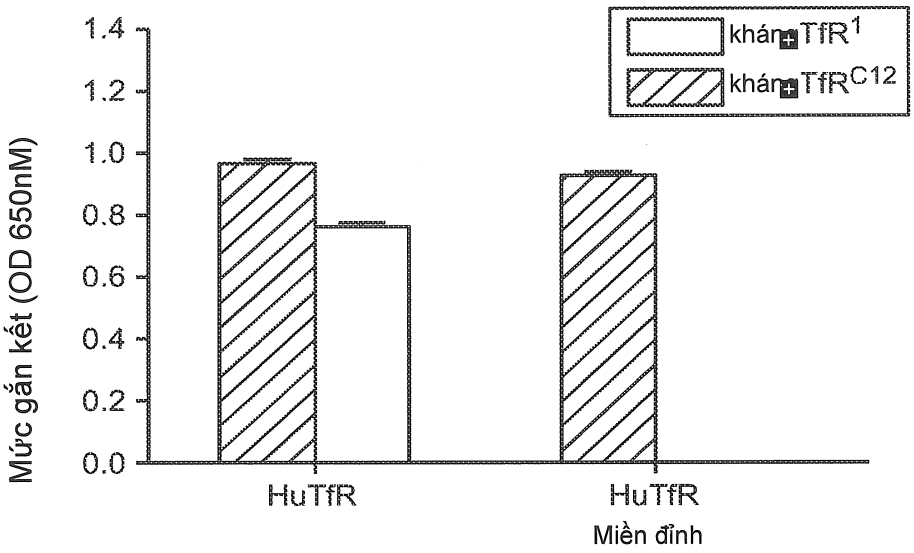

1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Mức gắn kết (OD 650nM)
kháng TfR1
kháng TfRC12
HuTfR
HuTfR
Miền đỉnh

FIG. 25

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG THỤ THỂ TRANSFERRIN, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY, TẾ BÀO CHỦ CHỨA AXIT NUCLEIC NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ, CHẾ PHẨM, DƯỢC PHẨM VÀ THUỐC CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P5641R1-WO

<140>
<141>

<150> 61/825,477
<151> 2013-05-20

<160> 175

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 760
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1               5                  10                  15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
            20                  25                  30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala
        35                  40                  45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly
65                  70                  75                  80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
                85                  90                  95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro
            100                 105                 110

Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
        115                 120                 125
```

```
Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile
    130                 135                 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
145                 150                 155                 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
                165                 170                 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg
        195                 200                 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
    210                 215                 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240

Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
                245                 250                 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
            260                 265                 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
        275                 280                 285

Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
    290                 295                 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
305                 310                 315                 320

Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp
            340                 345                 350
```

```
Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser
        355                 360                 365

Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile
    370                 375                 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
385                 390                 395                 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala
                405                 410                 415

Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
            420                 425                 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
        435                 440                 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
    450                 455                 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
465                 470                 475                 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val
                485                 490                 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn
            500                 505                 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
        515                 520                 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
    530                 535                 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
                565                 570                 575
```

```
Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu
            580                 585                 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn
        595                 600                 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp
    610                 615                 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625                 630                 635                 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
                645                 650                 655

Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys
            660                 665                 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro
        675                 680                 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
    690                 695                 700

Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys
705                 710                 715                 720

Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
                725                 730                 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
            740                 745                 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
        755                 760
```

<210> 2
<211> 760
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 2

```
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1               5                   10                  15
```

```
Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
            20                  25                  30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Gly Val Asp Glu Glu Glu Asn Thr
        35                  40                  45

Asp Asn Asn Thr Lys Pro Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly
    50                  55                  60

Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly
65                  70                  75                  80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
                85                  90                  95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro
            100                 105                 110

Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
        115                 120                 125

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Thr Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile
    130                 135                 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
145                 150                 155                 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
                165                 170                 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
            180                 185                 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly
        195                 200                 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
    210                 215                 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
225                 230                 235                 240
```

```
Lys Asp Phe Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
                245                 250                 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
            260                 265                 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
        275                 280                 285

Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
    290                 295                 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
305                 310                 315                 320

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

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp
            340                 345                 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser
        355                 360                 365

Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr
    370                 375                 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
385                 390                 395                 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala
                405                 410                 415

Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
            420                 425                 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
        435                 440                 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
    450                 455                 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
```

```
465                 470                 475                 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val
                485                 490                 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp
            500                 505                 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
        515                 520                 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
    530                 535                 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
                565                 570                 575

Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu
            580                 585                 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn
        595                 600                 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp
    610                 615                 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625                 630                 635                 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
                645                 650                 655

Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys
            660                 665                 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro
        675                 680                 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
    690                 695                 700
```

```
Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg
705                 710                 715                 720

Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
                725                 730                 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
            740                 745                 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
        755                 760
```

<210> 3
<211> 763
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

```
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1               5                   10                  15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
            20                  25                  30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Ala Asp Glu Glu Glu Asn Ala
        35                  40                  45

Asp Asn Asn Met Lys Ala Ser Val Arg Lys Pro Lys Arg Phe Asn Gly
    50                  55                  60

Arg Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ala Leu Val Ile Phe Phe Leu Ile Gly
65                  70                  75                  80

Phe Met Ser Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Arg Val Glu Gln Lys Glu
                85                  90                  95

Glu Cys Val Lys Leu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Asp Lys Ser Glu Thr
            100                 105                 110

Met Glu Thr Glu Asp Val Pro Thr Ser Ser Arg Leu Tyr Trp Ala Asp
        115                 120                 125

Leu Lys Thr Leu Leu Ser Glu Lys Leu Asn Ser Ile Glu Phe Ala Asp
```

```
    130                 135                 140

Thr Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn Thr Tyr Thr Pro Arg Glu Ala Gly
145                 150                 155                 160

Ser Gln Lys Asp Glu Ser Leu Ala Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Phe His
                165                 170                 175

Glu Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp Arg Asp Glu His Tyr Val Lys Ile
            180                 185                 190

Gln Val Lys Ser Ser Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser
        195                 200                 205

Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr Val Ala Phe
    210                 215                 220

Ser Lys Pro Thr Glu Val Ser Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly
225                 230                 235                 240

Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Ser Tyr Ser Val Asn Gly Ser Leu
                245                 250                 255

Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn
            260                 265                 270

Ala Gln Ser Phe Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Lys Asn
        275                 280                 285

Lys Phe Pro Val Val Glu Ala Asp Leu Ala Leu Phe Gly His Ala His
    290                 295                 300

Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His
305                 310                 315                 320

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

Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Lys Met Glu
            340                 345                 350

Gly Ser Cys Pro Ala Arg Trp Asn Ile Asp Ser Ser Cys Lys Leu Glu
        355                 360                 365
```

```
Leu Ser Gln Asn Gln Asn Val Lys Leu Ile Val Lys Asn Val Leu Lys
    370                 375                 380

Glu Arg Arg Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Tyr Glu Glu
385                 390                 395                 400

Pro Asp Arg Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Leu Gly Ala
                405                 410                 415

Gly Val Ala Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Leu Lys Leu
            420                 425                 430

Ala Gln Val Phe Ser Asp Met Ile Ser Lys Asp Gly Phe Arg Pro Ser
        435                 440                 445

Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Thr Ala Gly Asp Phe Gly Ala Val
    450                 455                 460

Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys
465                 470                 475                 480

Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Val Val Leu Gly Thr Ser Asn
                485                 490                 495

Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Met Gly Lys Ile
            500                 505                 510

Met Gln Asp Val Lys His Pro Val Asp Gly Lys Ser Leu Tyr Arg Asp
        515                 520                 525

Ser Asn Trp Ile Ser Lys Val Glu Lys Leu Ser Phe Asp Asn Ala Ala
    530                 535                 540

Tyr Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe
545                 550                 555                 560

Cys Glu Asp Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Arg Leu Asp Thr Tyr
                565                 570                 575

Glu Ala Leu Thr Gln Lys Val Pro Gln Leu Asn Gln Met Val Arg Thr
            580                 585                 590
```

```
Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile Ile Lys Leu Thr His Asp Val
        595                 600                 605

Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Met Tyr Asn Ser Lys Leu Leu Ser Phe
    610                 615                 620

Met Lys Asp Leu Asn Gln Phe Lys Thr Asp Ile Arg Asp Met Gly Leu
625                 630                 635                 640

Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Tyr Phe Arg Ala Thr
                645                 650                 655

Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe His Asn Ala Glu Lys Thr Asn Arg Phe
            660                 665                 670

Val Met Arg Glu Ile Asn Asp Arg Ile Met Lys Val Glu Tyr His Phe
        675                 680                 685

Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Arg Glu Ser Pro Phe Arg His Ile Phe
    690                 695                 700

Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Val Glu Asn Leu Lys
705                 710                 715                 720

Leu Arg Gln Lys Asn Ile Thr Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn
                725                 730                 735

Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Val Ala Asn Ala Leu
            740                 745                 750

Ser Gly Asp Ile Trp Asn Ile Asp Asn Glu Phe
        755                 760


<210> 4
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 4
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15
```

```
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Ala Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
            100                 105                 110
```

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 5

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
```

85 90 95

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

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 6
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Pro Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp”

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 8
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

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

Leu Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 9
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Val Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Ser Phe Tyr Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 10
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ala Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Lys Phe Ile Asp Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Lys Gln Ser His Thr Lys Ser Leu Gln Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Ser Gly Asn Phe Val Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 12
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Thr Asp Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

```
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Ile
            100                 105


<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1               5                   10                  15


Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30


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


Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80


Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
                85                  90                  95


Met Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105


<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1               5                   10                  15
```

```
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

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

Tyr Ala Val Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105
```

<210> 15
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 15

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

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

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

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

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 16
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 17
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Lys Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 18
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

```
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Thr Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 19
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 19

```
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Ala Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 20
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 20
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 21
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

```
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser
            20                  25                  30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Arg Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser Gly Val Pro Ala
    50                  55                  60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Trp
                85                  90                  95

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


<210> 22
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 22
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser
            20                  25                  30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser Gly Val Pro Ala
    50                  55                  60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Trp
                85                  90                  95
```

Glu Ile Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 23
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Thr Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser
20 25 30

Tyr Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

```
Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Gly Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Asn Thr Leu Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105


<210> 25
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 26
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 26
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Arg Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Ala His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 27
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 27
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Asn Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Gly Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 28
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 29
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 30
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 31
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 32
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 33
Gly Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 34
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 35
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 36
Gln Gln Ser Asn Glu Gly Pro Pro Thr
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 37
Asp Tyr Gly Met His
1 5

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 38
Val Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 39
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 40
Val Ile Ser Phe Tyr Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Met
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 41
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 42
Gln His Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 43
Val Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Ser Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 44
Gly Leu Ser Gly Asn Phe Val Met Asp Phe
1 5 10

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)

<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 45
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Asp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 46
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Gly"

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(5)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 47
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Phe" hoặc "Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (16)..(16)
<223> /thay thế="Met"

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 48
Gly Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 49
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 50
Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn Leu Ala
1   5   10

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 51
Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1   5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 52
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Thr
1   5

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 53
Ser Tyr Trp Met His
1   5

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 54
Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 55
Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr
1 5

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 56
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 57
Ala Ala Thr Asp Leu Ala Asp
1 5

<210> 58
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 58
Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 59
Gly Thr Arg Ala Tyr His Phe
1 5

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 60
Arg Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 61
Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 62
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Met
1 5

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 63
Glu Ile Asn Pro Ile Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ser Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 64
Ala Val Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 65
Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Thr Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ile"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 66
Arg Ala Ser Glu Asn Leu Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)

<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không
ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải
đối với các vị trí biến đổi"

<400> 67
Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Met"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không
ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải
đối với các vị trí biến đổi"

<400> 68
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Ile" hoặc "Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (17)..(17)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 69
Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 70
Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr
1 5

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 71
Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 72
Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 73
Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 74
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 74

Ser Glu Tyr Ala Trp Asn
1 5

<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 75
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 76
Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 77
Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 78
Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser

1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 79
Gln His Thr Trp Glu Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 80
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 81
Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asp Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 82
Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 83
Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asp Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 84
Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Ala His
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 85
Thr Thr Ser Ser Ser Val Pro Ser Ser Tyr Phe His
1 5 10

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 86
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 87
His Gln Tyr His Arg Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 88
Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 89
Ser Ile Ser Asn Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 90
<211> 15

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 90
Gln Gly Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 91
Arg Ala Gly Gln Asp Ile Thr Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 92
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 93
Gln Gln Ala Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 94
<211> 5
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 94
Asn Tyr Trp Ile Glu
1 5

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 95
Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 96
Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(8)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Val" hoặc "Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Pro" hoặc "Ile"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Phe" hoặc "Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Asn"

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 97
Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ala" hoặc "His"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 98
Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="His" hoặc "Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Arg" hoặc "Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không
ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải
đối với các vị trí biến đổi"

<400> 99
Gln His Thr Trp Glu Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Asp" hoặc "Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Ile"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Glu"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 100
Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Glu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Pro" hoặc "Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Lys" hoặc "Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (17)..(17)
<223> /thay thế="Gly"

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 101
Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asp Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 102
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Gln" hoặc "Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ala" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Leu" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Asp" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ

<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Glu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Phe" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(13)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(15)
<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc biến thể trong các chú giải đối với các vị trí biến đổi"

<400> 102
Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Arg Gly Ala Met Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 103
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Ser
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 104
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 104
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 105
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 105
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 106
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 107
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 107
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 108

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 109
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 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 Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 110
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 110

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

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

<210> 111
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 111

```
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 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
                85                  90                  95

Glu Ala Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 112
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 113
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 113
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 114
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 114
Glu 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 Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 115
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115
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 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 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 116
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 116
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Arg Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Trp
85 90 95

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

<210> 117
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 117
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 Arg Ala Arg Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Pro Ala Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Ile Gln Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Thr Trp
85 90 95

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

<210> 118
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 119
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 119
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 120
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 120
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 121
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

```
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 122
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 123
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 123
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 Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

```
Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 124
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

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

<210> 125
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 125

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 126
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 127
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 128
Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 129
Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 130
Gln Gln Ser Asn Glu Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 131
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 131
Gly Leu Ser Gly Asn Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 132
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 132
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 133
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 133
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Pro Thr Tyr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 134
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 134
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Asn Asp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 135
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 135
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Thr Asp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 136
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 136
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 Val Val Ala Asn Ser
20 25 30

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

Tyr Leu Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ala Thr Ser Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 137
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 137
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 Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Thr Asp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 138
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 138
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 Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 139
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 139
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 Leu Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Ser Pro Ala Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Pro Phe Ser Pro Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 140

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 140
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 141
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 141
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Ser Trp Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 142
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 142
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Trp Tyr Ala Ser Trp Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 143

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

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 143
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Trp Trp Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 144
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 144
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 Asn Phe Tyr Tyr Ser
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Pro Thr His Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Lys Gly Tyr Lys Ala
100 105 110

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 145
<211> 438
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 145
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
115 120 125

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
180 185 190

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235 240

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

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

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

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435

<210> 146
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 146
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 147
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 147
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 148
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 149
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 149
Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 150
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

```
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105


<210> 151
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 151
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
            20                  25                  30


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


Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80


Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu
                85                  90                  95


Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105


<210> 152
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 152
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15
```

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 153
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 153
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 154
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 154
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 155
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 155
Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 156
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 156
Glu Ile Ala Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 157
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 157
Glu Ile Asn Pro Ala Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 158
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 158

```
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 159
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 159
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

```
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

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

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

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

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

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

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

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

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
        355                 360                 365

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415
```

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

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 160
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 160
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 Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 161
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 161
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 162
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 162
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Pro Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 163
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 163
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

<210> 164
<211> 125

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp”

<400> 164
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

<210> 165
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 165
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Thr Asp Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Ile Arg Ala Asp Ala Ala
            100                 105                 110

Pro
```

<210> 166
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 166

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

<210> 167
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 167
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Met Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro

<210> 168
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 168
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Lys Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

<210> 169
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 169
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

```
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Thr Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
        115
```

<210> 170
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 170

```
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Thr Ala Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
            20                  25                  30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
```

100 105 110

Pro

<210> 171
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 171
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Asn Ser Ile Thr Ser Glu
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Tyr Gly Asn Pro Ala Thr Arg Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

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

Ser Val Tyr
130

<210> 172
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 172
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
115 120

<210> 173
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 173
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

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

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

Thr Arg Gly Gly Tyr Asp Ser Arg Ala Trp Phe Ala His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
115 120

<210> 174
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 174
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Phe Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Asn Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Gly Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Arg Gly Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
115 120 125

<210> 175
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 175
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Asp Gly Glu Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
115 120