



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0030246

(51)⁷ C07K 16/18; G01N 33/68; C07K 16/46 (13) B

(21) 1-2016-05137

(22) 08/07/2015

(86) PCT/EP2015/065633 08/07/2015

(87) WO2016/005466 14/01/2016

(30) 62/022,952 10/07/2014 US

(45) 25/12/2021 405

(43) 25/05/2017 350A

(73) 1. BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB (SE)

Warfvinges vag 35, 112 51 Stockholm, Sweden

2. EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)

4-6-10 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, Japan

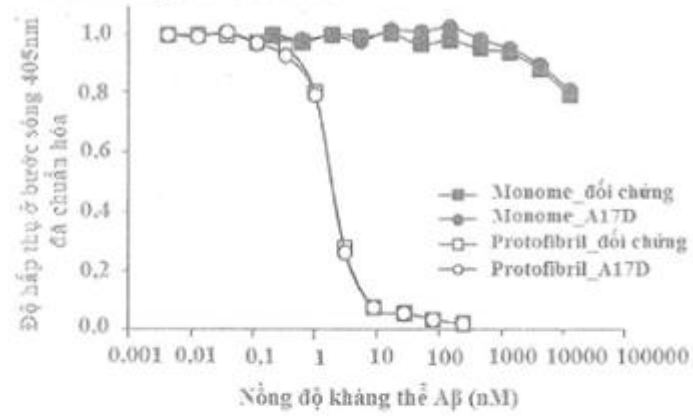
(72) NERELIUS, Charlotte (SE); LAUDON, Hanna (SE); SIGVARDSON, Jessica (SE).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

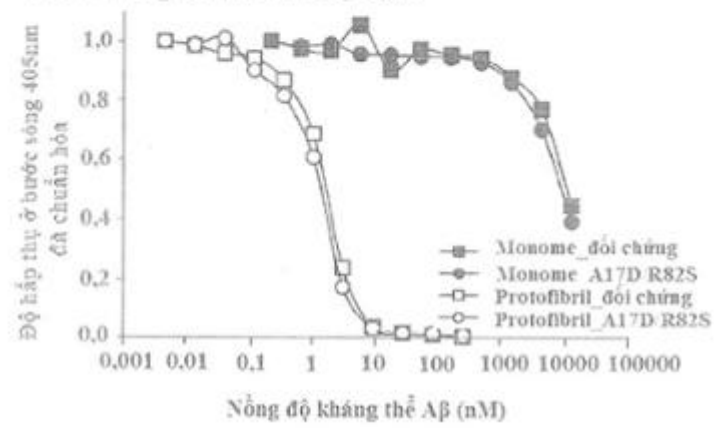
(54) KHÁNG THỂ HOẶC MẢNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ CÓ ÁI LỰC
GẮN KẾT VỚI PROTOFIBRIL A β , VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực gắn kết với protofibril A β , và dược phẩm chứa kháng thể này.

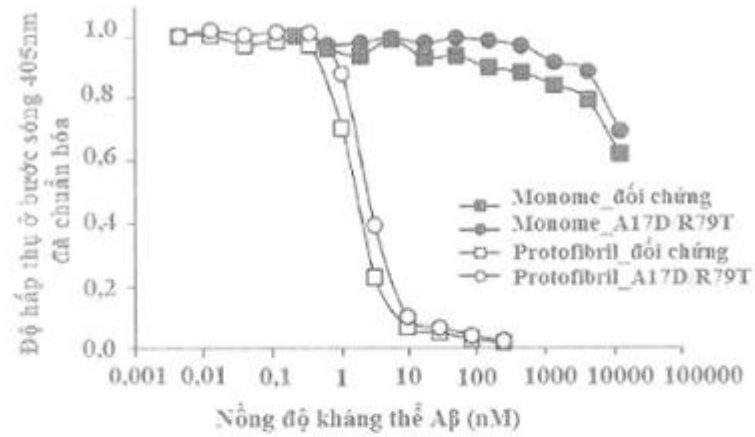
Đối chứng so với A17D



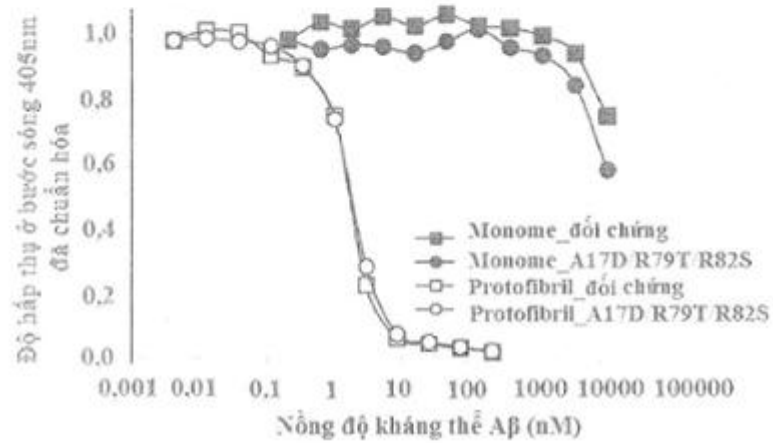
Đối chứng so với A17D/R82S



Đối chứng so với A17D/R79T



Đối chứng so với A17D/R79T/R82S



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit β amyloid (amyloid beta- $A\beta$), cụ thể hơn sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với protofibril $A\beta$ và mô tả việc sử dụng kháng thể này trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein $A\beta$.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer là rối loạn thoái hóa thần kinh và gây giảm nhận thức, trí nhớ và hành vi. Đặc điểm riêng biệt của bệnh Alzheimer bao gồm mảng dạng tinh bột ngoại bào, đám rối sợi thần kinh trong não, rối loạn chức năng neuron thần kinh và cuối cùng là teo não. Nguy cơ phát triển bệnh Alzheimer tăng theo tuổi tác, và với sự gia tăng số lượng người cao tuổi thì tình trạng bệnh lý này cũng gia tăng ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống của người cao tuổi. Ngoài ra, bệnh cũng gây nhiều tổn kém cho xã hội.

Mặc dù thực tế rằng bệnh Alzheimer đã được biết đến trong nhiều năm và một số phương pháp gợi ý điều trị đã được thực hiện, nhưng cho đến nay vẫn chưa có phương pháp nào thực sự hiệu quả mà mới chỉ có các dược chất có tác dụng điều trị triệu chứng. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để xác định cơ chế gây bệnh Alzheimer. Cụ thể, vì một số nguyên nhân protein $A\beta$ bắt đầu tích tụ và thông qua một số dạng trung gian, cuối cùng tạo ra mảng/fibril không hòa tan lắng đọng trong não. Ban đầu người ta cho rằng các mảng dạng tinh bột như vậy ảnh hưởng đến các neuron thần kinh và tín hiệu được dẫn truyền bởi chúng, nhưng cho đến nay các kết quả của các nghiên cứu chuyên sâu cho thấy rằng dạng trung gian tích tụ hòa tan của protein $A\beta$ rất có thể là nguyên nhân chính gây bệnh Alzheimer và các triệu chứng quan sát được ở người bệnh.

Một dạng trung gian trong hàng loạt các dạng tích tụ từ monome $A\beta$ tới fibril $A\beta$ không hòa tan là protofibril $A\beta$ hòa tan khối lượng phân tử cao, được mô tả lần đầu bởi Walsh trong tài liệu 1997 trong tài liệu *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 272(35) p. 22364-72). Vai trò quan trọng của protofibril $A\beta$ trong phát triển bệnh Alzheimer được xác định bởi nhóm các nhà khoa học đứng đầu là Lars Lannfelt, Uppsala University, nghiên cứu về đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer, đột biến E693G trong

protein tiền chất dạng tinh bột (APP) là nguyên nhân làm tăng hình thành protofibril A β . Một nhóm người ở miền Bắc Thụy Điển mang đột biến này được phát hiện là sớm phát triển bệnh Alzheimer nặng trong cuộc đời và phát hiện về tổ hợp này tạo ra ý tưởng cơ bản về liệu pháp điều trị mới. Do đó, protofibril A β được xác định là liên quan chặt chẽ với bệnh Alzheimer và là đích quan trọng trong điều trị. Dựa trên nghiên cứu về peptit A β chứa đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer, Lannfelt và cộng sự có thể tạo ra protofibril A β *in vitro*, đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer cũng như thể đại, ở lượng đủ để gây miễn dịch, sau đó chọn lọc các kháng thể có ái lực gắn kết cao với protofibril A β so với các loài khác trong hệ protein A β . Ví dụ về phương pháp sản xuất protofibril A β và kháng thể gắn kết với protofibril β này được mô tả trong WO02/03911 và WO2005/123775.

Đặc biệt quan trọng là phát triển kháng thể đơn dòng mAb 158 của chuột nhắt, là kháng thể gắn kết với protofibril A β , được mô tả trong EP2004688, chứa các trình tự CDR sau:

VH-CDR1: SFGMH	SEQ ID NO.1
VH-CDR2: YISSGSSTIYYGDTVKG	SEQ ID NO.2
VH-CDR3: EGGYYYGRSYTMDY	SEQ ID NO.3
VL-CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE	SEQ ID NO.4
VL-CDR2: KVSNRFS	SEQ ID NO.5
VL-CDR3: FQGSHVPPT	SEQ ID NO.6

Ái lực gắn kết và độ chọn lọc cao của phiên bản nhân tạo của mAb158, kháng thể BAN2401, khiến cho kháng thể này rất quan trọng để sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer, đặc biệt trong các thử nghiệm lâm sàng để bào chế được phẩm. Đặc tính của kháng thể BAN2401 được mô tả trong EP2004688.

Hiệu lực của kháng thể phụ thuộc vào một số yếu tố dược lực học và dược động học, ví dụ xem Deng et al, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol* 8(2) (2012): p. 141-160; Boswell et al, *Bioconjugate Chem.* 21(2010): p. 2153-2163; Kontermann, *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2011): p. 1-9 và Igawa et al, *mAbs* 3:3 (2011): p. 243-252. Trong số các yếu tố này, thời gian bán thải trong huyết tương kéo dài với mức độ hấp thu toàn thân tăng được xem là yếu tố quan trọng để cải thiện đáng kể hiệu quả điều trị. Thời gian bán

thải trong huyết tương kéo dài cũng được xem là yếu tố quan trọng để giảm liều do có mối tương quan hệ thống quan trọng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến kháng thể gắn kết với protofibril A β và mô tả việc sử dụng kháng thể này trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β . Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể hữu ích trong chẩn đoán các bệnh này cũng như mô tả việc sử dụng kháng thể này trong kiểm soát sự tiến triển của các bệnh này, và việc sử dụng kháng thể này trong lĩnh vực thú y. Các tác giả sáng chế đã ngạc nhiên phát hiện thấy rằng thời gian bán thải cũng như mức độ hấp thu của kháng thể nhân tạo có cấu trúc tương tự mAb158, tức là kháng thể BAN2401, được gia tăng đáng kể, ví dụ khoảng hai lần hoặc cao hơn, bằng cách chèn một hoặc nhiều đột biến ở một số vị trí đặc hiệu, tức là vị trí số 17, 79 và/hoặc 82 trên chuỗi nhẹ thay đổi của kháng thể BAN2401 (vị trí kabat số tương ứng là 17, 74 và 77), xem thêm Fig.9 ở đó các vị trí này được ký hiệu là x_1 , x_2 và x_3 . Trong kháng thể BAN2401, axit amin ở vị trí số 17 (vị trí kabat số 17) là A, axit amin ở vị trí số 79 (vị trí kabat số 74) là R và axit amin ở vị trí số 82 (vị trí kabat số 77) là R. Phương pháp đánh số vị trí Kabat được mô tả trong tài liệu Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991 (tài liệu Công bố NIH số 91-3242).

Tùy ý, đặc tính của kháng thể theo sáng chế có thể tiếp tục được cải thiện bằng cách kết hợp mỗi đột biến tạo ra thời gian bán thải tăng với một hoặc nhiều đột biến lân cận, tức là ở vị trí số 13, 21, 81 và/hoặc 84 trên chuỗi nhẹ thay đổi của kháng thể này (vị trí kabat số 13, 21, 76 và 79 tương ứng), xem thêm Fig.9 ở đó các vị trí này được ký hiệu là y_{1-4} , ở vị trí số 37, 38 và/hoặc 40 trên chuỗi nặng thay đổi của kháng thể này (vị trí kabat số 37, 38 và 40 tương ứng), xem thêm Fig.10 ở đó các vị trí này được ký hiệu là z_{1-3} , để tiếp tục cải thiện đặc tính miễn dịch, tức là khả năng sinh miễn dịch thấp. So với trình tự BAN2401, khi x_1 được đột biến, thì các đột biến y_1 và/hoặc y_2 có thể được chèn vào và khi x_2 và/hoặc x_3 được đột biến, thì các đột biến y_3 và/hoặc y_4 có thể được chèn vào. Ngoài ra, các đột biến z_{1-3} có thể được chèn vào.

Các phương án cụ thể của sáng chế được thể hiện dưới đây.

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực gắn kết với protofibril A β , trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, trong đó

x1 được chọn từ A, D, E và Q, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

x2 được chọn từ R, T, K, A và G, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

x3 được chọn từ R, S, C, G và N, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

y1 được chọn từ V và A;

y2 được chọn từ I và V;

y3 được chọn từ S và Q;

y4 được chọn từ E và D; và tùy ý

chuỗi nặng thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14, trong đó

z1 được chọn từ V và I;

z2 được chọn từ R và Q; và

z3 được chọn từ A, N và T;

không bao gồm tổ hợp x1=A, x2=R và x3=R.

2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó

x1 được chọn từ A, D, E và Q;

x2 được chọn từ R, T, K, A và G;

x3 được chọn từ R, S, C, G và N;

y1 được chọn từ V và A;

y2 được chọn từ I và V;

y3 được chọn từ S và Q;

y4 được chọn từ E và D; và

chuỗi nặng thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14, trong đó

z1 được chọn từ V và I;

z2 được chọn từ R và Q; và

$z3$ được chọn từ A, N và T;

không bao gồm tổ hợp $x1=A$, $x2=R$ và $x3=R$.

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1 hoặc 2, trong đó chuỗi nhẹ của kháng thể này chứa tổ hợp đột biến được chọn từ:

$x1$ và ($y1$ và/hoặc $y2$);

$x1$ và ($y1$ và/hoặc $y2$) và $x2$ và ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x1$ và ($y1$ và/hoặc $y2$) và $x2$ và $x3$ và ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x1$ và ($y1$ và/hoặc $y2$) và $x3$ và ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x2$ ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x2$ và $x3$ và ($y3$ và/hoặc $y4$); và

$x3$ và ($y3$ và/hoặc $y4$);

không bao gồm tổ hợp $x1=A$, $x2=R$ và $x3=R$.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó chuỗi nhẹ thay đổi của kháng thể này chứa một hoặc nhiều đột biến được chọn từ:

$x1$ là D và ($y1$ và/hoặc $y2$);

$x1$ là D và ($y1$ và/hoặc $y2$), $x2$ là T và ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x1$ là D và ($y1$ và/hoặc $y2$), $x2$ là T, $x3$ là S và ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x1$ là D và ($y1$ và/hoặc $y2$) và $x3$ là S và ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x2$ là T ($y3$ và/hoặc $y4$);

$x2$ là T và $x3$ là S và ($y3$ và/hoặc $y4$); và

$x3$ là S và ($y3$ và/hoặc $y4$);

trong đó $y1$ là V hoặc A và $y2$ là V hoặc I, không bao gồm tổ hợp $y1=V$ và $y2=I$; $y3$ là S hoặc Q và $y4$ là E hoặc D không bao gồm tổ hợp $y3=S$ và $y4=E$.

5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó

$x1$ là D;

x2 là T;

x3 là R;

y1 được chọn từ V và A;

y2 được chọn từ V và I;

y3 được chọn từ Q và S;

y4 được chọn từ D và E;

z1 là V;

z2 là R; và

z3 được chọn từ N, T và A;

không bao gồm tổ hợp trong đó y1 là V, y2 là I, y3 là S, y4 là E, z1 là V, z2 là R và z3 là A.

6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

7. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

8. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

9. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

10. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có

trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

11. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

12. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

13. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

14. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 13, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch G (IgG).

15. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, để sử dụng trong điều trị bệnh.

16. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, để sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β .

17. Kháng thể theo phương án 16, trong đó bệnh liên quan đến tích tụ protein A β được chọn từ chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson.

18. Sử dụng kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, trong sản xuất thuốc dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β .

19. Sử dụng theo phương án 18, trong đó bệnh liên quan đến tích tụ protein A β được chọn từ chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson.

20. Phương pháp làm giảm nồng độ protofibril A β ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14.

21. Phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer ở đối tượng có nguy cơ cao phát triển hoặc bị bệnh này, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14.

22. Phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson ở đối tượng có nguy cơ cao phát triển hoặc bị các bệnh này, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14.

23. Phương pháp đo nồng độ protofibril A β và/hoặc protein A β tích tụ ở đối tượng, bao gồm bước cho mô hoặc dịch cơ thể của đối tượng này tiếp xúc *in vivo* hoặc *in vitro* với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14 và đo nồng độ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protofibril A β và/hoặc protein A β tích tụ này.

24. Phương pháp chẩn đoán bệnh Alzheimer ở đối tượng có nguy cơ cao phát triển hoặc bị bệnh này, bao gồm bước cho mô hoặc dịch cơ thể của đối tượng này tiếp xúc *in vivo* hoặc *in vitro* với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14 và đo nồng độ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protein A β tích tụ.

25. Phương pháp chẩn đoán chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền

đỉnh thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson ở đối tượng có nguy cơ cao phát triển hoặc bị các bệnh này, bao gồm bước cho mô hoặc dịch cơ thể của đối tượng này tiếp xúc *in vivo* hoặc *in vitro* với kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14 và đo nồng độ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protein A β tích tụ.

26. Dược phẩm, chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, cùng với tá dược và/hoặc chất pha loãng được dụng.

27. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 14, để sử dụng trong lĩnh vực thú y.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện dữ liệu phân tích hoạt tính gắn kết chọn lọc với protofibril A β so với monome A β của kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S so với kháng thể BAN2401 (đối chứng). Hoạt tính ức chế gắn kết bởi các protofibril A β 1-42 trong dung dịch được thể hiện bằng các hình tròn và hình vuông màu trắng và hoạt tính ức chế gắn kết bởi các monome A β 1-40 trong dung dịch được thể hiện bằng các hình tròn và hình vuông màu đen.

Fig.2 là đồ thị thể hiện mức độ hấp thu dược chất vào huyết tương của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế ở chuột nhắt được biểu diễn dưới dạng các đồ thị nồng độ theo thời gian. Nồng độ trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch liều đơn của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S được đo ở các thời điểm 0,5 giờ, 2 ngày, 7 ngày, 15 ngày và 29 ngày sau sử dụng, và nồng độ trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch liều đơn của kháng thể A17D/R82S được đo ở các thời điểm 0,5 giờ, 2 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 28 ngày sau sử dụng được thể hiện trên đồ thị. Kháng thể A17D/R82S không được sử dụng trong nghiên cứu dược lực học tương tự như các kháng thể còn lại theo sáng chế, nhưng thay vào đó được sử dụng trong thử nghiệm riêng. Tuy nhiên, ngoại trừ hai thời điểm lấy mẫu huyết tương, thiết kế nghiên cứu tương tự được sử dụng trong hai nghiên cứu riêng biệt. Toàn bộ các mẫu huyết tương được phân tích bằng phương pháp ELISA trong cùng thử nghiệm để tránh sai số giữa các thử nghiệm. Nồng độ dược chất trong huyết tương

($\mu\text{g/mL}$) được thể hiện trên trục y (thang logarit) và thời điểm sau sử dụng (giờ) được thể hiện trên trục x. Các trị số trung bình nhóm được thể hiện bằng các thanh sai số biểu thị độ lệch chuẩn. Các trị số $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ và thời gian bán thải giai đoạn cuối được tính toán bằng mô hình không ngăn sử dụng phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và thể hiện trên Bảng 1.

Fig.3 là đồ thị thể hiện mức độ hấp thu được chất vào huyết tương của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế ở chuột cống được biểu diễn dưới dạng các đồ thị nồng độ theo thời gian. Nồng độ trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch liều đơn của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S được đo ở các thời điểm 0,5 giờ, 2 giờ, 7 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 29 ngày sau sử dụng được thể hiện trên đồ thị. Nồng độ được chất trong huyết tương ($\mu\text{g/mL}$) được thể hiện trên trục y (thang logarit) và thời điểm sau sử dụng (giờ) được thể hiện trên trục x. Các trị số trung bình nhóm được thể hiện bằng các thanh sai số biểu thị độ lệch chuẩn. Các trị số $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình được tính toán bằng mô hình không ngăn sử dụng phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và thể hiện trên Bảng 2.

Fig.4 là đồ thị thể hiện dữ liệu phân tích hoạt tính gắn kết chọn lọc với protofibril $\text{A}\beta$ so với monome $\text{A}\beta$ của các biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) so với kháng thể BAN2401. Hoạt tính ức chế gắn kết bởi các protofibril $\text{A}\beta$ 1-42 trong dung dịch được thể hiện bằng các hình tròn và hình vuông màu trắng, và hoạt tính ức chế gắn kết bởi các monome $\text{A}\beta$ 1-40 trong dung dịch được thể hiện bằng các hình tròn và hình vuông màu đen. A) A17D/R79T_DI 1, B) A17D/R79T_DI 2, C) A17D/R79T_DI 3, D) A17D/R79T_DI 4, E) A17D/R79T_DI 5, F) A17D/R79T_DI 6, G) A17D/R79T_DI 7, H) A17D/R79T_DI 8.

Fig.5 là đồ thị thể hiện mức độ hấp thu được chất vào huyết tương của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế ở chuột nhắt được biểu diễn dưới dạng các đồ thị nồng độ theo thời gian. Nồng độ trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch liều đơn của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T và 8 biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) được đo ở các thời điểm 0,5 giờ, 2 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 28 ngày sau sử dụng. Nồng độ được chất trong huyết tương ($\mu\text{g/mL}$) được thể hiện trên trục y (thang logarit) và thời điểm sau sử dụng (giờ) được thể hiện trên trục x. Các trị số trung bình nhóm được thể hiện bằng các thanh sai số biểu thị

độ lệch chuẩn. Các trị số AUC_{0-inf} và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình được tính toán bằng mô hình không ngăn sử dụng phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và thể hiện trên Bảng 6.

Fig.6 là đồ thị thể hiện mức độ hấp thu được chất vào huyết tương của kháng thể BAN2401 và các thể đột biến ở chuột cống được biểu diễn dưới dạng các đồ thị nồng độ theo thời gian. Nồng độ trong huyết tương sau khi tiêm tĩnh mạch liều đơn của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T và 8 biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) được đo ở các thời điểm 0,5 giờ, 2 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 28 ngày sau sử dụng. Nồng độ được chất trong huyết tương ($\mu\text{g/mL}$) được thể hiện trên trục y (thang logarit) và thời điểm sau sử dụng (giờ) được thể hiện trên trục x. Các trị số trung bình nhóm được thể hiện bằng các thanh sai số biểu thị độ lệch chuẩn. Các trị số AUC_{0-inf} và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình được tính toán bằng mô hình không ngăn sử dụng phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và thể hiện trên Bảng 7.

Fig.7 là đồ thị thể hiện mức độ hấp thu được chất vào huyết tương đã hiệu chỉnh liều của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8 ở khi đuôi dài được biểu diễn dưới dạng các đồ thị nồng độ theo thời gian. Nồng độ trong huyết tương sau khi truyền tĩnh mạch liều đơn của kháng thể BAN2401 được đo ở các thời điểm 5 phút, 1 giờ, 2 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau sử dụng, và nồng độ trong huyết tương sau khi truyền tĩnh mạch liều đơn của kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8 được đo ở các thời điểm 5 phút, 2 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 3 ngày, 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau sử dụng. Các kháng thể theo sáng chế được sử dụng cho khi đuôi dài trong nghiên cứu khác và ở liều khác (10mg/kg) so với kháng thể BAN2401 (5mg/kg). Do đó, các đồ thị thể hiện mức độ hấp thu được chất vào huyết tương đã được hiệu chỉnh liều. Nồng độ được chất trong huyết tương đã được hiệu chỉnh liều ($\mu\text{g/mL/mg/kg}$ liều tiêm) được thể hiện trên trục y (thang logarit) và thời điểm sau sử dụng (giờ) được thể hiện trên trục x. Các trị số trung bình nhóm được thể hiện bằng các thanh sai số biểu thị độ lệch chuẩn. Các trị số AUC_{0-inf} đã được hiệu chỉnh liều và thời gian bán thải giai đoạn cuối được tính toán bằng mô hình không ngăn sử dụng phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và thể hiện trên Bảng 8.

Fig.8 là hình vẽ thể hiện các trình tự axit amin theo sáng chế.

Fig.9 là bảng thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ thay đổi chứa các trình tự VL-CDR1-3 được thể hiện bằng màu xám. Kháng thể BAN2401: SEQ ID NO.7. Các kháng thể thế hệ mới chứa chuỗi nhẹ thay đổi theo sáng chế: SEQ ID NO.8. Ví dụ cụ thể về các chuỗi nhẹ thay đổi này: i): SEQ ID NO.9; ii): SEQ ID NO.10; iii): SEQ ID NO.11; và iv): SEQ ID NO.12.

Fig.10 là bảng thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng thay đổi chứa các trình tự VH-CDR1-3 được thể hiện bằng màu xám. Kháng thể BAN2401: SEQ ID NO.13. Các kháng thể thế hệ mới chứa chuỗi nặng thay đổi theo sáng chế SEQ ID NO.14. Ví dụ cụ thể về các chuỗi nặng thay đổi này: i): SEQ ID NO.15; ii): SEQ ID NO.16; iii): SEQ ID NO.17; và iv): SEQ ID NO.18.

Fig.11 là đồ thị thể hiện tỷ lệ tương quan sinh trưởng đơn giản của độ thanh thải trung tâm của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8 bao gồm các loài cận lâm sàng chuột nhắt, chuột cống và khỉ đuôi dài. Độ thanh thải của các loài khác nhau này được vẽ tương ứng theo trọng lượng cơ thể của chúng (hình kim cương). Đường hồi quy được ngoại suy để thu được độ thanh thải ở người có trọng lượng cơ thể bằng 70kg. Đối với kháng thể BAN2401, độ thanh thải trung tâm thực tế đo được được thể hiện bằng hình vuông màu trắng, và thu được từ đường hồi quy tuyến tính dựa trên độ thanh thải của kháng thể BAN2401 ở chuột nhắt, chuột cống và khỉ đuôi dài. Kháng thể BAN2401 thể hiện mối tương quan tuyến tính hẹp về độ thanh thải cho thấy thời gian bán thải dự đoán được là không chắc chắn, trái ngược với mối tương quan tuyến tính tốt về độ thanh thải của các kháng thể theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kháng thể đột biến A17D, R79T và R82S là các đột biến vị trí trên kháng thể BAN2401, trong đó các axit amin ở vị trí số 17, 79 và 82 được đột biến trên chuỗi nhẹ thay đổi.

Thuật ngữ “BAN2401” được dùng trong bản mô tả để chỉ kháng thể đơn dòng nhân tạo được đột biến từ kháng thể mAb158 của chuột chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13. Kháng thể BAN2401 và kháng thể mAb158 chứa VL-

CDR1-3 và VH-CDR1-3 và đặc tính của chúng được mô tả trong EP2004688. Kháng thể BAN2401 không phải là đối tượng yêu cầu bảo hộ theo sáng chế.

Các ký hiệu viết tắt dưới đây được sử dụng trong sáng chế.

BAN2401: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

A17D: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

A17D/R79T: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.20 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

A17D/R79T/R82S: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

A17D/R82S: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

A17D/R79T_DI 1: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

A17D/R79T_DI 2: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

A17D/R79T_DI 3: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

A17D/R79T_DI 4: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

A17D/R79T_DI 5: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

A17D/R79T_DI 6: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

A17D/R79T_DI 7: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

A17D/R79T_DI 8: kháng thể chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

Chuỗi nhẹ thay đổi của kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa axit amin ở vị trí số 17 (vị trí kabat số 17) là A, D, E, Q hoặc chất tương tự chức năng của chúng, axit amin ở vị trí số 79 (vị trí kabat số 74) là R, T, K, A, G hoặc chất tương tự chức năng của chúng và axit amin ở vị trí số 82 (vị trí kabat số 77) là R, S, C, G, N hoặc chất tương tự chức năng của chúng. Chất tương tự chức năng là axit amin tạo ra trị số pI của kháng thể tương ứng thấp hơn A (vị trí số 17) và R (vị trí số 79 và 82) và không ảnh hưởng bất lợi đến hoạt tính gắn kết với kháng nguyên.

Các trình tự axit amin theo sáng chế được mô tả dưới đây:

SEQ ID NO.1: chuỗi nặng thay đổi VH-CDR1 của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.2: chuỗi nặng thay đổi VH-CDR2 của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.3: chuỗi nặng thay đổi VH-CDR3 của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.4: chuỗi nhẹ thay đổi VL-CDR1 của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.5: chuỗi nhẹ thay đổi VL-CDR2 của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.6: chuỗi nhẹ thay đổi VL-CDR3 của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.7: chuỗi nhẹ thay đổi của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.8: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi giống nhau của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.9: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.10: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.11: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.12: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.13: chuỗi nặng thay đổi của kháng thể BAN2401.

SEQ ID NO.14: trình tự chuỗi nặng thay đổi giống nhau của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.15: trình tự chuỗi nặng thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.16: trình tự chuỗi nặng thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.17: trình tự chuỗi nặng thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.18: trình tự chuỗi nặng thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.19: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.20: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.21: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.22: trình tự chuỗi nhẹ thay đổi đặc hiệu của các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.23: trình tự axit amin của vùng hằng định IgG1 của người chứa trong các kháng thể theo sáng chế.

SEQ ID NO.24: trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi κ của người chứa trong các kháng thể theo sáng chế.

Chuỗi nhẹ thay đổi (SEQ ID NO.7) của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế chứa ba trình tự CDR (VL-CDR1-3):

VL-CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE SEQ ID NO.4

VL-CDR2: KVSNRFS SEQ ID NO.5

VL-CDR3: FQGSHVPPT SEQ ID NO.6

và chuỗi nặng thay đổi (SEQ ID NO.13) của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế, chứa ba trình tự CDR (VH-CDR1-3):

VH-CDR1: SFGMH SEQ ID NO.1

VH-CDR2: YISSGSSTIYYGDTVKG SEQ ID NO.2

VH-CDR3: EGGYYYGRSYYTMDY SEQ ID NO.3

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với protofibril A β , có các tổ hợp trình tự CDR như sau:

VH-CDR1: SFGMH SEQ ID NO.1

VH-CDR2: YISSGSSTIYYGDTVKG SEQ ID NO.2

VH-CDR3: EGGYYYGRSYYTMDY SEQ ID NO.3

VL-CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE SEQ ID NO.4

VL-CDR2: KVSNRFS SEQ ID NO.5

VL-CDR3: FQGSHVPPT SEQ ID NO.6

và chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8, trong đó x_1 là A, D, E, Q hoặc chất tương tự chức năng của chúng, x_2 là R, T, K, A, G hoặc chất tương tự chức năng của chúng và x_3 là R, S, C, G, N hoặc chất tương tự chức năng của chúng, và không bao gồm tổ hợp $x_1=A$, $x_2=R$ và $x_3=R$.

Chất tương tự chức năng là axit amin tạo ra trị số pI của kháng thể tương ứng thấp hơn A (x_1) và R (x_2 và x_3) và không ảnh hưởng bất lợi đến hoạt tính gắn kết với kháng nguyên.

Chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, chứa z_1 , z_2 và z_3 trong tổ hợp bất kỳ và trong đó

z_1 được chọn từ V và I;

z_2 được chọn từ R và Q; và

z_3 được chọn từ A, N và T;

không bao gồm tổ hợp $z_1=V$, $z_2=R$ và $z_3=A$.

Dựa trên nguyên tắc này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được chất tương tự chức năng với các axit amin đặc hiệu nêu trên đối với mỗi vị trí để chèn axit amin ở vị trí đặc hiệu theo sáng chế, cũng như thử nghiệm đặc tính của kháng thể thu được, ví dụ ái lực gắn kết với protofibril A β và các đặc tính quan trọng khác, được mô tả dưới đây.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực gắn kết với protofibril A β , trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, trong đó

x_1 được chọn từ A, D, E và Q, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

x_2 được chọn từ R, T, K, A và G, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

x_3 được chọn từ R, S, C, G và N, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

y_1 được chọn từ V và A;

y_2 được chọn từ I và V;

y_3 được chọn từ S và Q;

y_4 được chọn từ E và D; và tùy ý

chuỗi nặng thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14, trong đó

z_1 được chọn từ V và I;

z_2 được chọn từ R và Q; và z_3 được chọn từ A, N và T;

không bao gồm tổ hợp $x_1=A$, $x_2=R$ và $x_3=R$.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 được chọn từ A, D, E và Q;

x_2 được chọn từ R, T, K, A và G;

x_3 được chọn từ R, S, C, G và N;

y_1 được chọn từ V và A;

y_2 được chọn từ I và V;

y_3 được chọn từ S và Q;

y_4 được chọn từ E và D; và

chuỗi nặng thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14, trong đó

z_1 được chọn từ V và I;

z_2 được chọn từ R và Q; và

z_3 được chọn từ A, N và T;

không bao gồm tổ hợp $x_1=A$, $x_2=R$ và $x_3=R$.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó chuỗi nhẹ thay đổi của kháng thể này chứa tổ hợp đột biến được chọn từ:

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2);

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2) và x_2 và (y_3 và/hoặc y_4);

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2) và x_2 và x_3 và (y_3 và/hoặc y_4);

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2) và x_3 và (y_3 và/hoặc y_4);

x_2 (y_3 và/hoặc y_4);

x_2 và x_3 và (y_3 và/hoặc y_4); và

x_3 và (y_3 và/hoặc y_4);

không bao gồm tổ hợp $x_1=A$, $x_2=R$ và $x_3=R$.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó chuỗi nhẹ thay đổi của kháng thể này chứa một hoặc nhiều đột biến được chọn từ:

x_1 là D và (y_1 và/hoặc y_2);

x_1 là D và (y_1 và/hoặc y_2), x_2 là T và (y_3 và/hoặc y_4);

x_1 là D và (y_1 và/hoặc y_2), x_2 là T, x_3 là S và (y_3 và/hoặc y_4);

x_1 là D và (y_1 và/hoặc y_2) và x_3 là S và (y_3 và/hoặc y_4);

x_2 là T (y_3 và/hoặc y_4);

x_2 là T và x_3 là S và (y_3 và/hoặc y_4); và

x_3 là S và (y_3 và/hoặc y_4);

trong đó y_1 là V hoặc A và y_2 là V hoặc I, không bao gồm tổ hợp $y_1=V$ và $y_2=I$; y_3 là S hoặc Q và y_4 là E hoặc D không bao gồm tổ hợp $y_3=S$ và $y_4=E$.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó y_1 là A, y_2 là V, y_3 là Q và y_4 là D.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;

y_1 được chọn từ V và A;

y_2 được chọn từ V và I;

y_3 được chọn từ Q và S;

y_4 được chọn từ D và E;

z_1 là V;

z_2 là R; và

z_3 được chọn từ N, T và A;

không bao gồm tổ hợp trong đó y_1 là V, y_2 là I, y_3 là S, y_4 là E, z_1 là V, z_2 là R và z_3 là A.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;
 y_1 là V;
 y_2 là V;
 y_3 là Q;
 y_4 là E;
 z_1 là V;
 z_2 là R; và
 z_3 là N.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;
 x_2 là T;
 x_3 là R;
 y_1 là V;
 y_2 là V;
 y_3 là S;
 y_4 là D;
 z_1 là V;
 z_2 là R; và
 z_3 là N.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;
 x_2 là T;
 x_3 là R;
 y_1 là A;
 y_2 là I;
 y_3 là Q;
 y_4 là E;
 z_1 là V;
 z_2 là R; và

z_3 là N.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;

y_1 là A;

y_2 là I;

y_3 là S;

y_4 là D;

z_1 là V;

z_2 là R; và

z_3 là N.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;

y_1 là V;

y_2 là V;

y_3 là Q;

y_4 là E;

z_1 là V;

z_2 là R; và

z_3 là T.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;

y_1 là V;

y_2 là V;

y_3 là S;

y_4 là D;

z_1 là V;

z_2 là R; và

z_3 là T.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;

y_1 là A;

y_2 là I;

y_3 là Q;

y_4 là E;

z_1 là V;

z_2 là R; và

z_3 là T.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;

y_1 là A;

y_2 là I;

y_3 là S;

y_4 là D;

z_1 là V;

z_2 là R; và

z_3 là T.

Theo một khía cạnh của sáng chế, mỗi đột biến x_1 - x_3 được kết hợp với một hoặc nhiều đột biến bổ sung y_1 - y_4 :

khi x_1 không phải là A, thì các đột biến y_1 và/hoặc y_2 được chèn vào;

khi x_2 không phải là R và/hoặc x_3 không phải là R, thì các đột biến y_3 và/hoặc y_4 được chèn vào;

tạo ra các chuỗi nhẹ thay đổi chứa các tổ hợp đột biến sau so với SEQ ID NO.7:

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2); hoặc

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2) và x_2 và (y_3 và/hoặc y_4); hoặc

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2) và x_2 và x_3 và (y_3 và/hoặc y_4); hoặc

x_1 và (y_1 và/hoặc y_2) và x_3 và (y_3 và/hoặc y_4); hoặc

x_2 và (y_3 và/hoặc y_4); hoặc

x_2 và x_3 và (y_3 và/hoặc y_4); hoặc

x_3 và (y_3 và/hoặc y_4);

trong đó các thông số x và y được định nghĩa nêu trên.

Theo một phương án, chuỗi nhẹ (SEQ ID NO.8) của kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chỉ chứa một hoặc nhiều đột biến x_1 - x_3 trong chuỗi nhẹ thay đổi (sử dụng phương pháp đánh số vị trí đầu tận cùng N): A17D (x_1), R79T (x_2) và R82S (x_3):

A17D; hoặc

A17D và R79T; hoặc

A17D và R79T và R82S; hoặc

A17D và R82S; hoặc

R79T; hoặc

R79T và R82S; hoặc

R82S;

trong đó y_1 là V, y_2 là I, y_3 là S và y_4 là E (không thay đổi so với SEQ ID NO.7).

Theo một phương án khác, các đột biến y_1 - y_4 được chèn vào tạo ra một tổ hợp bất kỳ trong số các tổ hợp sau:

A17D và (y_1 và/hoặc y_2);

A17D và (y_1 và/hoặc y_2) và R79T và (y_3 và/hoặc y_4);

A17D và (y_1 và/hoặc y_2) và R79T và R82S và (y_3 và/hoặc y_4);

A17D và (y_1 và/hoặc y_2) và R82S (y_3 và/hoặc y_4);

R79T (y_3 và/hoặc y_4);

R79T và R82S và (y_3 và/hoặc y_4);

R82S và (y_3 và/hoặc y_4);

trong đó y_1 là V hoặc A và y_2 là V hoặc I, không bao gồm tổ hợp $y_1=V$ và $y_2=I$, y_3 là S hoặc Q và y_4 là E hoặc D, không bao gồm tổ hợp $y_3=S$ và $y_4=E$.

Các tổ hợp đặc hiệu khác được mô tả trong SEQ ID NO. 9-SEQ ID NO.12.

Chuỗi nặng thay đổi (VH) của các kháng thể theo sáng chế có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, trong đó z_1 là V hoặc I, z_2 là R hoặc Q và z_3 là A, N hoặc T, ví dụ SEQ ID NO.15-18.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi được chọn từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 9-SEQ ID NO.12.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng thay đổi được chọn từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 15-SEQ ID NO.18.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi được chọn từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 9-SEQ ID NO.12; và chuỗi nặng thay đổi được chọn từ trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 15-SEQ ID NO.18.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó

chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, chứa vùng hằng định chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA và IgE hoặc biến thể alen bất kỳ của chúng như được mô tả trong tài liệu Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, Đơn công bố NIH số 91-3242), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các trình tự bất kỳ này có thể được sử dụng trong sáng chế. Theo phương án ưu tiên hơn, vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể này là IgG1. Trình tự axit amin của vùng hằng định IgG1 của người đã biết trong lĩnh vực này và được nêu trong SEQ ID NO.23.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm vùng hằng định κ và vùng hằng định λ hoặc biến thể alen bất kỳ của chúng như được mô tả trong tài liệu Kabat et al. (Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, Đơn công bố NIH số 91-3242), được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn. Các trình tự bất kỳ này có thể được sử dụng trong sáng chế. Theo phương án ưu tiên hơn, vùng hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể này là vùng hằng định κ . Trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi κ của người đã biết trong lĩnh vực này và được nêu trong SEQ ID: 24.

Theo một phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là mảnh Fab, hoặc mảnh $F(ab')_2$ hoặc mảnh Fv chuỗi đơn.

Kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể chứa tổ hợp bất kỳ của các chuỗi nhẹ thay đổi và chuỗi nặng thay đổi nêu trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực gắn kết cao với protofibril A β để sử dụng trong điều trị bệnh bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó cho đối tượng có nguy cơ cao phát triển hoặc bị bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β , như chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân,

chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson. Liều thích hợp có thể thay đổi trong khoảng rộng, ví dụ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100mg/kg/liều, phụ thuộc vào chỉ định điều trị, tình trạng của người bệnh, đường đưa thuốc, ví dụ tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm truyền hoặc sử dụng khu trú, và tần suất sử dụng, ví dụ liều đơn, hàng ngày, hàng tuần, ba tháng một lần hoặc thậm chí ít hơn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, để sử dụng trong điều trị bệnh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, để sử dụng trong điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β . Thông thường, các rối loạn này có thể được chọn từ chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, trong sản xuất thuốc dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β . Thông thường, các rối loạn này có thể được chọn từ chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp làm giảm nồng độ protofibril A β ở đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β ở đối tượng có nguy cơ cao bị hoặc bị bệnh này, bao gồm bước cho đối tượng này sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Thông thường, các rối loạn này có thể được chọn từ chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên

quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson.

Thuật ngữ “đối tượng” được dùng trong bản mô tả để chỉ động vật có vú, như người. Các động vật có vú khác là các động vật có vú được điều trị/phòng ngừa và sử dụng trong lĩnh vực thú y.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp đo nồng độ protofibril A β và/hoặc protein A β tích tụ ở đối tượng, bao gồm bước cho mô hoặc dịch cơ thể của đối tượng này tiếp xúc *in vivo* hoặc *in vitro* với kháng thể được đánh dấu, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và đo lượng của các kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protofibril A β và/hoặc protein A β tích tụ này. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, như I¹³¹, C¹¹, C¹⁴, H³, F¹⁸, hoặc Ga⁶⁸, nhưng không chỉ giới hạn ở các đồng vị phóng xạ này, để dùng cho mục đích phát hiện.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp chẩn đoán bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tích tụ protein A β , như chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson, ở đối tượng có nguy cơ cao phát triển hoặc bị bệnh này bao gồm bước cho mô hoặc dịch cơ thể của đối tượng này tiếp xúc *in vivo* hoặc *in vitro* với kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và đo nồng độ kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protein tích tụ. Thông thường, các rối loạn liên quan đến tích tụ protein A β này có thể được chọn từ chấn thương sọ não, hội chứng sa sút tâm thần thể Lewy, hội chứng Down, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, hội chứng sa sút tâm thần tiền đình thái dương, bệnh liên quan đến protein tau, thoái hóa dạng tinh bột toàn thân, chứng xơ vữa động mạch và hội chứng sa sút tâm thần do bệnh Parkinson. Thông thường, mô hoặc dịch cơ thể của đối tượng sẽ được phân tích *in vivo* hoặc *in vitro* (trong mẫu được lấy từ đối tượng bị bệnh) bằng cách cho tiếp xúc với dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó và lượng của các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với protofibril A β sẽ được đo. Phương pháp đo nồng độ protofibril sẽ được sử dụng trong chẩn đoán các bệnh nêu trên, theo đuổi các phương pháp điều trị khác nhau cũng như trong phát triển thuốc mới. Tùy ý, kháng thể hoặc mảnh

gắn kết kháng nguyên của nó, trong dược phẩm này, sẽ được đánh dấu bằng chất đặc hiệu, sẽ được phát hiện và đo bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ phân tích bằng phương pháp ELISA, Biacore và/hoặc phân tích hình ảnh bằng SPECT, PET, MRI. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, như I^{131} , C^{11} , C^{14} , H^3 , F^{18} hoặc Ga^{68} , nhưng không chỉ giới hạn ở các đồng vị phóng xạ này, để dùng cho mục đích phát hiện.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Ngoài lượng hữu hiệu của kháng thể, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa, các thành phần đã biết khác, ví dụ chất đệm, chất bảo quản và làm tăng độ ổn định.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong lĩnh vực thú y. Thông thường, kháng thể theo sáng chế được sử dụng trong lĩnh vực thú y để điều trị và/hoặc phòng ngừa các rối loạn liên quan đến tích tụ protein A β .

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị bệnh bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế kết hợp với các dược chất điều trị triệu chứng, như chất ức chế axetylcholin esteaza, chất đối kháng NMDA và chất ức chế 5HT6.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các chất điều hòa bệnh khác, như chất ức chế γ -secretaza, chất điều hòa γ -secretaza, chất ức chế β -secretaza, chất điều hòa β -secretaza, vaccin, kháng thể khác, chất hướng đích protein tau hoặc quá trình viêm thần kinh, chất chống tăng huyết áp, v.v, để làm tăng hiệu lực điều trị bệnh.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chế phẩm dinh dưỡng để làm tăng hiệu lực điều trị bệnh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế cùng với tá dược và/hoặc chất pha loãng dược dụng, dược phẩm này có thể còn chứa dược chất bổ sung. Thông thường, dược chất bổ sung này có thể được chọn từ chất ức chế axetylcholin esteaza, chất đối kháng NMDA, chất ức chế 5HT6, chất ức chế γ -secretaza, chất điều hòa γ -secretaza, chất ức chế β -secretaza, chất điều hòa β -secretaza, vaccin, kháng thể khác, chất hướng đích protein tau hoặc quá trình viêm thần kinh, chất chống tăng huyết áp và chế phẩm dinh dưỡng. Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế dưới dạng đơn liều hoặc đa liều.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ dưới đây, nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Phương pháp sản xuất kháng thể và phương pháp được sử dụng

Phương pháp sản xuất kháng thể đối chiếu

Kháng thể đối chiếu BAN2401 được sản xuất theo phương pháp mô tả trong EP2004688.

Phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế

Các kháng thể theo sáng chế được sản xuất tạm thời và/hoặc ổn định trong tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc bằng cách sử dụng lần lượt các hệ biểu hiện CHOK1SV GS và CHOK1SV GS-KO Xceed™ (Lonza). Các thể đột biến sau được sản xuất bằng cách chuyển nạp tạm thời sử dụng hệ biểu hiện CHOK1SV GS-KO Xceed™: A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S. Các thể đột biến sau được sản xuất bằng cách chuyển nạp tạm thời lần ổn định sử dụng hệ biểu hiện CHOK1SV GS-KO Xceed™: A17D/R79T_DI 1, kháng thể A17D/R79T_DI 2, kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4, kháng thể A17D/R79T_DI 5, kháng thể A17D/R79T_DI 6, kháng thể A17D/R79T_DI 7 và kháng thể A17D/R79T_DI 8. Thể đột biến A17D/R82S được sản xuất bằng cách chuyển nạp ổn định sử dụng hệ biểu hiện CHOK1SV GS.

Trình tự của các vùng mã hóa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các thể đột biến được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.

Để chuyển nạp tạm thời trong hệ biểu hiện CHOK1SV GS-KO Xceed™, các vùng mã hóa chuỗi nhẹ được tách dòng cấp hai vào vectơ pXC-17.4 và các vùng mã hóa chuỗi nặng được tách dòng cấp hai vào vectơ pXC-18.4. Các dòng tế bào nuôi cấy biểu hiện được thu nhận sau 6 ngày chuyển nạp và làm sạch bằng cách ly tâm và lọc vô trùng. Các dịch nuôi cấy tế bào đã được làm sạch được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng protein A. Kháng thể đã được rửa giải được hòa tan trong dung dịch PBS (độ pH = 7,4). Các kháng thể này tiếp tục được tinh chế bằng phương pháp sắc ký loại cỡ điều chế để loại bỏ các chất tích tụ. Sau đó, píc monome thu được được phân tích bằng phương pháp sắc ký loại cỡ phân tích, và hàm lượng chất tích tụ được xác định là nhỏ hơn 2% đối với toàn bộ các kháng thể.

Quá trình biểu hiện ổn định trong hệ biểu hiện CHOK1SV GS-KO Xeed™ được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, hai vector chứa chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (pXC-17.4 và pXC-18.4) được nối vào một vector mã hóa cặp gen chứa cả hai gen. Tế bào CHOK1SV GS-KO được chuyển nạp bằng xung điện với vector mã hóa cặp gen mạch thẳng này. Quá trình sàng lọc các sản phẩm tách dòng và sàng lọc năng suất của các dòng tế bào nuôi cấy bị chết được phân tích bằng phương pháp ELISA. Quá trình sản xuất kháng thể được thực hiện bằng môi trường CD-CHO có bổ sung 15% chế phẩm dinh dưỡng A và 15% chế phẩm dinh dưỡng B (Life Technologies). Các dịch nổi được thu nhận bằng cách ly tâm và lọc vô trùng. Các dịch nổi nuôi cấy tế bào đã được làm sạch được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng protein G và trao đổi dung dịch đệm với dung dịch PBS Dulbecco (Gibco).

Để chuyển nạp ổn định bằng cách sử dụng hệ biểu hiện CHOK1SV GS (Lonza), gen mã hóa chuỗi nặng được nối vào vector pEE6.4 và gen mã hóa chuỗi nhẹ được nối vào vector pEE12.4. Hai vector này được nối với nhau để thu được gen mã hóa cặp gen. Tế bào CHOK1SV được chuyển nạp bằng xung điện với vector mã hóa cặp gen mạch thẳng này. Cụ thể, quá trình chuyển nạp được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quá trình sàng lọc các sản phẩm tách dòng và sàng lọc năng suất của các dòng tế bào nuôi cấy bị chết được phân tích bằng phương pháp ELISA. Quá trình sản xuất kháng thể được thực hiện bằng môi trường CD-CHO có bổ sung 15% chế phẩm dinh dưỡng A và 15% chế phẩm dinh dưỡng B (Life Technologies). Các dịch nổi được thu nhận bằng cách ly tâm và lọc vô trùng. Các dịch nổi nuôi cấy tế bào đã được làm sạch được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng protein G và trao đổi dung dịch đệm với dung dịch PBS Dulbecco (Gibco). Phân tích định lượng kháng thể bằng HPLC loại cỡ và SDS-PAGE được thực hiện bằng cách sử dụng dạng tinh chế của toàn bộ các thể đột biến thu được.

Phân tích ái lực gắn kết đích bằng phương pháp ELISA ức chế

Đặc tính gắn kết với protofibril A β và monome A β của các kháng thể theo sáng chế so với kháng thể BAN2401 được phân tích bằng phương pháp ELISA ức chế trong đó các kháng thể được ủ trước trong dung dịch với protofibril A β hoặc monome A β , sau đó chuyển vào các đĩa ELISA đã được phủ protofibril A β và monome A β , như được mô tả trong Tucker *et. al.* J Alzheimers Dis. 2015; 43(2):575-88. doi: 10.3233/JAD-140741. PubMed PMID: 25096615, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn.

Nghiên cứu được lực học trên chuột nhắt thể đại

Các chuột nhắt cái C57BL/6 8-10 tuần tuổi được chia nhóm và tiêm tĩnh mạch liều đơn của kháng thể BAN2401 hoặc các kháng thể theo sáng chế ở liều bằng 10mg/kg. Huyết tương từ toàn bộ các chuột được đo ở các thời điểm thay đổi từ 30 phút đến 29 ngày sau khi tiêm và sử dụng để đo nồng độ các kháng thể, sau đó tính toán các thông số được lực học. Các chuột nhắt thử nghiệm bị giết chế ở thời điểm lấy mẫu huyết tương cuối cùng.

Nghiên cứu được lực học ở chuột cống

Các chuột cống cái Sprague Dawley tám tuần tuổi được chia nhóm và tiêm tĩnh mạch liều đơn của kháng thể BAN2401 hoặc các kháng thể theo sáng chế ở liều bằng 10mg/kg. Huyết tương từ toàn bộ các chuột được đo ở các thời điểm thay đổi từ 30 phút đến 29 ngày sau khi tiêm và sử dụng để đo nồng độ các kháng thể, sau đó tính toán các thông số được lực học. Các chuột cống thử nghiệm bị giết chế ở thời điểm lấy mẫu huyết tương cuối cùng.

Nghiên cứu được lực học trên khí

Các khí đực đuôi dài được chia nhóm (N=3) và truyền tĩnh mạch liều đơn bằng 5mg/kg BAN2401 hoặc 10mg/kg của các kháng thể theo sáng chế. Huyết tương từ toàn bộ các khí được đo ở các thời điểm thay đổi từ 5 phút đến 28 ngày sau khi tiêm và sử dụng để đo nồng độ các kháng thể. Nồng độ trong huyết tương của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế được xác định bằng phương pháp ELISA. Các biotinyl-prototofibril A β 1-42 được bổ sung vào vi đĩa được cố định bằng avidin để phủ. Sau khi phong bế, các mẫu huyết tương khí được bổ sung vào các giếng. Sau khi rửa loại bỏ các chất không gắn kết bất kỳ, kháng thể của dê kháng IgG của người được đánh dấu bằng phosphataza kiềm được bổ sung vào các giếng. Sau khi rửa để loại bỏ các chất phản ứng không gắn kết bất kỳ, p-nitrophenylphosphat, là cơ chất của phosphataza kiềm, được bổ sung vào các giếng. Phản ứng được dừng bằng dung dịch natri hydroxit và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 405nm và 492nm. Độ hấp thụ ở bước sóng 492nm được trừ đi từ độ hấp thụ ở bước sóng 405nm. Các trị số độ hấp thụ được chuyển đổi thành nồng độ bằng cách sử dụng đường chuẩn, sau đó sử dụng để tính toán các thông số được lực học.

Đo nồng độ các kháng thể A β bằng phương pháp ELISA trực tiếp

Nồng độ của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy tế bào, chế phẩm chứa kháng thể tinh chế, và mẫu huyết tương thu được trong các nghiên cứu dược lực học trên chuột nhắt và chuột cống được đo bằng phương pháp ELISA trực tiếp để đo nồng độ của các kháng thể kháng protein A β . Các mẫu được pha loãng liên tiếp và ủ trong các giếng của vi đĩa được phủ bằng các monome A β 1-40 để cho phép gắn kết với kháng thể BAN2401, và các kháng thể theo sáng chế. Kháng thể của dê kháng IgG của người được liên hợp với peroxidaza của cây cải ngựa được sử dụng làm kháng thể phát hiện và TMB, là cơ chất của HRP, được bổ sung vào. Phản ứng được dừng bằng dung dịch H₂SO₄ 2M, sau đó độ hấp thụ của dung dịch màu vàng thu được được đo ở bước sóng 450nm. Phương pháp này được sử dụng để định lượng, trong đó các trị số độ hấp thụ ở bước sóng 450nm được chuyển đổi thành nồng độ bằng cách sử dụng đường chuẩn.

Tính toán các thông số dược lực học bằng mô hình không ngăn

Thời gian bán thải giai đoạn cuối của từng kháng thể được tính toán bằng cách sử dụng mô hình không chia ngăn và phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight). Diện tích dưới đường cong (AUC_{0-inf}) được tính toán bằng phần mềm Phoenix WinNonlin bằng cách sử dụng phương pháp hình thang. Trị số trung bình nhóm và độ lệch chuẩn của diện tích dưới đường cong và thời gian bán thải giai đoạn cuối được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism 6.04.

Phân tích thống kê

Phân tích thống kê của trị số trung bình nhóm và độ lệch chuẩn của diện tích dưới đường cong và thời gian bán thải giai đoạn cuối được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism 6.04. Phép kiểm định ANOVA một biến và phép kiểm định sau so sánh nhiều biến Bonferroni được sử dụng trong các nghiên cứu này. Các phép kiểm định được thực hiện ở các mức ý nghĩa thống kê * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ và **** $P < 0,0001$.

Ví dụ 2. Đặc tính gắn kết đích

Ái lực gắn kết với protofibril A β được duy trì ở kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S so với kháng thể BAN2401

Đặc tính gắn kết đích của các kháng thể theo sáng chế được phân tích so với kháng thể BAN2401 (đối chứng) bằng phương pháp ELISA ức chế như được mô tả trong ví dụ 1 (ELISA ức chế). Các kết quả được thể hiện trên Fig.1, trong đó phân tích ái lực gắn kết và chọn lọc đối với các protofibril A β so với các monome A β của kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S và BAN2401 được thể hiện. Các kết quả cho thấy rằng ái lực gắn kết và chọn lọc với các protofibril A β như so với ái lực gắn kết với monome A β được duy trì ở các kháng thể theo sáng chế (kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S).

Ví dụ 3. Đặc tính dược lực học của các kháng thể ở chuột nhắt

Nghiên cứu dược lực học của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S, kháng thể A17D/R79T/R82S ở chuột nhắt thể đại

Để nghiên cứu đặc tính dược lực học của các kháng thể theo sáng chế ở chuột nhắt thể đại, các chuột nhắt cái C57BL/6 8-10 tuần tuổi được tiêm tĩnh mạch liều đơn bằng 10mg/kg BAN2401 (N=8), kháng thể A17D (N=7), kháng thể A17D/R79T (N=6), kháng thể A17D/R82S (N=8) hoặc A17D/R79T/R82S (N=7). Các chuột thử nghiệm được lấy máu sau 0,5 giờ, 2 ngày, 7 ngày, 14 hoặc 15 ngày, và 28 hoặc 29 ngày và nồng độ của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế được phân tích bằng phương pháp ELISA bằng cách sử dụng A β 1-40 để phong bế và kháng thể của dê kháng IgG của người được liên hợp với HRP để phát hiện như được mô tả trong ví dụ 1 (ELISA trực tiếp). Kháng thể A17D/R82S được sử dụng trong nghiên cứu bắt đầu ở thử nghiệm riêng so với các kháng thể khác. Tuy nhiên, các mẫu huyết tương từ hai nghiên cứu khác nhau được phân tích bằng phương pháp ELISA ở cùng thời điểm để tránh sai số giữa các thử nghiệm.

Như được thể hiện trên các đồ thị nồng độ - thời gian trên Fig.2 và các thông số dược lực học tính toán được thể hiện trên Bảng 1, đặc tính dược lực học của các kháng thể theo sáng chế (kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S) khác biệt đáng kể so với kháng thể

BAN2401, đặc biệt trong 48 giờ đầu sau khi tiêm. Trong khi mức độ hấp thu được đo dưới dạng diện tích dưới đường cong (AUC_{0-inf}) của kháng thể A17D cao gấp 6 lần BAN2401, thì diện tích dưới đường cong của kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S được cải thiện 10-11 lần (Bảng 1). Ngoài ra, thời gian bán thải trong huyết tương giai đoạn cuối của các kháng thể theo sáng chế dài hơn BAN2401 (Bảng 1).

Bảng 1. Các thông số dược lực học trong huyết tương của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S ở chuột nhắt. Thời gian bán thải và AUC_{0-inf} của toàn bộ các kháng thể được tính toán riêng cho toàn bộ các chuột nhắt thử nghiệm bằng mô hình không ngăn bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và phân tích thống kê bằng phép kiểm định ANOVA một biến và phép kiểm định sau so sánh nhiều biến Bonferroni. Các trị số AUC_{0-inf} và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình được thể hiện trong Bảng. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian bán thải giai đoạn cuối và AUC_{0-inf} giữa BAN2401 và các thể đột biến được thể hiện trong Bảng, trong đó *** là $p < 0,001$, và **** $p < 0,0001$.

Kháng thể	AUC_{0-inf} (mg*giờ/mL)	Thời gian bán thải giai đoạn cuối (ngày)
BAN2401	3,7	4,5
A17D	23,3****	8,7***
A17D/R79T	40,2****	10,7****
A17D/R82S	37,9****	11,1****
A17D/R79T/R82S	41,0****	10,9****

Ví dụ 4. Đặc tính dược lực học của các kháng thể ở chuột cống

Nghiên cứu dược lực học của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S ở chuột cống

Để nghiên cứu đặc tính dược lực học của các kháng thể theo sáng chế ở chuột cống, các chuột cống cái Sprague Dawley tám tuần tuổi được tiêm tĩnh mạch liều đơn bằng 10mg/kg BAN2401 (N=3), kháng thể A17D (N=4), kháng thể A17D/R79T (N=6) hoặc A17D/R79T/R82S (N=5). Các chuột thử nghiệm được lấy máu sau 0,5 giờ, 2 giờ, 7 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 29 ngày sau khi tiêm. Nồng độ của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế được phân tích bằng phương pháp ELISA bằng cách sử dụng A β 1-40 để phong bế và kháng thể của dê kháng IgG của người được liên hợp với HRP để phát hiện như được mô tả trong ví dụ 1 (ELISA trực tiếp). Sự giảm

nhận thấy nồng độ của kháng thể BAN2401 trong huyết tương của chuột nhất thể đại trong 48 giờ đầu sau sử dụng dẫn đến làm giảm mức độ hấp thu (Fig.2) không quan sát được ở chuột cống, và thay vào đó BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế có đặc tính được lực học giống nhau (Fig.3). Phân tích thống kê thời gian bán thải trong huyết tương và AUC_{0-inf} được tính toán riêng cho toàn bộ các chuột cống trong nghiên cứu cho thấy không có khác biệt nhiều về AUC_{0-inf} hoặc thời gian bán thải giai đoạn cuối giữa BAN2401 và kháng thể A17D hoặc A17D/R79T/R82S (Bảng 2). Trong khi, mức độ tăng đáng kể về AUC_{0-inf} được thể hiện đối với kháng thể A17D/R79T so với kháng thể BAN2401, thì không có mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian bán thải giai đoạn cuối giữa hai kháng thể này (Bảng 2).

Bảng 2. Các thông số dược lực học trong huyết tương của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S ở chuột cống. Thời gian bán thải và AUC_{0-inf} của toàn bộ các kháng thể được tính toán riêng cho toàn bộ các chuột nhất thử nghiệm bằng mô hình không ngăn bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và phân tích thống kê bằng phép kiểm định ANOVA một biến và phép kiểm định sau so sánh nhiều biến Bonferroni. Các trị số AUC_{0-inf} và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S được tính toán được thể hiện trong Bảng. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian bán thải giai đoạn cuối và AUC_{0-inf} giữa BAN2401 và các thể đột biến được thể hiện trong Bảng, trong đó ** là $P<0,01$.

Kháng thể	AUC_{0-inf} (mg*giờ/mL)	Thời gian bán thải giai đoạn cuối (ngày)
BAN2401	31,1	10,2
A17D	38,0	10,9
A17D/R79T	47,6**	12,8
A17D/R79T/R82S	36,6	11,2

Ví dụ 5. Khử miễn dịch

Thử nghiệm hoạt hóa toàn bộ protein tế bào T ex vivo của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S

Để đánh giá liệu các đột biến được chèn vào các kháng thể theo sáng chế có dẫn đến làm tăng nguy cơ gây đáp ứng miễn dịch ở người hay không, A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S được phân tích so với kháng thể BAN2401

bằng thử nghiệm hoạt hóa toàn bộ protein tế bào T *ex vivo*. Thử nghiệm hoạt hóa tế bào T theo thời gian EpiScreen™ đo khả năng của kháng thể để gây đáp ứng miễn dịch tế bào T biểu hiện CD4 (Antitope Ltd, Cambridge, UK). Các mẫu được thử nghiệm trên tế bào đơn nhân máu ngoại vi đã được loại trừ cầu biểu hiện CD8 (PBMC) từ nhóm thử nghiệm gồm 25 người tình nguyện khỏe mạnh (Người tình nguyện 1-25, Bảng 3) có độ đa dạng gen HLA rộng. Khả năng kháng thể để gây đáp ứng miễn dịch tế bào T biểu hiện CD4 được đo bằng thử nghiệm tăng sinh và bài tiết IL-2.

Các kết quả từ nghiên cứu cho thấy nguy cơ sinh miễn dịch tổng cộng là thấp đối với kháng thể BAN2401, và tương đối thấp đối với kháng thể A17D với tỷ lệ đáp ứng dương tính tương ứng bằng 8% và 12% người tình nguyện (Bảng 3). Phân tích A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S cho thấy khả năng sinh miễn dịch hơi cao, do tần suất kết hợp của thử nghiệm tăng sinh tế bào T và bài tiết IL-2 tương ứng bằng 24% và 20% của nhóm nghiên cứu này.

Bảng 3. Các đáp ứng IL-2 ELISpot và tăng sinh tế bào T ở người tình nguyện khỏe mạnh đối với kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S. Đáp ứng tăng sinh tế bào T dương tính được thể hiện bằng ký hiệu “P” và đáp ứng ELISpot dương tính được thể hiện bằng ký hiệu “E”. Các đáp ứng ranh giới được thể hiện bằng ký hiệu (*). Mỗi tương quan được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm đáp ứng tăng sinh cũng dương tính trong thử nghiệm ELISpot. Được cân nhắc đáp ứng ở một người tình nguyện, cả hai thử nghiệm tăng sinh và thử nghiệm ELISpot đều phải có kết quả dương tính. Kháng thể nhân tạo A33 (Welt S et al., Clin Cancer Res. 2003 Apr; 9(4): 1347-53., 2003), là kháng thể điều trị đối chứng có khả năng sinh miễn dịch trung bình đã biết bằng 32% trên lâm sàng, thông thường kích thích 20-30% người tình nguyện đáp ứng dương tính trong thử nghiệm tăng sinh tế bào T. Phytohaemagglutinin (PHA) và Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) là các kháng nguyên hoạt lực mạnh được sử dụng làm mẫu đối chứng dương.

	BAN2401	A17D	A17D/R79T	A17D/R79T/R82S	A33	KLH	PHA
Người tình nguyện 1				PE		PE	PE
Người tình nguyện 2		PE	P*E		PE	PE	PE
Người tình nguyện 3			E*			PE	PE
Người tình nguyện 4						PE	PE

Người tình nguyên 5						PE	PE
Người tình nguyên 6						PE	PE
Người tình nguyên 7						PE	PE
Người tình nguyên 8			PE	PE		PE	PE
Người tình nguyên 9						PE	PE
Người tình nguyên 10						PE	PE
Người tình nguyên 11						E	PE
Người tình nguyên 12						P*	PE
Người tình nguyên 13					PE	PE	PE
Người tình nguyên 14			PE	PE	PE	PE	PE
Người tình nguyên 15					P	PE	PE
Người tình nguyên 16	PE	P	P	P	E	PE	PE
Người tình nguyên 17			PE	PE	PE	PE	PE
Người tình nguyên 18						PE	PE
Người tình nguyên 19	PE	PE	PE	PE		PE	PE
Người tình nguyên 20						PE	PE
Người tình nguyên 21	P	PE*	P	P		PE	PE
Người tình nguyên 22						E	PE
Người tình nguyên 23			PE			PE	PE
Người tình nguyên 24				E	PE	PE	PE
Người tình nguyên 25						PE	PE
Tỷ lệ % tăng sinh	12	16	32	28	24	92	100
ELISpot %	8	12	28	24	24	96	100
Tỷ lệ % tăng sinh và ELISpot	8	12	24	20	20	88	100
Tỷ lệ % tương quan	67	75	75	71	83	96	100

Sàng lọc epitop tế bào T của kháng thể BAN2401 *in silico*

Để tiếp tục đánh giá nguy cơ sinh miễn dịch gây ra bởi các đột biến và phát hiện các vị trí liên quan để khử miễn dịch, kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể

A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S được sàng lọc epitop tế bào T *in silico*. Các trình tự vùng thay đổi của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S được cung cấp cho Antitope Ltd (Cambridge, UK) để phân tích bằng các kỹ thuật iTope™ và TCED™ *in silico*. Các trình tự gắn kết MHC nhóm II ngẫu nhiên phi tế bào gốc được xác định trong cả chuỗi nặng lẫn chuỗi nhẹ của các kháng thể được phân tích. Phân tích tra cứu BLAST bằng kỹ thuật TCED™ xác định được hai trình tự bắt cặp từng phần với các epitop đã được xác định trước trong cơ sở dữ liệu peptit có khả năng sinh miễn dịch đã biết *ex vivo*.

Lập bản đồ epitop tế bào T *ex vivo* của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S

Để kiểm chứng nguy cơ sinh miễn dịch gây ra bởi các đột biến mới và xác định các vị trí để khử miễn dịch, 44 peptit (15-mers) có nguồn gốc từ các vùng thay đổi của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S được đánh giá về sự có mặt của các epitop tế bào T biểu hiện CD4 bằng cách sử dụng kỹ thuật lập bản đồ epitop tế bào T EpiScreen™ (Antitope Ltd, Cambridge, UK). Các peptit này được chọn để bao trùm toàn bộ các epitop tế bào T tiềm năng được xác định bằng phương pháp sàng lọc *in silico* và cũng bao gồm hai vùng bao trùm gốc thay thế A17D và các gốc thay thế R79T và R82S (bao gồm các peptit chứa hoặc không chứa các đột biến).

Các peptit này được thử nghiệm trên nhóm gồm 11 người tình nguyện được chọn từ phân tích toàn bộ kháng thể EpiScreen™ mô tả nêu trên. Các đáp ứng tế bào T được đánh giá đối với mỗi người tình nguyện kháng lại mỗi peptit bằng cách sử dụng thử nghiệm tăng sinh đo ³[H]-thymidin liên hợp. Các kết quả này xác định sự có mặt của ba epitop tế bào T tiềm năng trong các trình tự (epitop 1, 5 và 8). “Epitop 1” có trong chuỗi nặng được coi là yếu. “Epitop 5” chứa đột biến A17D và yếu và không quan sát được đáp ứng trên người tình nguyện với peptit liên quan của trình tự BAN2401 thể đại. “Epitop 8” là epitop quan trọng nhất dựa trên tần suất của các đáp ứng tế bào T và được xác định trong các peptit của các kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S nhưng không có trong trình tự kháng thể BAN2401 hoặc kháng thể A17D thể đại.

Dữ liệu từ thử nghiệm lập bản đồ epitop tế bào T *ex vivo* hỗ trợ kết luận từ thử nghiệm toàn bộ kháng thể tế bào T theo thời gian cho thấy rằng kháng thể A17D/R79T và kháng thể A17D/R79T/R82S liên quan đến nguy cơ tăng khả năng sinh miễn dịch. Ngoài ra, kháng thể A17D/R82S (không bao gồm trong thử nghiệm toàn bộ kháng thể tế bào T) cũng có nguy cơ sinh miễn dịch tăng do đột biến R82S ở “epitop 8”.

Khử miễn dịch các peptit được xác định là epitop tế bào T tiềm năng bằng cách lập bản đồ epitop tế bào T *ex vivo*

Nhìn chung, khử miễn dịch đạt được bằng cách thay đổi một axit amin duy trên ở một trong số các vị trí mạch bên (p1, p4, p6, p7 và p9 của 9-mer) của peptit gắn kết MHC nhóm II tiềm năng. Các đột biến khử miễn dịch đặc hiệu trong ba epitop được xác định trong thử nghiệm lập bản đồ peptit *ex vivo* (epitop 1, 5 và 8) mô tả nêu trên được chọn. Các gốc thay thế này được chọn dựa trên ái lực gắn kết giảm đã biết trước của peptit với túi gắn kết của phân tử MHC nhóm II. Hai gốc thay thế khử miễn dịch được thử nghiệm đối với mỗi peptit đã được xác định là có khả năng sinh miễn dịch cao, và các peptit này được phân tích cùng với các peptit ban đầu của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D, kháng thể A17D/R79T, kháng thể A17D/R82S và kháng thể A17D/R79T/R82S bằng cách sử dụng kỹ thuật lập bản đồ peptit EpiScreen™.

Các đáp ứng tế bào T được đánh giá đối với mỗi người tình nguyện kháng lại mỗi peptit bằng cách sử dụng thử nghiệm tăng sinh đo $^3\text{[H]}$ -thymidin liên hợp. Các kết quả thu được từ nghiên cứu này khẳng định các phát hiện trước đó, nhưng toàn bộ các epitop (epitop 1, 5 và 8) được coi là yếu trong nghiên cứu này (Bảng 4). Tuy nhiên, toàn bộ các gốc thay thế khử miễn dịch đã làm giảm thành công nguy cơ sinh miễn dịch của các peptit bao trùm ba epitop này so với các peptit ban đầu, không có hoặc có rất ít đáp ứng tế bào T (Bảng 4). Kết quả này cho thấy rằng các gốc thay thế được chọn là hữu hiệu và khử miễn dịch là thành công.

Bảng 4. Các kết quả khử miễn dịch về nồng độ peptit của các epitop được xác định là có khả năng sinh miễn dịch bằng cách sử dụng kỹ thuật lập bản đồ epitop tế bào T EpiScreen™. Các peptit được thể hiện là có nguồn gốc từ kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế được xác định là có khả năng sinh miễn dịch, và các peptit tương tự có các gốc thay thế đã khử miễn dịch được chèn vào (gạch chân). Các đột biến làm tăng thời gian bán thải được in đậm. Toàn bộ các peptit đã khử miễn dịch được đánh giá

trong thử nghiệm tăng sinh tế bào T *ex vivo* và các kết quả được thể hiện ở cột ngoài cùng bên phải (tần suất đáp ứng của người tình nguyện).

Vùng epitop	Kháng thể có nguồn gốc peptit và các gốc thay thế đã khử miễn dịch	Peptit	Tần suất đáp ứng (%)
1.	BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế*	SFGMHWVRQAPGKGL	12
	A→N	SFGMHWVRQ <u>N</u> PGKGL	0
	A→T	SFGMHWVRQ <u>T</u> PGKGL	4
5.	Toàn bộ các kháng thể theo sáng chế (thể đột biến A17D)	PVTPGDPASISCRSS	16
	I→V	PVTPGDPAS <u>V</u> SCRSS	0
	V→A	P <u>A</u> TPGDPASISCRSS	0
8.	A17D/R79T (thể đột biến R79T)	SGSGTDFTLTISRVE	16
	S→Q	SGSGTDFTLT <u>I</u> QRVE	4
	E→D	SGSGTDFTLTISR <u>V</u> D	4
8.	A17D/R79T (thể đột biến R79T)	GTDFTLTISRVEAED	20
	S→Q	GTDFTLT <u>I</u> QRVEAED	0
	E→D	GTDFTLTISR <u>V</u> DAED	0
8.	A17D/R79T/R82S (các đột biến R79T/R82S)	SGSGTDFTLTIS <u>S</u> VE	12
	S→Q	SGSGTDFTLT <u>I</u> QSVE	0
	E→D	SGSGTDFTLTIS <u>S</u> <u>V</u> D	0
8.	A17D/R79T/R82S (các đột biến R79T/R82S)	GTDFTLTIS <u>S</u> VEAED	16
	S→Q	GTDFTLT <u>I</u> QSVEAED	0
	E→D	GTDFTLTIS <u>S</u> <u>V</u> DAED	0
8.	A17D/R82S (thể đột biến R82S)	SGSGTDFTLRIS <u>S</u> VE	12
	S→Q	SGSGTDFTLR <u>I</u> QSVE	0
	E→D	SGSGTDFTLRIS <u>S</u> <u>V</u> D	4
8.	A17D/R82S (thể đột biến R82S)	GTDFTLRIS <u>S</u> VEAED	16
	S→Q	GTDFTLR <u>I</u> QSVEAED	4
	E→D	GTDFTLRIS <u>S</u> <u>V</u> DAED	4

*) Các kháng thể không được khử miễn dịch

Thiết kế và sản xuất biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T

Tám biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T được thiết kế dựa trên các kết quả thu được từ lập bản đồ epitop tế bào T và peptit khử miễn dịch mô tả nêu trên. Trong cả ba epitop được xác định là có khả năng sinh miễn dịch cao, các đột biến đã khử miễn dịch có khả năng sinh miễn dịch giảm trong lập bản đồ epitop tế bào T *ex vivo* được chèn vào các tổ hợp này được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Tám biến thể đã khử miễn dịch của thể đột biến kép A17D/R79T. Các đột biến đã khử miễn dịch đối với các epitop 1, 5 và 8, được chọn và chức năng được kiểm chứng trong thử nghiệm tăng sinh tế bào T ex vivo về nồng độ peptit, được thể hiện đối với các kháng thể đặc hiệu. Phương pháp đánh số vị trí đầu tận cùng N được sử dụng. VH = chuỗi nặng thay đổi, VL= chuỗi nhẹ thay đổi.

Biến thể A17D/R79T	Khử miễn dịch ở epitop 1 (VH)	Khử miễn dịch ở epitop 5 (VL)	Khử miễn dịch ở epitop 8 (VL)
A17D/R79T_DI 1	A40N	I21V	S81Q
A17D/R79T_DI 2	A40N	I21V	E84D
A17D/R79T_DI 3	A40N	V13A	S81Q
A17D/R79T_DI 4	A40N	V13A	E84D
A17D/R79T_DI 5	A40T	I21V	S81Q
A17D/R79T_DI 6	A40T	I21V	E84D
A17D/R79T_DI 7	A40T	V13A	S81Q
A17D/R79T_DI 8	A40T	V13A	E84D

Ví dụ 6. Đặc tính gắn kết đích của các kháng thể đã khử miễn dịch

Ái lực gắn kết với protofibril A β được duy trì ở tám biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) so với kháng thể BAN2401

Đặc tính gắn kết đích của tám biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) được phân tích so với kháng thể BAN2401 (đối chứng) bằng phương pháp ức chế mô tả trong ví dụ 1 (ELISA ức chế). Các kết quả được thể hiện trên Fig.4, trong đó phân tích ái lực gắn kết và chọn lọc với các protofibril A β so với các monome A β của kháng thể A17D/R79T_DI 1-8 và BAN2401 được thể hiện. Các kết quả cho thấy rằng ái lực gắn kết và chọn lọc với các protofibril A β như so với ái lực gắn kết với monome A β được duy trì ở các kháng thể theo sáng chế (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8).

Ví dụ 7. Đặc tính dược lực học của các kháng thể đã khử miễn dịch ở chuột nhắt

Nghiên cứu dược lực học của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T và tám biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) ở chuột nhắt thể đại

Để so sánh đặc tính dược lực học của tám biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) với đặc tính dược lực học của kháng thể BAN2401 và kháng thể A17D/R79T ở chuột nhắt thể đại, các chuột nhắt cái C57BL/6 8-10 tuần tuổi được chia nhóm (N=5) được tiêm tĩnh mạch liều đơn bằng 10mg/kg kháng

thể. Các chuột thử nghiệm được lấy máu sau 0,5 giờ, 2 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 28 ngày và nồng độ của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế được phân tích bằng phương pháp ELISA bằng cách sử dụng A β 1-40 để phong bế và kháng thể của dê kháng IgG của người được liên hợp với HRP để phát hiện như được mô tả trong ví dụ 1 (ELISA trực tiếp). Như được thể hiện trên đồ thị nồng độ - thời gian trên Fig.5, đặc tính dược lực học của các thể đột biến A17D/R79T đã khử miễn dịch (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) tương đương với đặc tính dược lực học của kháng thể A17D/R79T và khác biệt so với kháng thể BAN2401. Các kết quả cho thấy rằng AUC_{0-inf} và thời gian bán thải giai đoạn cuối của kháng thể A17D/R79T và các biến thể đã được khử miễn dịch (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) được gia tăng đáng kể hơn so với kháng thể BAN2401 (Bảng 6). Do đó, toàn bộ các biến thể đã được khử miễn dịch có đặc tính dược lực học được cải thiện so với kháng thể BAN2401 và có đặc tính dược lực học tương đương với đặc tính dược lực học của kháng thể A17D/R79T, với mức độ hấp thu được gia tăng và thời gian bán thải giai đoạn thải trừ kéo dài.

Bảng 6. Các thông số dược lực học trong huyết tương của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T và biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) ở chuột nhắt. Thời gian bán thải và AUC_{0-inf} của toàn bộ các kháng thể được tính toán riêng cho toàn bộ các chuột nhắt thử nghiệm bằng mô hình không ngăn bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và phân tích thống kê bằng phép kiểm định ANOVA một biến và phép kiểm định sau so sánh nhiều biến Bonferroni. AUC_{0-inf} trung bình và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình được thể hiện trong Bảng. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian bán thải giai đoạn cuối và AUC_{0-inf} giữa BAN2401 và các thể đột biến được thể hiện trong Bảng, trong đó * là $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ và **** $P < 0,0001$.

Kháng thể	AUC _{0-inf} (mg* giờ/mL)	Thời gian bán thải giai đoạn cuối (ngày)
BAN2401	3,6	3,5
A17D/R79T	38,0****	10,7**
A17D/R79T_DI 1	42,3****	13,0***
A17D/R79T_DI 2	40,4****	10,5**
A17D/R79T_DI 3	44,9****	12,6***
A17D/R79T_DI 4	43,7****	12,7***
A17D/R79T_DI 5	32,6****	10,4*
A17D/R79T_DI 6	33,4****	12,2 ***
A17D/R79T_DI 7	41,7****	14,1 ****
A17D/R79T_DI 8	43,8****	10,0*

Ví dụ 8. Đặc tính dược lực học của các kháng thể đã khử miễn dịch ở chuột cống

Đặc tính dược lực học của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T và tám biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T DI 1-8) ở chuột cống

Để so sánh đặc tính dược lực học của tám biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) với đặc tính dược lực học của kháng thể BAN2401 và kháng thể A17D/R79T ở chuột cống, các chuột cống cái Sprague Dawley tám tuần tuổi được chia nhóm (N=5) được tiêm tĩnh mạch liều đơn bằng 10mg/kg kháng thể. Các chuột thử nghiệm được lấy máu sau 0,5 giờ, 2 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 28 ngày và nồng độ của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế được phân tích bằng phương pháp ELISA bằng cách sử dụng A β 1-40 để phong bế và kháng thể của dê kháng IgG của người được liên hợp với HRP để phát hiện (Ví dụ 1, ELISA trực tiếp).

Như được thể hiện trên Fig.6, kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T và biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) có đặc tính dược lực học rất giống nhau ở chuột cống. Các kết quả cho thấy rằng A17D/R79T_DI 1 có thời gian bán thải giai đoạn cuối dài hơn đáng kể so với kháng thể BAN2401 ở chuột cống ($p<0,05$), trong khi đó AUC_{0-inf} của A17D/R79T, kháng thể A17D/R79T_DI 1 và kháng thể A17D/R79T_DI 4 cao hơn đáng kể so với kháng thể BAN2401 ($p<0,01$) (Bảng 7).

Bảng 7. Các thông số dược lực học trong huyết tương của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T và biến thể đã khử miễn dịch của kháng thể A17D/R79T (kháng thể A17D/R79T_DI 1-8) ở chuột cống. Thời gian bán thải và AUC_{0-inf} của toàn bộ các kháng thể được tính toán riêng cho toàn bộ các chuột nhất thử nghiệm bằng mô hình không ngăn bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) và phân tích thống kê bằng phép kiểm định ANOVA một biến và phép kiểm định sau so sánh nhiều biến Bonferroni. AUC trung bình và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình được thể hiện trong Bảng. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian bán thải giai đoạn cuối và AUC giữa BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế được thể hiện trong Bảng, trong đó * là $P<0,05$ và ** $P<0,01$.

Kháng thể	AUC _{0-inf} (mg*giờ/mL)	Thời gian bán thải giai đoạn cuối (ngày)
BAN2401	35,1	10,2
A17D/R79T	48,6**	11,0

A17D/R79T_DI 1	47,3**	13,3*
A17D/R79T_DI 2	33,7	11,8
A17D/R79T_DI 3	43,1	11,7
A17D/R79T_DI 4	47,3**	11,7
A17D/R79T_DI 5	44,1	11,6
A17D/R79T_DI 6	39,6	11,3
A17D/R79T_DI 7	35,6	11,8
A17D/R79T_DI 8	40,9	10,6

Ví dụ 9. Đặc tính dược lực học của các kháng thể đã khử miễn dịch ở khi

Đặc tính dược lực học của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8 ở khi đuôi dài.

Để so sánh đặc tính dược lực học của kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8 với đặc tính dược lực học của kháng thể BAN2401 ở khi, các khi được đuôi dài được chia nhóm (N=3) và truyền tĩnh mạch liều đơn bằng 5mg/kg BAN2401 hoặc 10mg/kg của các kháng thể theo sáng chế. Khi được tiêm với kháng thể BAN2401 được lấy máu sau 5 phút, 1 giờ, 2 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 2 ngày, 4 ngày, 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau sử dụng, trong khi đó khi được tiêm với các kháng thể theo sáng chế được lấy máu sau 5 phút, 2 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 3 ngày, 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày. Nồng độ trong huyết tương của các kháng thể được tiêm được phân tích bằng phương pháp ELISA như được mô tả trong ví dụ 1 (ELISA trực tiếp). Đặc tính dược lực học được thể hiện dưới dạng các đồ thị nồng độ - thời gian trên Fig.7, trong khi đó thời gian bán thải và AUC_{0-inf} của toàn bộ các kháng thể được tính toán bằng mô hình không ngăn sử dụng phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight) (Bảng 8). Các thông số dược lực học của BAN2401 được thể hiện Bảng 8, là các kết quả thu được từ nghiên cứu riêng trong đó BAN2401 được truyền tĩnh mạch ở liều bằng 5mg/kg BAN2401.

Bảng 8. Các thông số dược lực học trong huyết tương của kháng thể BAN2401, kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8 ở khi đuôi dài. Thời gian bán thải giai đoạn cuối và AUC_{0-inf} của toàn bộ các kháng thể được tính toán bằng mô hình không ngăn sử dụng phần mềm Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight). Các thông số dược lực học của BAN2401 là các kết quả thu được từ nghiên cứu riêng BAN2401 được truyền tĩnh mạch ở liều bằng 5mg/kg BAN2401. Để so sánh một cách đơn giản AUC giữa BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế, các trị số AUC_{0-inf} trung bình đã hiệu chỉnh liều và thời gian bán thải giai đoạn cuối trung bình

được thể hiện trong Bảng.

Kháng thể	AUC _{0-inf} đã hiệu chỉnh liều (mg*giờ/mL/mg/kg)	Thời gian bán thải giai đoạn cuối (ngày)
BAN2401	5,3	12,0
A17D/R79T_DI 3	6,1	12,0
A17D/R79T_DI 4	6,5	12,6
A17D/R79T_DI 8	7,1	17,2

Ví dụ 10. Tỷ lệ tương quan sinh trưởng đơn giản - chuột nhắt, chuột cống và khỉ cho người

Để dự đoán thời gian bán thải trên người của các kháng thể theo sáng chế (được thể hiện đối với kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8), mô hình 2 ngăn và tỷ lệ tương quan sinh trưởng đơn giản được thực hiện. Mô hình 2 ngăn được áp dụng cho đặc tính dược lực học của kháng thể BAN2401 và các kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight), để xác định độ thanh thải và thể tích phân bố ở chuột nhắt, chuột cống và khỉ. Độ thanh thải và thể tích phân bố được vẽ đồ thị theo trọng lượng cơ thể và tỷ lệ tương quan sinh trưởng đơn giản được áp dụng (Deng *et al. mAbs* 2011: 3(1): p. 61-66. doi:10.4161/mabs.3.1.13799). Thời gian bán thải giai đoạn cuối được tính toán theo phương trình:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2) * \text{Thể tích phân bố}}{\text{Độ thanh thải}}$$

Theo tỷ lệ tương quan sinh trưởng đơn giản của thể tích phân bố hoặc độ thanh thải, các trị số của các thông số xác định được trên các loài cận lâm sàng được vẽ đồ thị theo trọng lượng cơ thể. Hằng số và số mũ từ đường hồi quy được sử dụng để dự đoán thể tích phân bố và độ thanh thải ở người có trọng lượng cơ thể bằng 70kg. Cả hai số mũ (tốt hơn nếu bằng khoảng 0,85 đối với độ thanh thải và 1 đối với thể tích phân bố) và gán vào đường hồi quy là các kết quả đo tin cậy ước lượng của các thông số đặc trưng ở người.

Như được thể hiện trên Fig.11, kháng thể BAN2401 có mối tương quan tuyến tính hẹp về độ thanh thải trung tâm trong số các loài được thử nghiệm, dẫn đến tỷ lệ tương quan sinh trưởng đơn giản không chắc chắn. Độ lệch từ số mũ (bằng khoảng 0,85) cho thấy rằng mối tương quan tuyến tính hẹp là hệ quả của độ thanh thải cao của kháng thể

BAN2401 ở chuột nhắt. Điều này dẫn đến đánh giá không chính xác độ thanh thải kỳ vọng ở người, do đó đánh giá quá mức thời gian bán thải giai đoạn cuối dự đoán được. Thời gian bán thải giai đoạn cuối của kháng thể BAN2401 được xác định đến 41 ngày, chênh lệch đáng kể so với thời gian bán thải đo được trên lâm sàng (5-7 ngày). Độ thanh thải thực tế của kháng thể BAN2401 được thể hiện trên Fig.11 (các hình vuông màu trắng). Trái ngược với mối tương quan tuyến tính hẹp giữa chuột nhắt, chuột cống và khỉ đuôi dài đối với kháng thể BAN2401, các kháng thể theo sáng chế (kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8) thể hiện mối tương quan rất cao (Fig.11). Thời gian bán thải giai đoạn cuối tính toán được từ các thông số dược lực học dự đoán được ở người gợi ý rằng thời gian bán thải ở người bằng 13, 15 và 20 ngày tương ứng đối với kháng thể A17D/R79T_DI 3, kháng thể A17D/R79T_DI 4 và kháng thể A17D/R79T_DI 8. Tỷ lệ tương quan sinh trưởng đơn giản của thể tích phân bố gợi ý rằng mối tương quan tuyến tính tốt và số mũ bằng khoảng 1 đối với kháng thể BAN2401, và các kháng thể theo sáng chế (không thể hiện).

Các kháng thể theo sáng chế thể hiện mối tương quan tuyến tính về độ thanh thải trong số các loài với tỷ lệ tương quan sinh trưởng tin cậy hơn, và đặc tính của chúng giống như các dược chất IgG1 khác, như bevacizumab, omalizumab và trastuzumab, như được mô tả trong Deng et al, Expert Opin. Drug Metab. Toxicol 8(2) (2012): p. 141-160., với thời gian bán thải ở người bằng khoảng 15-30 ngày. Trái ngược với kháng thể BAN2401, với đặc tính dược lực học gần tối ưu ở chuột và người sai lệch so với nhiều dược chất IgG1 khác, kháng thể theo sáng chế được thiết kế dẫn đến đặc tính dược lực học đã được chuẩn hóa ở chuột. Điều này thể hiện đặc tính dược lực học và thời gian bán thải ở chuột nhắt, chuột cống và khỉ đuôi dài tương tự như các dược chất IgG1 khác với thời gian bán thải ở người bằng khoảng 15-30 ngày. Kết quả này sẽ gợi ý rằng thời gian bán thải kéo dài của các kháng thể theo sáng chế ở chuột nhắt sẽ tương đương như ở người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực gắn kết với protofibril A β , trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.8, trong đó

x_1 (Xaa ở vị trí số 17 của trình tự SEQ ID NO.8) được chọn từ A, D, E và Q, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

x_2 (Xaa ở vị trí số 79 của trình tự SEQ ID NO.8) được chọn từ R, T, K, A và G, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

x_3 (Xaa ở vị trí số 82 của trình tự SEQ ID NO.8) được chọn từ R, S, C, G và N, hoặc chất tương tự chức năng của chúng;

y_1 (Xaa ở vị trí số 13 của trình tự SEQ ID NO.8) được chọn từ V và A;

y_2 (Xaa ở vị trí số 21 của trình tự SEQ ID NO.8) được chọn từ I và V;

y_3 (Xaa ở vị trí số 81 của trình tự SEQ ID NO.8) được chọn từ S và Q;

y_4 (Xaa ở vị trí số 84 của trình tự SEQ ID NO.8) được chọn từ E và D; và tùy ý chuỗi nặng thay đổi có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.14, trong đó

z_1 (Xaa ở vị trí số 37 của trình tự SEQ ID NO.14) được chọn từ V và I;

z_2 (Xaa ở vị trí số 38 của trình tự SEQ ID NO.14) được chọn từ R và Q; và

z_3 (Xaa ở vị trí số 40 của trình tự SEQ ID NO.14) được chọn từ A, N và T;

không bao gồm tổ hợp $x_1=A$, $x_2=R$ và $x_3=R$.

2. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó

x_1 được chọn từ A, D, E và Q;

x_2 được chọn từ R, T, K, A và G;

x_3 được chọn từ R, S, C, G và N;

y_1 được chọn từ V và A;

y_2 được chọn từ I và V;

y_3 được chọn từ S và Q; và

y_4 được chọn từ E và D;

không bao gồm tổ hợp $x_1=A$, $x_2=R$ và $x_3=R$.

3. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó

x_1 là D;

x_2 là T;

x_3 là R;

y_1 được chọn từ V và A;

y_2 được chọn từ V và I;

y_3 được chọn từ Q và S;

y_4 được chọn từ D và E;

z_1 là V;

z_2 là R; và

z_3 được chọn từ N, T và A;

không bao gồm tổ hợp trong đó y_1 là V, y_2 là I, y_3 là S, y_4 là E, z_1 là V, z_2 là R và z_3 là A.

4. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

5. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

6. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

7. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit

amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15.

8. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

9. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

10. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

11. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch G (IgG).

12. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, cùng với tá dược và/hoặc chất pha loãng dược dụng.

13. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có ái lực gắn kết với protofibril A β , trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nhẹ thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.121 và chuỗi nặng thay đổi có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16.

14. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 13, trong đó kháng thể này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa vùng hằng định chuỗi nặng của globulin miễn dịch G (IgG).

15. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 13 hoặc 14, cùng với tá dược và/hoặc chất pha loãng dược dụng.

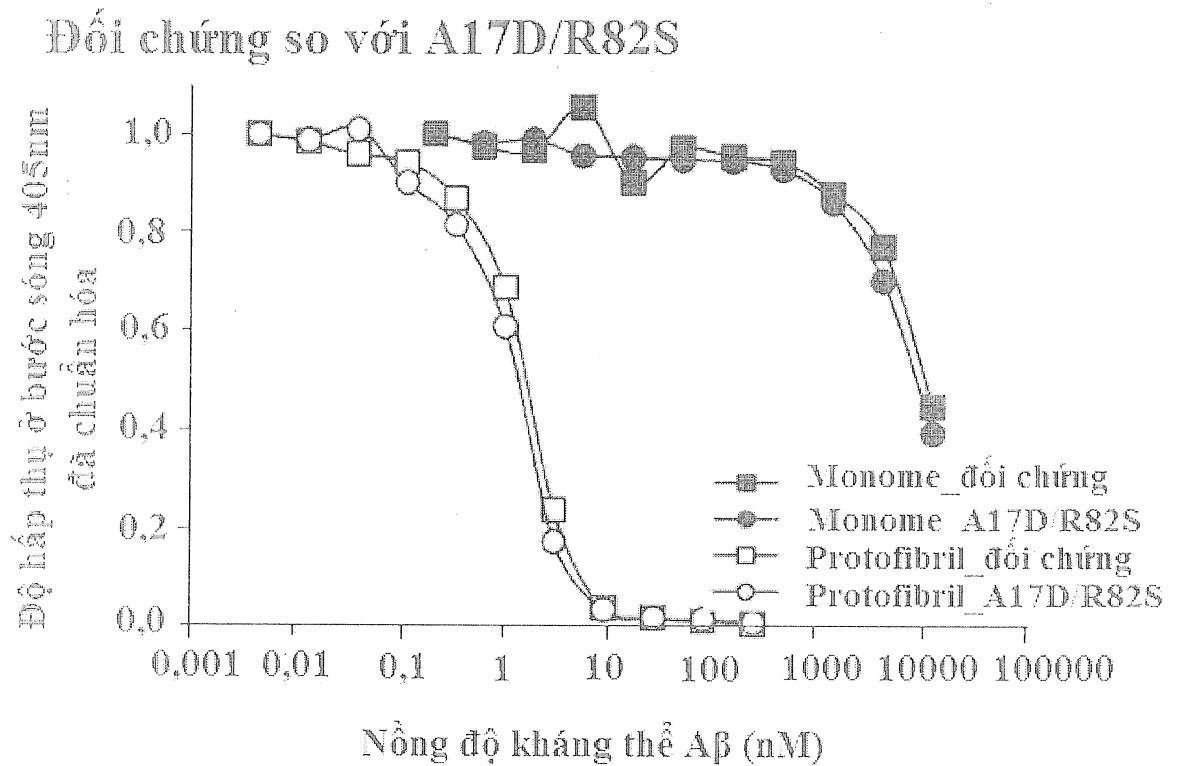
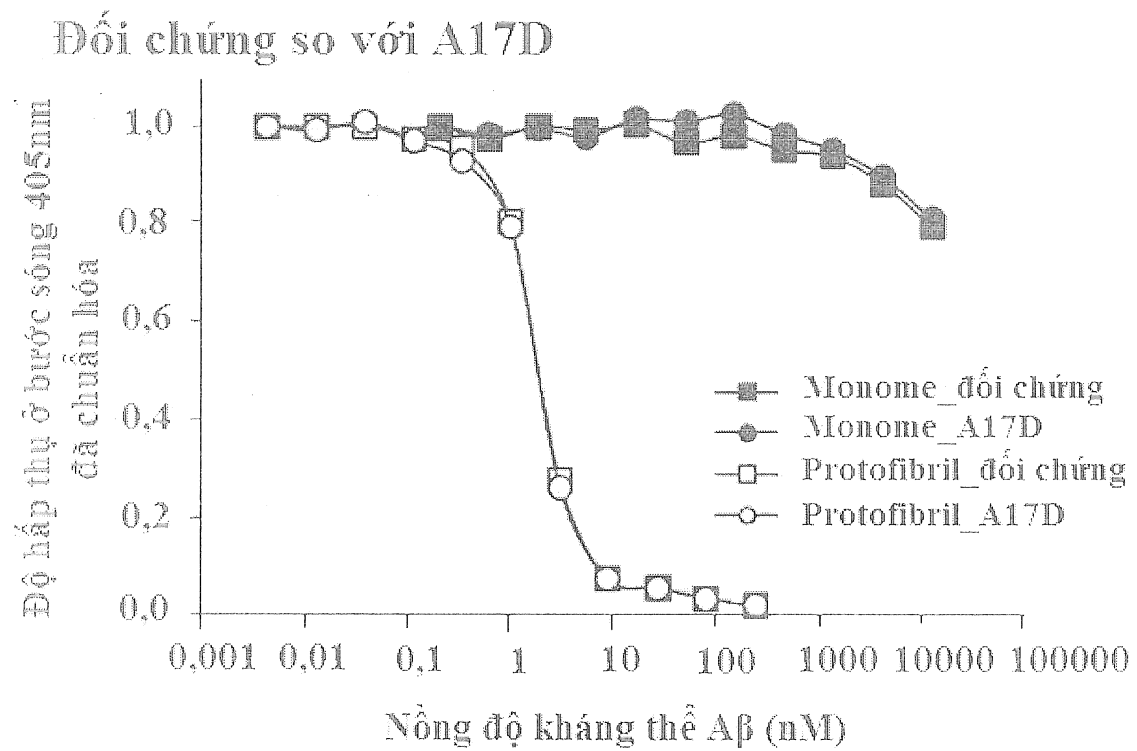


Fig.1

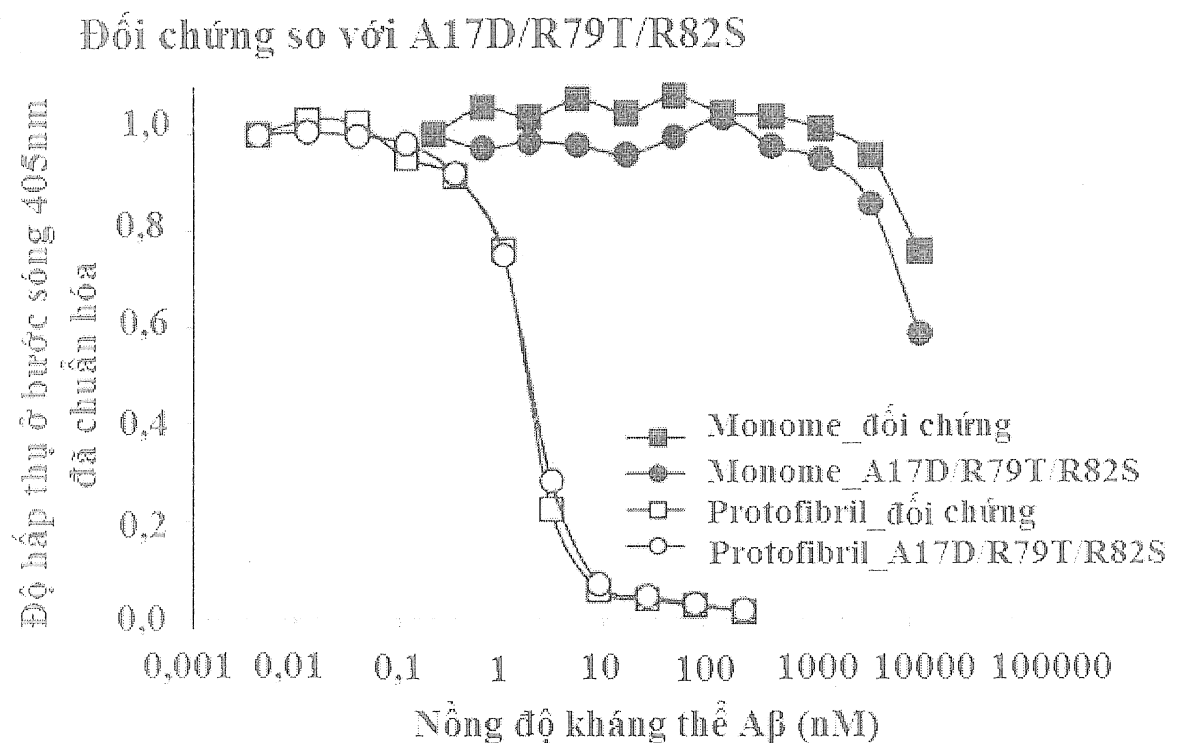
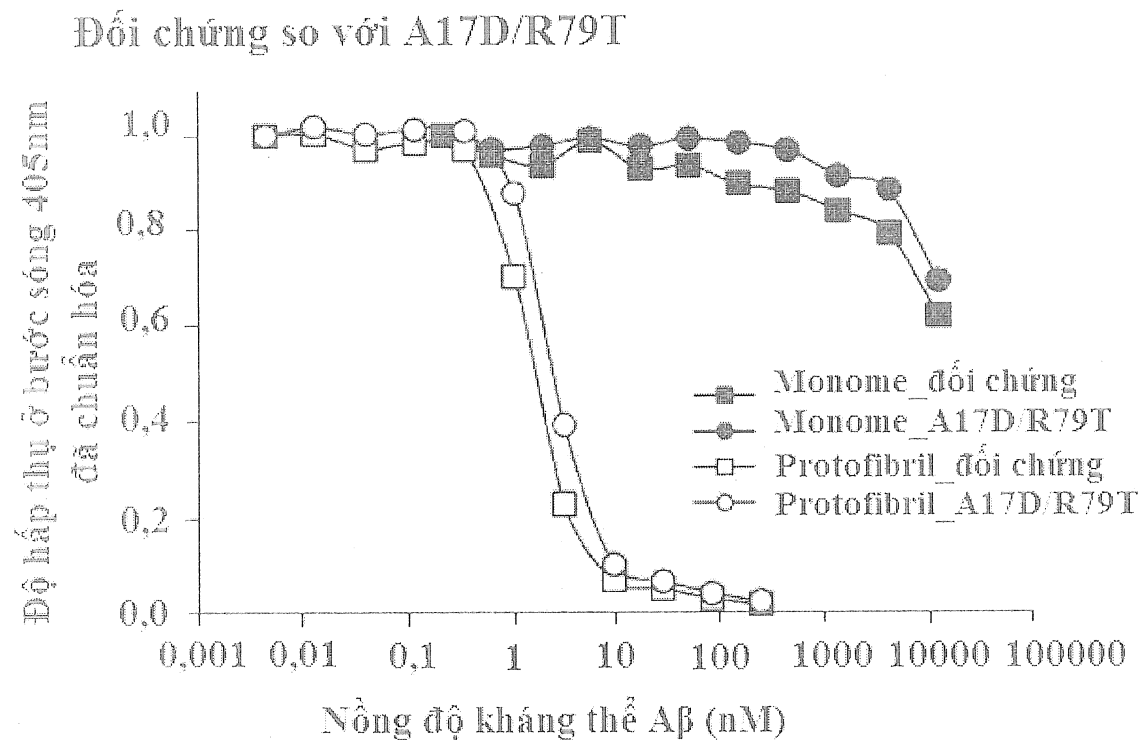


Fig.1 (tiếp theo)

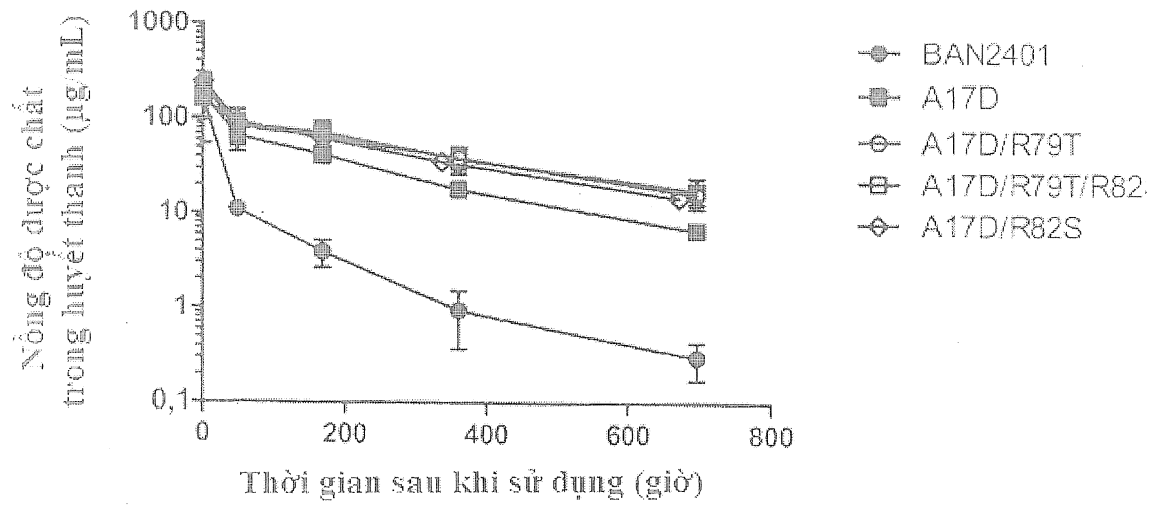


Fig. 2

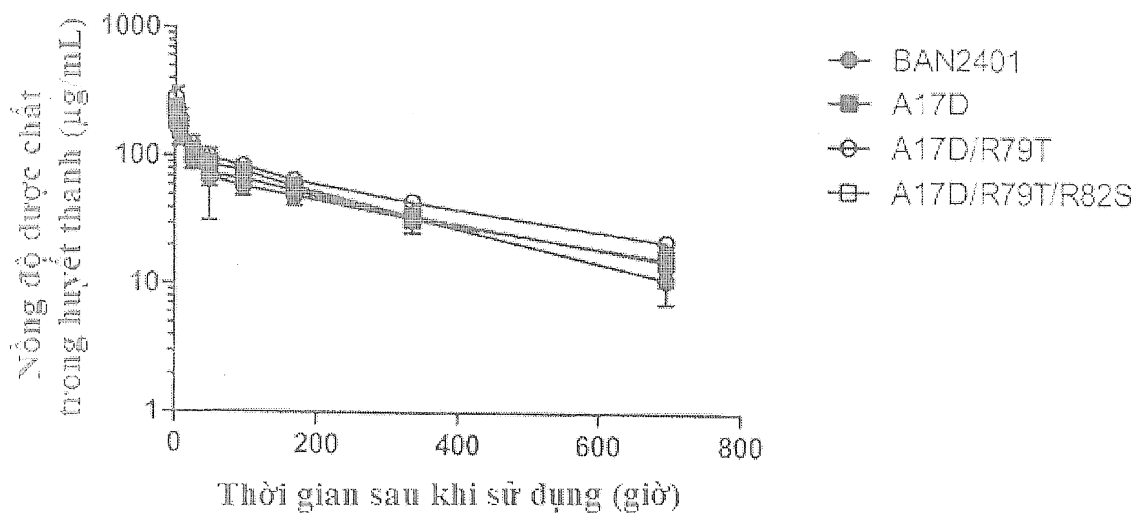


Fig. 3

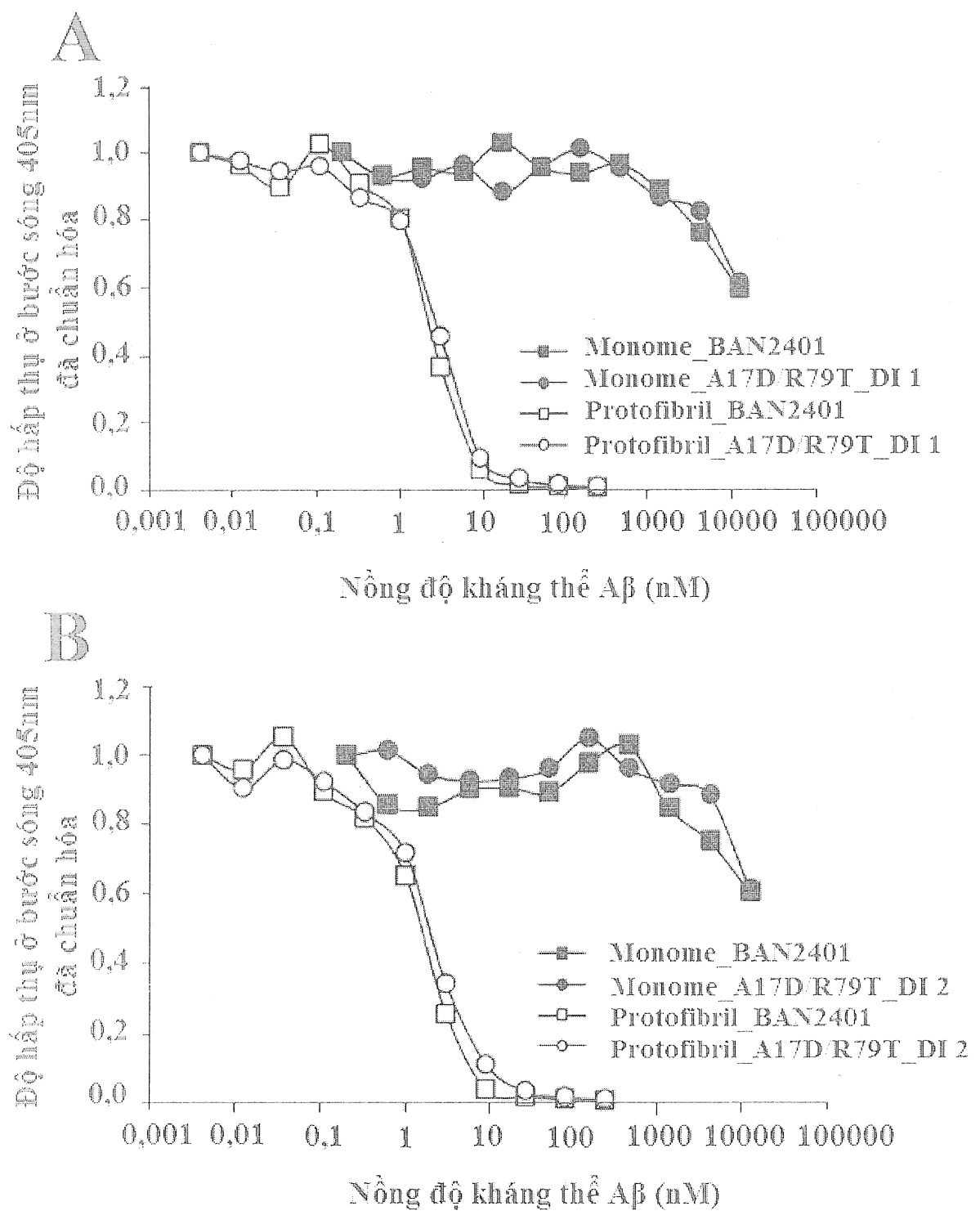


Fig.4

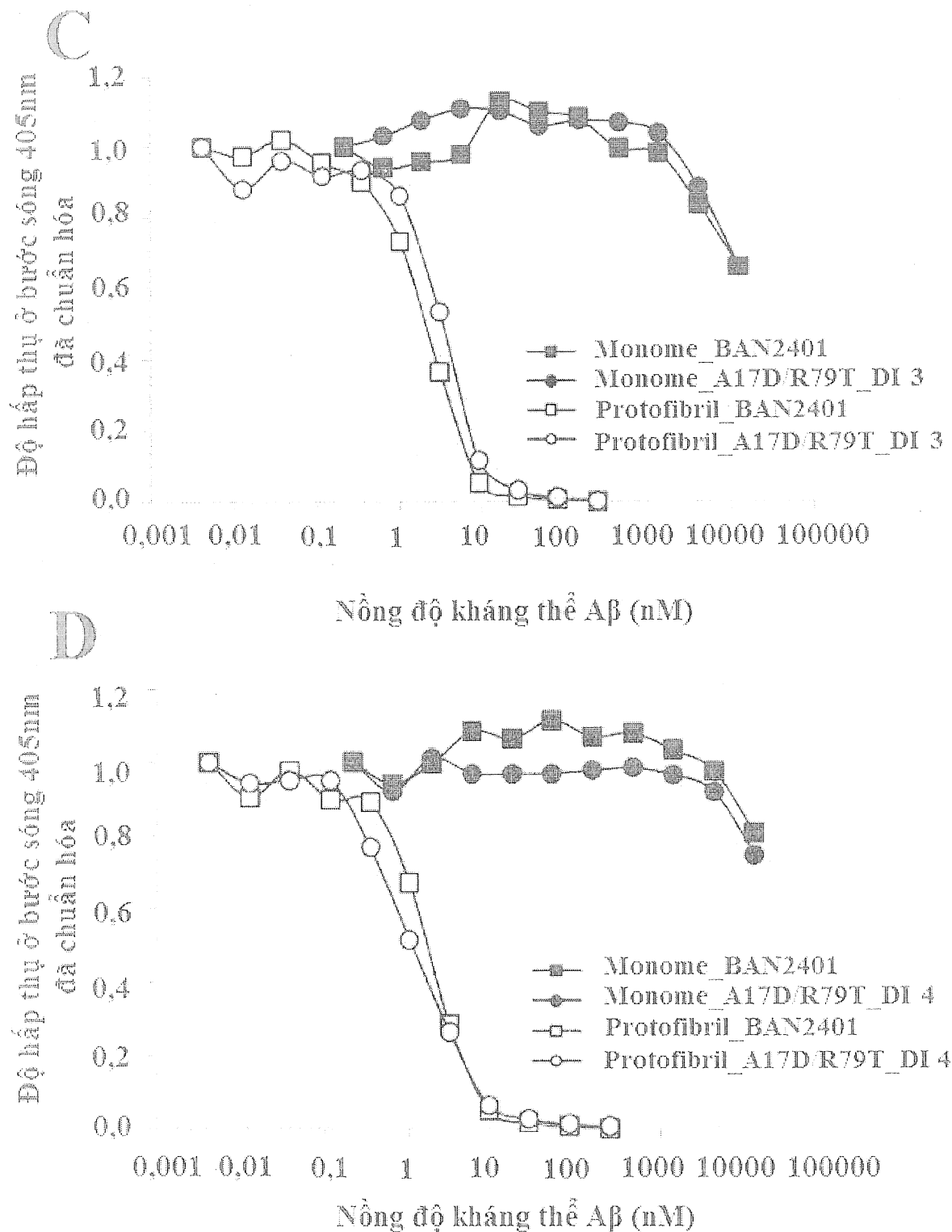


Fig.4 (tiếp theo)

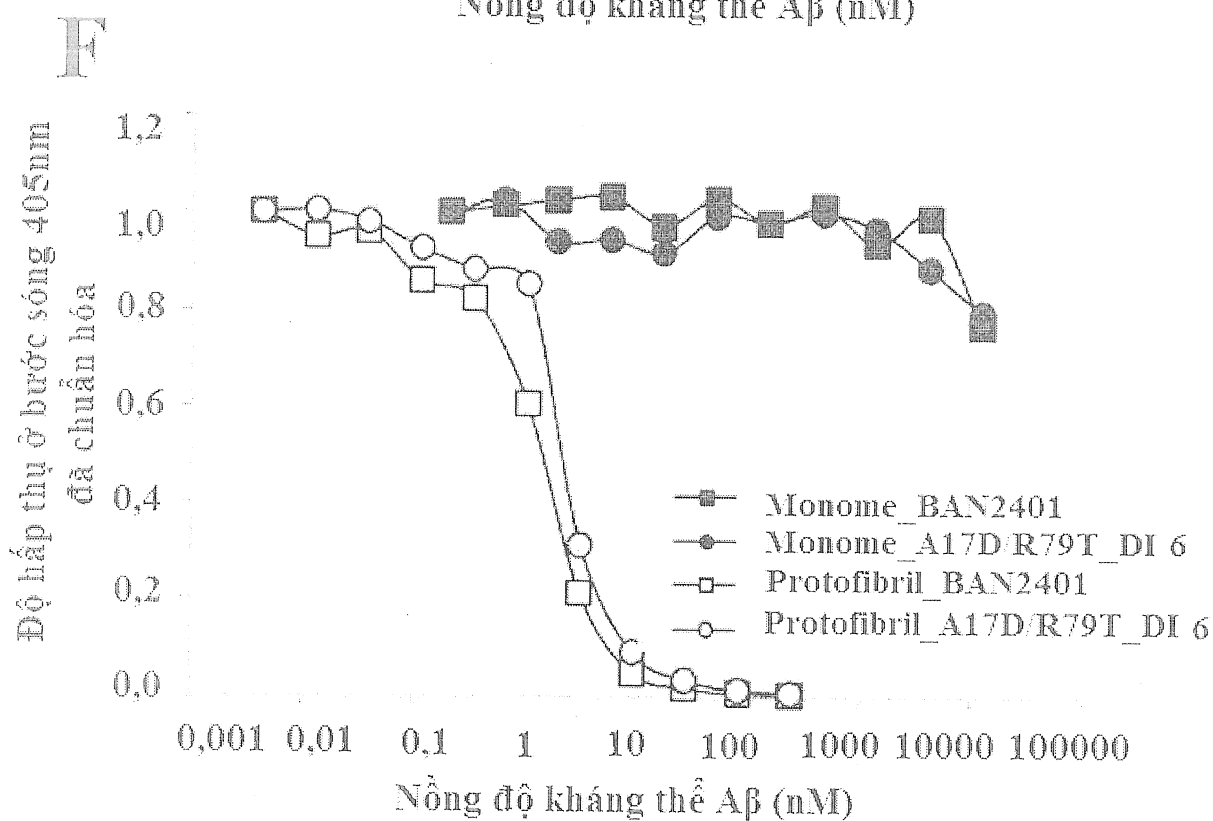
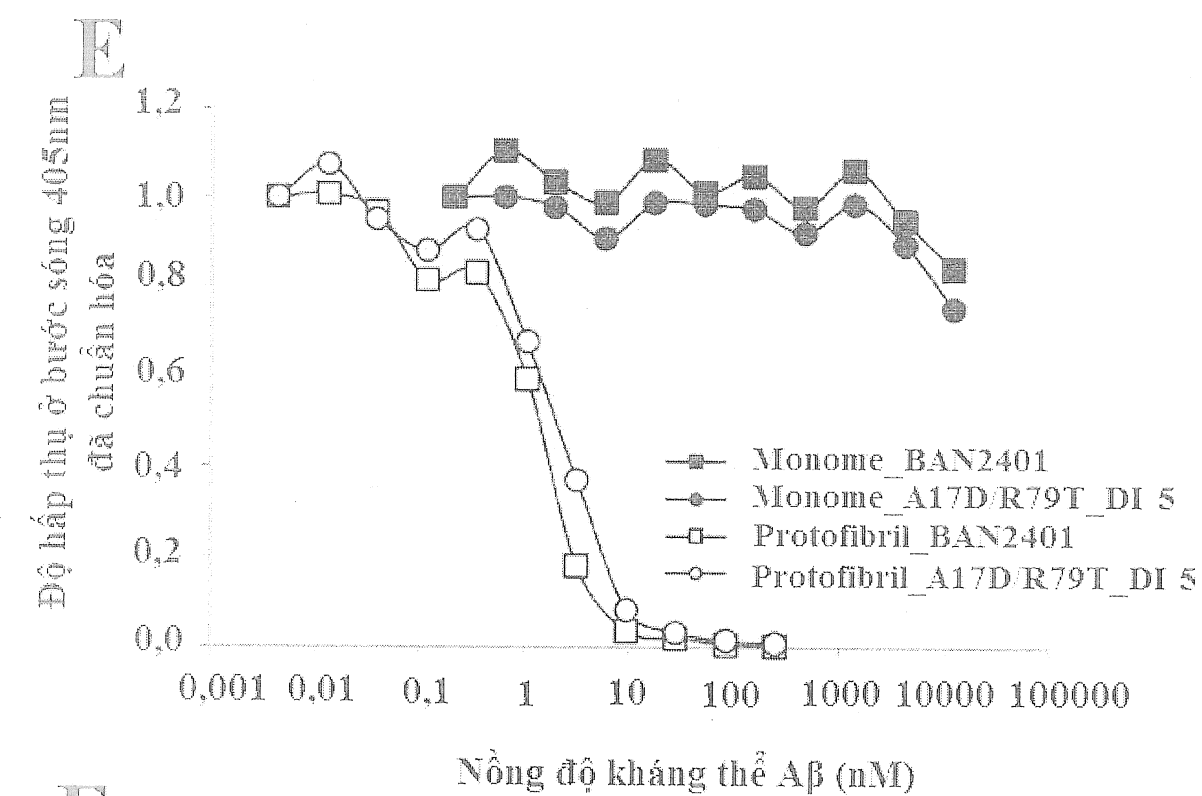


Fig.4 (tiếp theo)

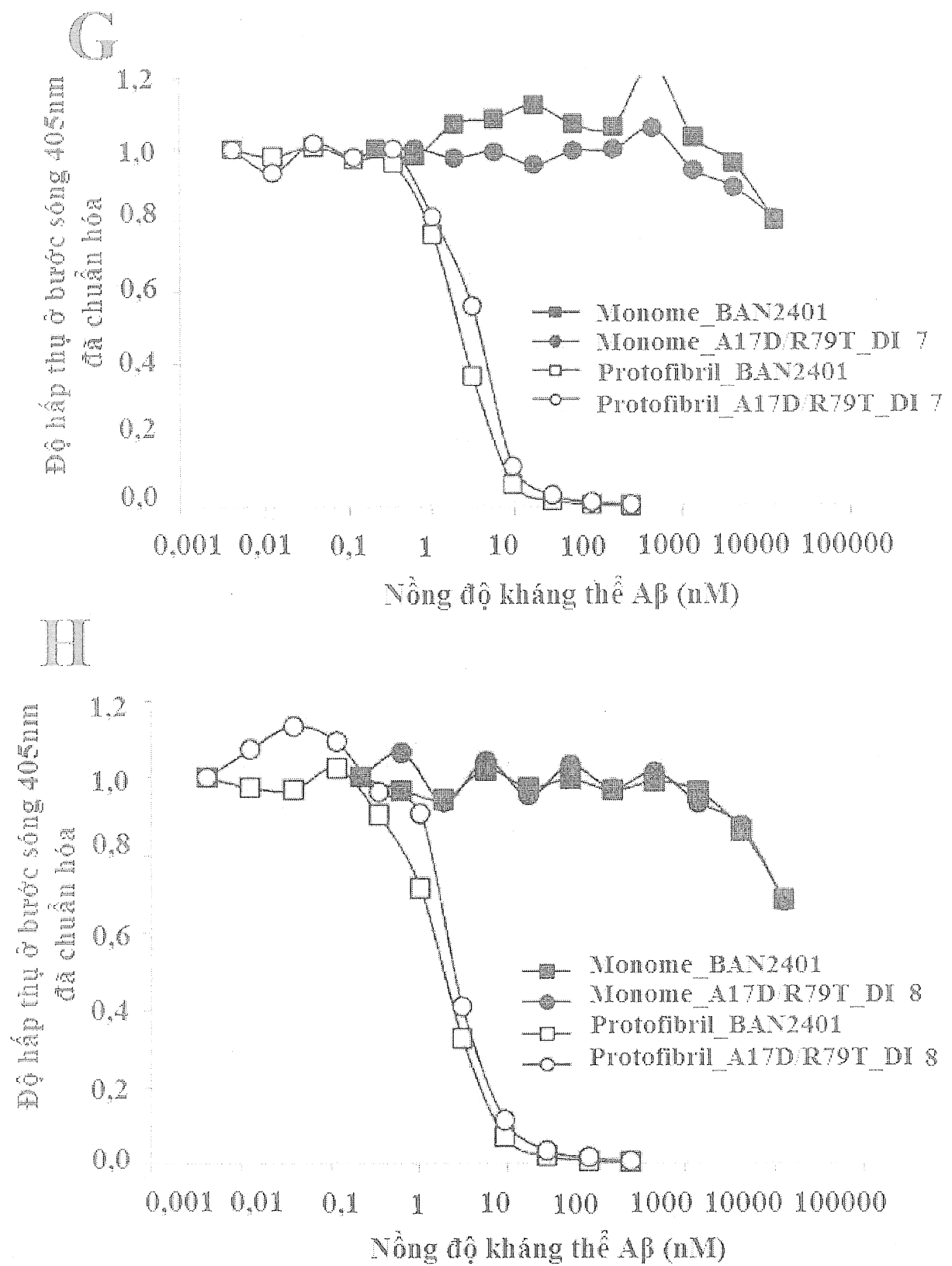


Fig.4 (tiếp theo)

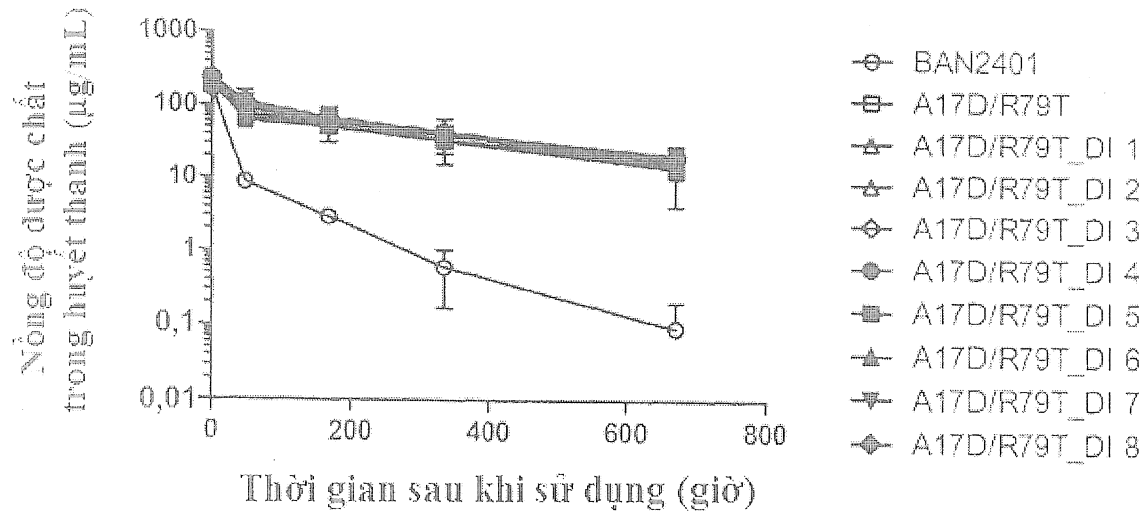


Fig.5

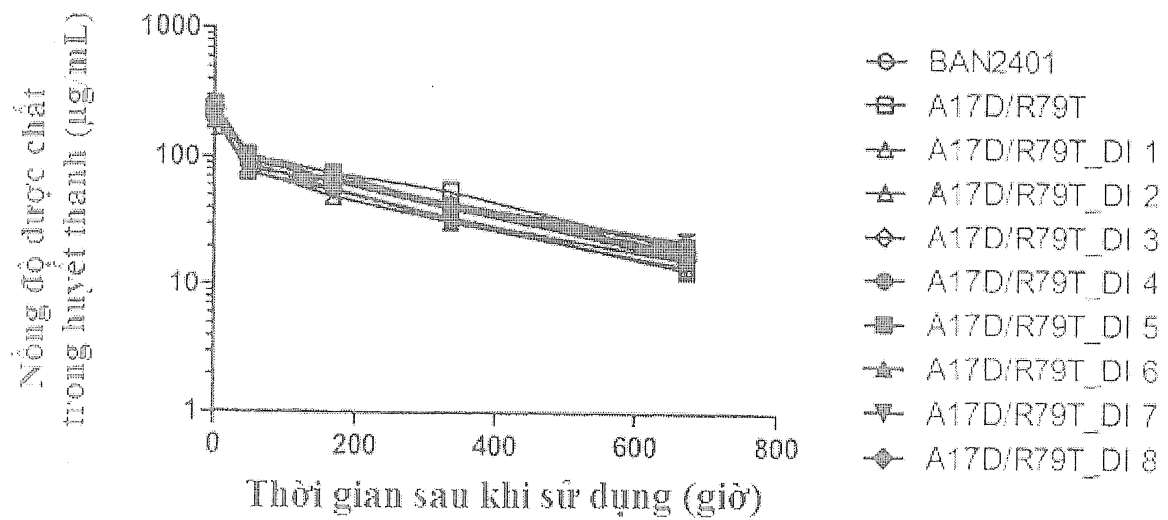


Fig.6

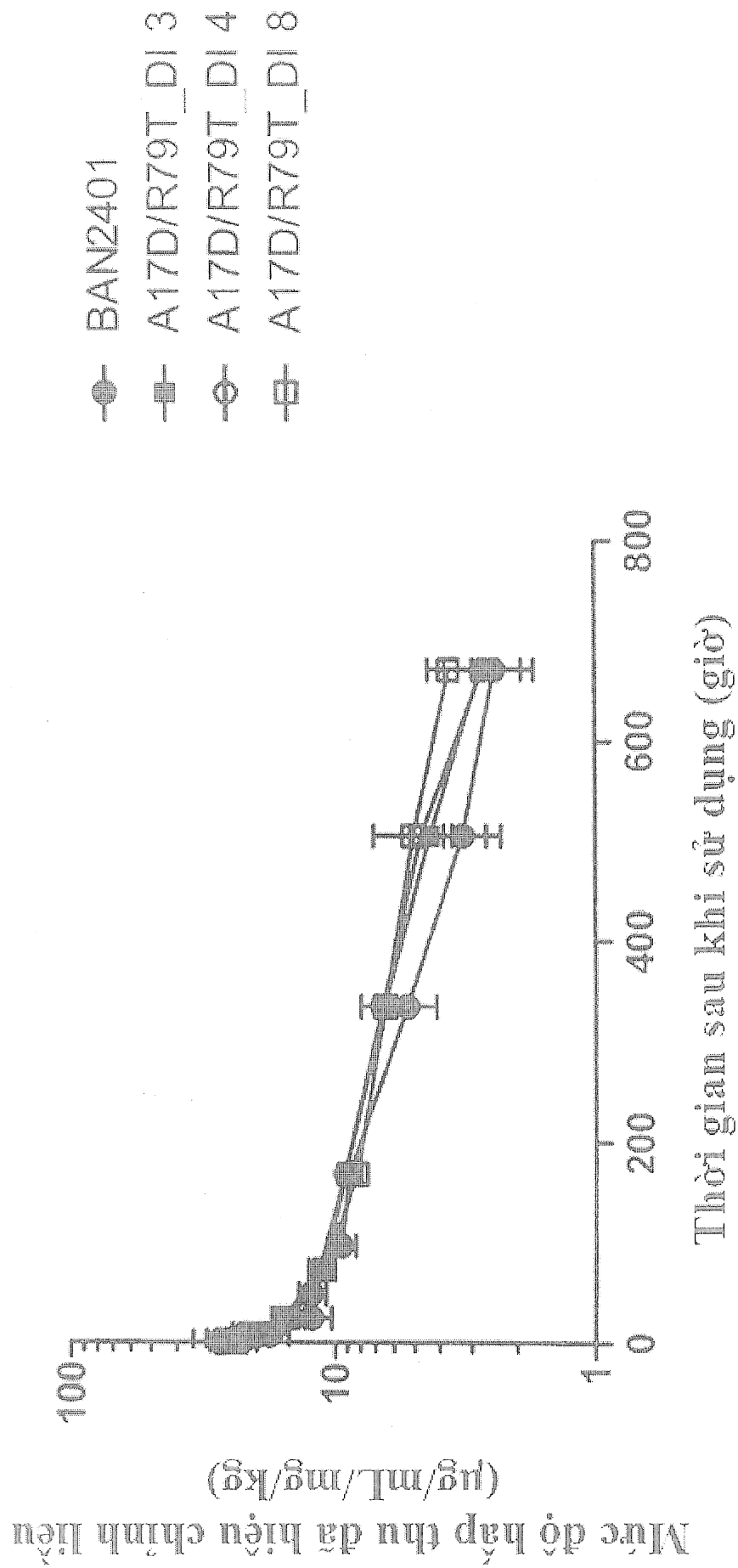


Fig.7

Trình tự axit amin

SEQ ID NO 1: SFGNH
 SEQ ID NO 2: YISGSSSTIY YGDTVKG
 SEQ ID NO 3: EGGVYGRSY YTM DY
 SEQ ID NO 4: RSSQSIVHSN GNTYLE
 SEQ ID NO 5: KVSRRFS
 SEQ ID NO 6: FQSHUPTT
 SEQ ID NO 7: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 8: DVMTQSPLS LPYTPGX,PAS YISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 9: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS VSCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 10: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS VSCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 11: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 12: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 13: EVQLVESGGG LVQPGSSLR L SCASAGTFS SFGHWVRCQ, PKGLEWVAY ISSGSSSTIY GDTVKGRFTI SRDIAKNSLF LQMSLEAED TAVYICAREG
 SEQ ID NO 14: EVQLVESGGG LVQPGSSLR L SCASAGTFS SFGHWVRCQ, PKGLEWVAY ISSGSSSTIY GDTVKGRFTI SRDIAKNSLF LQMSLEAED TAVYICAREG
 SEQ ID NO 15: EVQLVESGGG LVQPGSSLR L SCASAGTFS SFGHWVRCQ, PKGLEWVAY ISSGSSSTIY GDTVKGRFTI SRDIAKNSLF LQMSLEAED TAVYICAREG
 SEQ ID NO 16: EVQLVESGGG LVQPGSSLR L SCASAGTFS SFGHWVRCQ, PKGLEWVAY ISSGSSSTIY GDTVKGRFTI SRDIAKNSLF LQMSLEAED TAVYICAREG
 SEQ ID NO 17: EVQLVESGGG LVQPGSSLR L SCASAGTFS SFGHWVRCQ, PKGLEWVAY ISSGSSSTIY GDTVKGRFTI SRDIAKNSLF LQMSLEAED TAVYICAREG
 SEQ ID NO 18: EVQLVESGGG LVQPGSSLR L SCASAGTFS SFGHWVRCQ, PKGLEWVAY ISSGSSSTIY GDTVKGRFTI SRDIAKNSLF LQMSLEAED TAVYICAREG
 SEQ ID NO 19: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 20: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV

Fig.8

SEQ ID NO 21: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV
 SEQ ID NO 22: DVMTQSPLS LPVTPGDPAS ISCRSSQSIV HSNENTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNEF SGVPRFSGS GSGTDFTLRI SRVEAEDVGI YYCFQGSHPV

Fig.8 (tiếp theo)

SEQ ID NO 23: ASIKGPSVFP LAPSSKSTGS GTAAAGLIWK DYFPNPVIVS WNGSALTSGV HTFAVLQSS GLYSLSSVTV VESSLTQCT YICNVNHKES NTKVDRVVEP
 KSTKTHTCF PCAPDELLGS PSVFLPPPKP EDTLMISIEP EYTCVVWWS HEDUWKPNW YVGVVEVHNA KTKPREQYN STYKVSVELT VLBODBLAQK
 EYKQKVENKA LPAPLEKTIK KAKQPRERQ VYTLPPSRSE EYTKQVSLIC LVKGFYPSDI AVEMESNGQP ENNIKIIEPV LDDEGCTFLY SKLTJVDKSNW
 QGKVTSCSV MHEALNHIT QKSLSLSEK
 SEQ ID NO 24: RTVAPSVFI FPDDEOLKS STASVCLLN NPYPRERKQ KKVADNLOSG NQKSVTEQD SKDSTYSLSL TLTLKADYE KHKVACEVT KQGLSSPVTK
 SPNRGEC

Thưong giáp		7		8		9		10		11		12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
Đánh số vị trí																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Kabai		3	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
Thưong giáp																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Đánh số vị trí																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Đầu tiên công N		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
BAN2401		8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Không thể																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					

Fig.10 (tiếp theo)

Phương pháp đánh số vị trí Kabat	11	6	7	8	9	0	1	2	3
Phương pháp đánh số vị trí Gantzen cùng N	12	7	8	9	0	1	2	3	4
BAN2401		G	T	T	V	T	V	S	S
Xương thể theo sáng chế		G	T	T	V	T	V	S	S
I)		G	T	T	V	T	V	S	S
II)		G	T	T	V	T	V	S	S
III)		G	T	T	V	T	V	S	S
IV)		G	T	T	V	T	V	S	S

Fig.10 (tiếp theo)

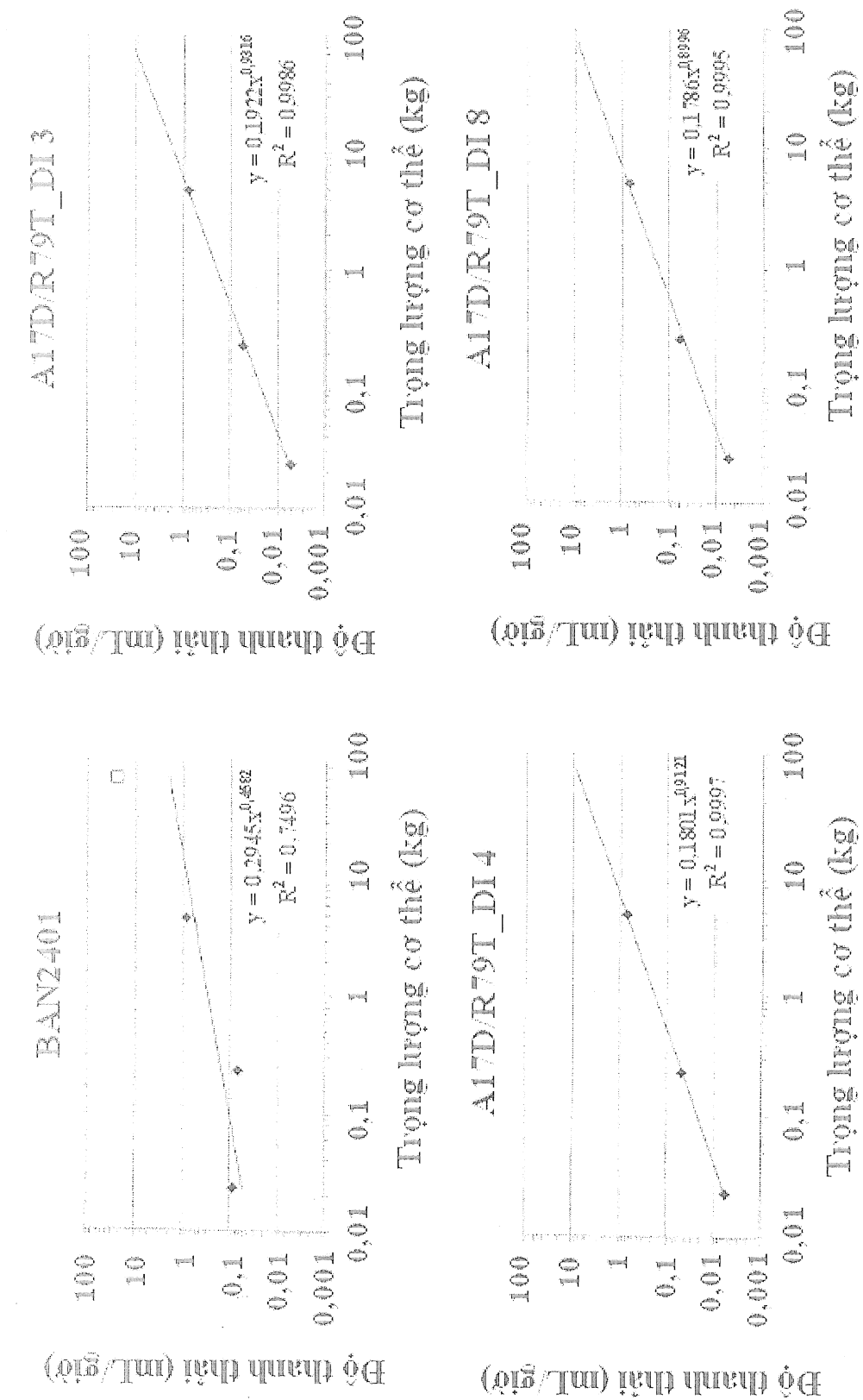


Fig.11

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB
 EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.
 <120> KHÁNG THỂ HOẶC MẠNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ CÓ ẮI LỰC GẮN KẾT VỚI PROTOFIBRIL A β , VÀ ĐƯỢC PHẠM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> P141879WO00
 <140> PCT
 <141> 2015-07-08
 <150> US 62/022952
 <151> 2014-07-10
 <160> 24
 <170> PatentIn version 3,5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <400> 1
 Ser Phe Gly Met His
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <400> 2
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <400> 3
 Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <400> 4
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hla Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <400> 5
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <400> 6
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
 <400> 7
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hla Ser

```

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

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (13)..(13)
<223> Xaa có thể là Val hoặc Ala
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (17)..(17)
<223> Xaa có thể là Ala, Asp, Glu, Gln hoặc chất tương tự chức năng của chúng
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (21)..(21)
<223> Xaa có thể là Ile hoặc Val
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (79)..(79)
<223> Xaa có thể là Arg, Thr, Lys, Ala, Gly hoặc chất tương tự chức năng của chúng
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (81)..(81)
<223> Xaa có thể là Ser hoặc Gln
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (82)..(82)
<223> Xaa có thể là Arg, Ser, Cys, Gly, Asn hoặc chất tương tự chức năng của chúng thereof
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (84)..(84)
<223> Xaa có thể là Glu hoặc Asp
<400> 8
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Xaa Thr Pro Gly
1      5      10      15
Xaa Pro Ala Ser Xaa Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hlà Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Lys 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 Xaa Ile
      65      70      75      80
Xaa Xaa Val Xaa Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105      110

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 9
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Asp Pro Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hlà Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Lys 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 Thr Ile
      65      70      75      80
Gln Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95

```



```

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105      110
<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 10
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Asp Pro Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hlà Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Lys 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 Thr Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Asp Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105      110
<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 11
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Ala Thr Pro Gly
1      5      10      15
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hlà Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Lys 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 Thr Ile
65      70      75      80
Gln Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105      110
<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 12
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Ala Thr Pro Gly
1      5      10      15
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hlà Ser
      20      25      30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Lys 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 Thr Ile
65      70      75      80
Ser Arg Val Asp Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85      90      95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100      105      110
<210> 13
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 13
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 Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
      20      25      30
Gly Met Hlà Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val

```

```

50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65          70          75          80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100        105        110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115        120

<210> 14
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (37)..(37)
<223> Xaa có thể là Val hoặc Ile
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (38)..(38)
<223> Xaa có thể là Arg hoặc Gln
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (40)..(40)
<223> Xaa có thể là Ala, Asn hoặc Thr
<400> 14
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 Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20        25        30
Gly Met Hlà Trp Xaa Xaa Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35        40        45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
50        55        60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65          70          75          80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100        105        110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115        120

<210> 15
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 15
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 Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20        25        30
Gly Met Hlà Trp Val Arg Gln Asn Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35        40        45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
50        55        60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65          70          75          80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
100        105        110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115        120

<210> 16
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 16
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 Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20        25        30
Gly Met Hlà Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

```

```

      35              40              45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
  50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
  65              70              75              80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
      100              105              110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115              120
<210> 17
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1              5              10              15
Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
      20              25              30
Gly Met Hlã Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
      65              70              75              80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
      100              105              110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115              120
<210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1              5              10              15
Ser Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
      20              25              30
Gly Met Hlã Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
      65              70              75              80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Arg Ser Tyr Tyr Thr Met Asp
      100              105              110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115              120
<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp
<400> 19
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1              5              10              15
Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Hlã Ser
      20              25              30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35              40              45
Pro Lys 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 Arg Ile
      65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85              90              95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100              105              110

```

<210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

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

```

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Hla Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Hla Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 330
 325
 <210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105