



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

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

(11)



1-0030528

(51)⁷ C07K 16/00; A61K 39/00

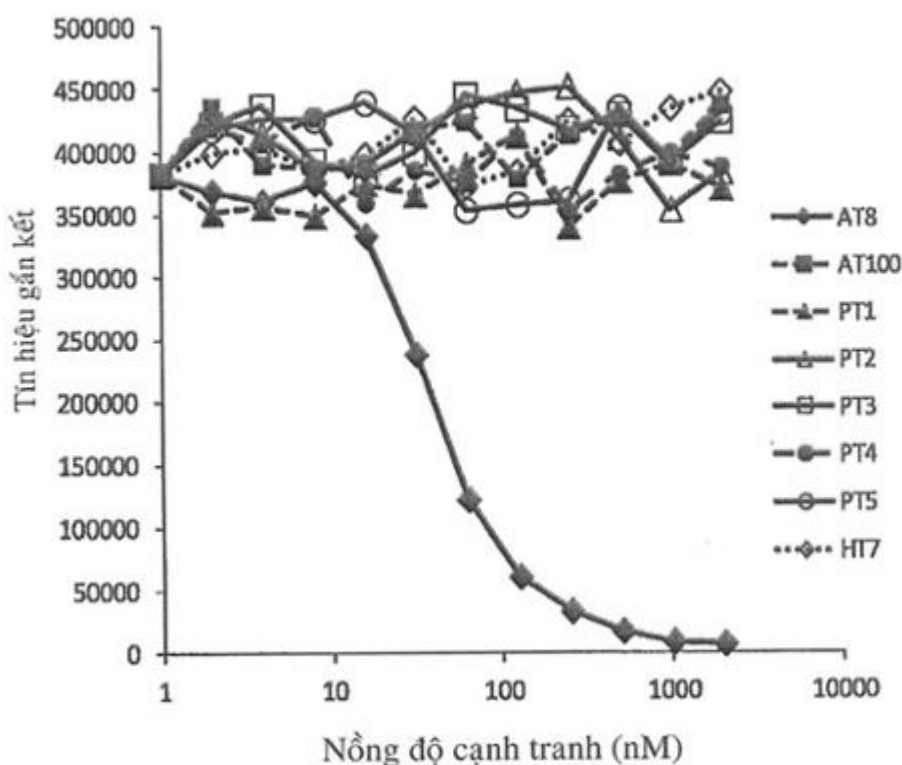
(13) B

- (21) 1-2014-02038 (22) 19/12/2012
(86) PCT/US2012/070486 19/12/2012 (87) WO 2013/096380 A3 27/06/2013
(30) 61/577,817 20/12/2011 US
(45) 25/12/2021 405 (43) 25/08/2014 317A
(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)
800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, USA
(72) ALDERFER, Christopher (US); JANECKI, Dariusz (US); LIU, Xuesong (US);
MURDOCK, Melissa (US); WU, Sheng-Jiun (US); MERCKEN, Marc (BE);
VANDERMEEREN, Marc (BE); MALIA, Thomas (US).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC GẮN KẾT PHF-TAU VÀ POLYNUCLEOTIT
MÃ HÓA VÙNG BIẾN ĐỔI CHUỖI NẶNG HOẶC VÙNG BIẾN ĐỔI CHUỖI
NHẸ CỦA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập được kháng PHF-tau và phương pháp tạo ra
kháng thể này. Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit phân lập được mã hóa vùng biến đổi
chuỗi nặng (VH) hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể này và vectơ bao gồm
polynucleotit đã nêu.

Sự cạnh tranh của AT8 được đánh dấu bởi các mAb khác nhau



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PHF-tau, và phương pháp tạo ra chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer (Alzheimer's Disease-AD) là rối loạn thoái hóa não được mô tả theo phương diện lâm sàng là chứng mất dần trí nhớ, nhận thức, lập luận, sự phán đoán và sự ổn định cảm xúc mà dần dần dẫn đến sự suy giảm sâu sắc tinh thần và cuối cùng dẫn đến cái chết. AD là nguyên nhân rất phổ biến gây suy giảm dần trí tuệ (sự sa sút trí tuệ) ở người lớn tuổi và được tin rằng là nguyên nhân y học phổ biến đứng thứ tư trong các nguyên nhân y học phổ biến nhất dẫn đến cái chết ở Mỹ. AD đã được theo dõi ở các nhóm không tôn giáo trên khắp thế giới và là vấn đề lớn về sức khỏe cộng đồng hiện tại và trong tương lai.

Não của bệnh nhân mắc AD có các thương tổn đặc trưng được gọi là các mảng lão suy (hoặc sự thoái hóa dạng bột), bệnh mạch máu thoái hóa dạng bột (cặn thoái hóa dạng bột trong các mạch máu) và các rối loạn sợi thần kinh. Rất nhiều thương tổn trong số các thương tổn này, cụ thể là các mảng lão suy và các rối loạn sợi thần kinh của các sợi xoắn đã ghép cặp, thường được phát hiện ở một vài vùng của não người mà quan trọng đối với trí nhớ và chức năng nhận thức ở các bệnh nhân mắc AD.

Thành phần protein chính của bệnh thoái hóa sợi thần kinh trong AD và một vài bệnh thoái hóa thần kinh khác là dạng đã được siêu phosphoryl hóa của protein tau được liên kết vi ống. Việc điều trị bệnh đang cải thiện ngăn ngừa hoặc làm sạch sự kết tụ tau đã được chú ý đến trong nhiều năm nhưng các dược chất được đề xuất, bao gồm các hợp chất kháng kết tụ và các chất ức chế kinaza, chỉ mới được đưa vào thử nghiệm lâm sàng (Brunden, và các đồng tác giả *Nat Rev Drug Discov* 8:783-93, 2009)

Ngày nay, dấu hiệu cận lâm sàng đã được tạo ra trong các mô hình tau chuyển gen của chuột mà sự gây miễn dịch chủ động và thụ động đối với tau có thể có tiềm năng điều trị bệnh (Chai, và các đồng tác giả *J Biol Chem* 286:34457-67, 2011, Boutajangout, và các đồng tác giả *J Neurochem* 118:658-67, 2011, Boutajangout, và các đồng tác giả *J Neurosci* 30:16559-66, 2010, Asuni, và các đồng tác giả *J Neurosci* 27:9115-29, 2007). Sự truyền bệnh do protein tau và giả thuyết lan truyền đã được mô tả và dựa trên các giai đoạn Braak của tiến trình bệnh do protein tau ở não người và sự lan truyền bệnh do protein tau sau khi tiêm kết tụ tau trong các mô hình tau cận lâm sàng (Frost, và các đồng tác giả *J Biol Chem* 284:12845-52, 2009, Clavaguera, và các đồng tác giả *Nat Cell Biol* 11:909-13, 2009). Do vậy, có một nhu cầu đối với việc điều trị bệnh để ngăn ngừa sự kết tụ tau và các tiến trình bệnh do protein tau để điều trị AD và các bệnh thoái hóa thần kinh khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 35 hoặc 37, và vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 36 hoặc 38.

Khía cạnh khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm một số vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Khía cạnh khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của VH có SEQ ID NO: 35 và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL có SEQ ID NO: 36.

Khía cạnh khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của VH có SEQ ID NO: 37 và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL có SEQ ID NO: 38.

Khía cạnh khác theo sáng chế là kháng thể hoặc đoạn được phân lập mà cạnh tranh để PHF-tau gắn kết với kháng thể đơn dòng bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của VH có SEQ ID NO: 35 và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL

có SEQ ID NO: 36, hoặc vị trí gắn kết kháng nguyên của VH có SEQ ID NO: 37 và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL có SEQ ID NO: 38.

Khía cạnh khác theo sáng chế là các polynucleotit mã hóa các kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn của nó.

Khía cạnh khác theo sáng chế là vector bao gồm các polynucleotit theo sáng chế.

Khía cạnh khác theo sáng chế là tế bào vật chủ bao gồm vector theo sáng chế.

Khía cạnh khác theo sáng chế là phương pháp tạo ra kháng thể mà gắn kết PHF-tau bao gồm nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế và thu hồi kháng thể được sản xuất bằng tế bào vật chủ.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự cạnh tranh của AT8 được đánh dấu bằng các kháng thể kháng tau khác nhau.

Fig.2 thể hiện sự cạnh tranh của PT1 được đánh dấu bằng các kháng thể kháng tau khác nhau.

Fig.3 thể hiện sự cạnh tranh của PT3 được đánh dấu bằng các kháng thể kháng tau khác nhau.

Fig.4 thể hiện sự cạnh tranh của AT100 được đánh dấu bằng các kháng thể kháng tau khác nhau.

Fig.5 thể hiện sự cạnh tranh của HT7 được đánh dấu bằng các kháng thể kháng tau khác nhau.

Fig.6 (A) thể hiện phân tích tau được phosphoryl hóa trong các thể đồng nhất thân não (đoạn P1) của các động vật cái chuyển gen P301L 5 tháng tuổi được điều trị bằng nước muối, IgG1, PT3 của chuột hoặc AT8 như được chỉ ra trong hình vẽ, hoặc từ các động vật không chuyển gen không được điều trị (B6). ELISA được thực hiện bằng cách sử dụng AT8 (đồ thị bên trái) hoặc AT100 (đồ thị bên phải) làm các kháng thể thu sau đó là HT7 được biotinyl hóa và avidin HRP. Các tín hiệu ELISA được tạo đồ thị làm lượng tương đối của thể đồng nhất não mắc AD (ng/ml) tạo ra cùng tín hiệu ELISA làm các mẫu trung bình từ động vật không

chuyển gen (B6). Dữ liệu được tạo đồ thị riêng rẽ cùng với trung bình $\pm$ S.D. Trị số p về sự chênh lệch giữa các động vật được điều trị bằng PT3 và IgG1 được chỉ ra. (B) Thẩm tách western của đoạn đồng nhất thân não P1 từ các động vật được điều trị bằng IgG1 hoặc PT3 bằng cách sử dụng AT100. Tín hiệu từ các thể đồng nhất của 10 động vật được điều trị bằng IgG1 (từ IgG1-1 đến IgG1-10) và 7 động vật được điều trị bằng PT3 (PT3-1, PT3-2, từ PT3-7 đến PT3-10) được thể hiện. Actin được sử dụng làm chất đối chứng nạp mẫu.

Fig.7 thể hiện tổng mức tau trong sarcosyl có thể hòa tan được (pT4 có thể hòa tan được), tổng tau trong các thể đồng nhất vỏ não không thể hòa tan được (pT4 không thể hòa tan được) và tau được phosphoryl hóa trong các thể đồng nhất vỏ não không thể hòa tan được (AT8 không thể hòa tan được) được lấy từ chuột cái chuyển gen P301L 5 tháng tuổi được điều trị bằng PT3 hoặc đối chứng lớp kháng thể (IgG) như được chỉ ra trong hình vẽ. Các mức được thể hiện làm phép đo tín hiệu từ ELISA được tạo đồ thị riêng rẽ cùng với trung bình $\pm$ SD. Mẫu 1m inj là mẫu đối chứng dương tính được lấy từ não chuột P301L được tiêm bằng chất kết tụ tau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “các kháng thể” như được sử dụng ở đây được hiểu theo nghĩa rộng và bao gồm globulin miễn dịch hoặc các phân tử kháng thể bao gồm các kháng thể đa dòng, các kháng thể đơn dòng bao gồm chuột, người, các kháng thể đơn dòng được làm thích nghi với người, nhân tính hóa và ghép và các đoạn kháng thể.

Nói chung, các kháng thể là protein hoặc chuỗi peptit mà có tính đặc hiệu gắn kết để gắn kết kháng nguyên cụ thể. Cấu trúc kháng thể là đã được biết rõ. Các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm lớp chính, cụ thể là IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, phụ thuộc vào trình tự axit amin của miền ổn định chuỗi nặng. IgA và IgG còn được phân lớp phụ làm các lớp kháng thể IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Các chuỗi nhẹ kháng thể của loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được chia thành một trong hai loại phân biệt rõ ràng, cụ thể là kapa (κ) và lamda (λ), dựa trên các trình tự axit amin của các miền ổn định của chúng.

Thuật ngữ “các đoạn kháng thể” có nghĩa là một phần của kháng thể nguyên vẹn. Các ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm đoạn Fab, Fab', F(ab')₂ và Fv, CDR, vị trí gắn kết kháng nguyên, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ, các kháng thể ghép, các phân tử kháng thể chuỗi đơn và các kháng thể đa hiệu được tạo ra từ ít nhất hai kháng thể nguyên vẹn hoặc đoạn của nó.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc nặng globulin miễn dịch bao gồm vùng “khung” bị đứt quãng bởi “các vị trí gắn kết kháng nguyên”. Các vị trí gắn kết kháng nguyên được xác định bằng cách sử dụng các thuật ngữ khác nhau như sau: (i) các vùng quyết định tính bổ trợ (Complementarity Determining Region-CDR) dựa trên tính biến đổi trình tự (Wu và Kabat *J Exp Med* 132:211-50, 1970). Nói chung, vị trí gắn kết kháng nguyên có ba CDR trong từng vùng biến đổi (HCDR1, HCDR2 và HCDR3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL)) (Kabat và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) Thuật ngữ “vùng siêu biến”, “HVR”, hoặc “HV” đề cập đến các vùng của miền biến đổi kháng thể mà là siêu biến về cấu trúc như được định nghĩa bởi Chothia và Lesk (Chothia and Lesk *J Mol Biol* 196:901-17, 1987). Nói chung, vị trí gắn kết kháng nguyên có ba vùng siêu biến trong từng VH (H1, H2, H3) và VL (L1, L2, L3). Chothia và Lesk đề cập đến HV được duy trì về mặt cấu trúc làm “các cấu trúc tiêu chuẩn”. Việc đánh số các hệ cũng như việc chú thích các CDR và HV đã được xem xét lại bởi Abhinandan và Martin (Abhinandan and Martin *Mol Immunol* 45:3832-9, 2008). (iii) Một định nghĩa khác về các vùng mà tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên được đưa ra bởi Lefranc (Lefranc, và các đồng tác giả *Dev Comp Immunol* 27:55-77, 2003) dựa trên sự so sánh các miền V từ các globulin miễn dịch và các thụ thể tế bào T. Cơ sở dữ liệu miễn dịch di truyền quốc tế (International ImMunoGeneTics-IMGT) (<http://www.imgt.org>) cung cấp việc đánh số theo tiêu chuẩn và định nghĩa về các vùng này. Sự phù hợp giữa các CDR, HV và phần mô tả IMGT được mô tả trong Lefranc và các đồng tác giả, *supra*. (iv) Vị trí gắn kết kháng nguyên cũng có thể được mô tả dựa trên cách sử dụng gốc xác định tính đặc hiệu (Specificity Determining Residue Usage-SDRU) (Almagro *J Mol Recognit* 17:132-43, 2004), mà các gốc xác định tính đặc hiệu (Specificity Determining Residue-

SDR), đề cập đến các phần axit amin còn lại của globulin miễn dịch mà được bao hàm trực tiếp trong tiếp xúc kháng nguyên.

“Khung” hoặc “trình tự khung” là các trình tự còn lại trong vùng biến đổi của kháng thể khác với các trình tự được xác định là các trình tự của vị trí gắn kết kháng nguyên. Do định nghĩa chính xác về vị trí gắn kết kháng nguyên có thể được xác định bằng các mô tả khác nhau như được mô tả trên đây, trình tự khung chính xác phụ thuộc vào định nghĩa về vị trí gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” (monoclonal antibody-mAb) như được sử dụng ở đây có nghĩa là kháng thể (hoặc đoạn kháng thể) thu được từ quần thể các kháng thể hầu như đồng nhất. Các kháng thể đơn dòng là đặc hiệu cao, thông thường trực tiếp kháng lại thể xác định kháng nguyên đơn.

Thuật ngữ "epitop" như được sử dụng ở đây có nghĩa là một phần của kháng nguyên mà gắn kết kháng thể một cách cụ thể. Các epitop thường bao gồm các nhóm bề mặt hoạt hóa (như phân cực, không phân cực hoặc kỵ nước) của các gốc như axit amin, axit amin được phosphoryl hóa hoặc chuỗi bên polysaccarit và có thể có các đặc tính về cấu trúc ba chiều cụ thể, cũng như là các đặc tính nạp cụ thể. Epitop có thể thẳng về mặt tự nhiên hoặc có thể là epitop đứt quãng, ví dụ, epitop thích hợp, được tạo thành bằng mối liên kết không gian giữa các axit amin không liền kề của kháng nguyên thay vì một loạt các axit amin thẳng hàng. Epitop thích hợp bao gồm các epitop thu được bằng cách gập kháng nguyên, mà các axit amin từ các phần khác nhau của trình tự thẳng của kháng nguyên trở thành ở trong trạng thái gần trong không gian 3 chiều.

Tau là protein có nhiều trong hệ thần kinh trung ương và ngoại vi có nhiều đồng dạng kháng thể khác nhau đã được biết rõ. Trong CNS người, tồn tại sáu đồng dạng kháng thể tau chính có kích cỡ nằm trong khoảng từ 352 đến 441 do cắt nối luân phiên (Hanger, và các đồng tác giả *Trends Mol Med* 15:112-9, 2009). Các đồng dạng kháng thể này khác nhau bằng việc bao gồm được điều hòa từ 0 đến 2 đoạn chèn đầu N, và 3 hoặc 4 đoạn lặp gắn kết vi ống được bố trí song song, và được gọi là 0N3R (SEQ ID NO: 1), 1N3R (SEQ ID NO: 2), 2N3R (SEQ ID NO: 3), 0N4R (SEQ ID NO: 4), 1N4R (SEQ ID NO: 5) và 2N4R (SEQ ID NO: 6). Thuật ngữ “tau đối chứng” như được sử dụng ở đây đề cập đến lớp kháng thể tau

có SEQ ID NO: 6 mà không có sự phosphoryl hóa và các biến đổi sau dịch mã khác.

Tau gắn kết các vi ống và điều hòa sự vận chuyển của các thành phần qua các tế bào, quá trình mà có thể được điều biến bằng cách phosphoryl hóa tau. Trong AD và các rối loạn liên quan, sự phosphoryl hóa bất thường của tau là thường thấy và được cho là có trước và/hoặc khởi đầu sự kết tụ của tau vào các vi sợi, được gọi là các sợi xoắn đã ghép cặp (paired helical filament-PHF). Thành phần chính của PHF là tau được siêu phosphoryl hóa. Thuật ngữ “sợi xoắn đã ghép cặp-tau” hoặc “PHF-tau” như được sử dụng ở đây đề cập đến các kết tụ tau đã được biết rõ trong các sợi xoắn đã ghép cặp. Hai vùng chính trong cấu trúc PHF là rõ ràng khi sử dụng kính hiển vi điện tử, vỏ mờ và sợi lõi; vỏ mờ nhạy với sự phân hủy protein và được định vị bên ngoài các sợi, và lõi kháng protease của các sợi tạo thành khung chính của các PHF (Wischik, và các đồng tác giả *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4884-8, 1988).

“Các kháng thể gắn kết PHF-tau” như được sử dụng ở đây đề cập đến các kháng thể gắn kết PHF-tau như được đánh giá trên thẩm tách western. Thông thường, kháng thể gắn kết với PHF-tau có thể được đánh giá sau khi nhuộm Coomassie khoảng 500ng PHF-tau sau 1 giờ được khóa cố định trong sữa bột không béo (nonfat dry milk-NFDM) TBS-T 5% (trọng lượng/thể tích), Tween-20 0,05%. Các kháng thể gắn kết PHF-tau tùy ý không gắn kết tau đối chứng (SEQ ID NO: 6) như được đo bằng thẩm tách western khi được thử nghiệm trong điều kiện nạp kháng nguyên mà cả tau đối chứng và PHF-tau đều được phát hiện bằng nhau bằng các kháng thể tau mà không có sự ưu tiên nào đối với các epitop PHF-tau (ví dụ, kháng thể HT7, (ThermoScientific, Rockford, IL) (Mercken, và các đồng tác giả *J Neurochem* 58:548-53, 1992). Các điều kiện nạp mẫu kháng nguyên mẫu như vậy là 500ng PHF-tau và 200ng tau đối chứng.

Mã axit amin một và ba chữ cái đã được biết rõ thông thường được sử dụng ở đây.

Các chế phẩm của các chất

Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng PHF-tau và phương pháp tạo ra các kháng thể này. Các kháng thể kháng PHF-tau này có thể có các tính chất gắn kết epitop được phosphoryl hóa trên PHF-tau hoặc gắn kết với epitop không phải epitop được phosphoryl hóa trên PHF-tau. Các kháng thể kháng PHF-tau có thể hữu dụng để điều trị bệnh, và để nghiên cứu hoặc làm các chất phản ứng chẩn đoán để dò tìm PHF-tau trong các mẫu sinh học, ví dụ, trong mô hoặc tế bào.

Một phương án theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 35 hoặc 37, hoặc vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 36 hoặc 38. Bảng 1 thể hiện các gốc vị trí gắn kết kháng nguyên của các kháng thể mẫu theo sáng chế được xác định theo Kabat hoặc Chothia cũng như vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ mẫu.

Trong một phương án khác, vị trí gắn kết kháng nguyên của VH của các kháng thể theo sáng chế bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) và 3 (HCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 7, 8 và 9 hoặc 13, 14 và 15, hoặc vị trí gắn kết kháng nguyên của VL của các kháng thể theo sáng chế bao gồm CDR 1 của chuỗi nhẹ (LCDR1), 2 (LCDR2) và 3 (LCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 10, 11 và 12 hoặc 16, 17 và 18.

Một phương án khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 35 hoặc 37, và vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 36 hoặc 38.

Trong một phương án khác, vị trí gắn kết kháng nguyên của VH của các kháng thể theo sáng chế bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) và 3 (HCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 7, 8 và 9 hoặc 13, 14 và 15, và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL của các kháng thể theo sáng chế bao gồm CDR của chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) và 3 (LCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 10, 11 và 12 hoặc 16, 17 và 18.

Bảng 1.

Tên trình tự	Số	Trình tự
PT1 HCDR1, Kabat	7	SSWMG
PT1 HCDR2, Kabat	8	DILPGSGGTNYNERFKG
PT1 HCDR3, Kabat	9	SYDYDRFAN
PT1 LCDR1, Kabat	10	RSSESLHSNGNTLY
PT1 LCDR2, Kabat	11	RMSNLAS
PT1 LCDR3, Kabat	12	MQLEYPLT
PT3 HCDR1, Kabat	13	SYAMS
PT3 HCDR2, Kabat	14	SISKGGNTYYPNSVKG
PT3 HCDR3, Kabat	15	GWGDYGWFA
PT3 LCDR1, Kabat	16	KASQDINRYLN
PT3 LCDR2, Kabat	17	RANRLLD
PT3 LCDR3, Kabat	18	LQYDEFPLT
PT1 HCDR1, Chothia	19	GYTFSSS
PT1 HCDR2, Chothia	20	LPGSGG
PT1 HCDR3, Chothia	21	SYDYDRFA
PT1 LCDR1, Chothia	22	SESLHSNGNTY
PT1 LCDR2, Chothia	23	RMS
PT1 LCDR3, Chothia	24	YLEYPL
PT3 HCDR1, Chothia	25	GFTFSSY
PT3 HCDR2, Chothia	26	SKGGN
PT3 HCDR3, Chothia	27	GWGDYGWFA
PT3 LCDR1, Chothia	28	SQDINRY
PT3 LCDR2, Chothia	29	RAN
PT3 LCDR3, Chothia	30	YDEFPL
PT1 VH	35	QVQLQQSGTELMKPGASVKISCKATGYTFSSSWMGWVKRPGHG LEWIGDILPGSGGTNYNERFKGKASFTAETSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYYCVRSYDYDRFANWGQGLVTVSA
PT1 VL	36	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSESLHSNGNTLYWFLRPGQ SPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGGTAFTRISRVEAEDVGVYYCM QYLEYPLTFGAGTKLELK
PT3 VH	37	EVKLVESGGDLVKPGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQNPKEKRL WVASISKGGNTYYPNSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTALYY CARGWGDYGWFAWGQGLVTVSA
PT3 VL	38	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLNWFQKPGKSPKTL IYRANRLLDGVPSRFSGSGGQDYSLTISLSDYEDMGIIYYCLQYDEFP LTFGDGTKLELK

Mặc dù các phương án được minh họa trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế bao gồm các cặp vùng biến đổi, một từ chuỗi nặng và một từ chuỗi nhẹ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành sẽ nhận thấy rằng các phương án thay thế có thể bao gồm các vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ đơn. Vùng biến đổi đơn có thể được sử dụng để sàng lọc các miền khác nhau có khả năng tạo ra đoạn gắn kết kháng nguyên đặc hiệu của hai miền có khả năng, ví dụ, gắn kết với PHF-tau. Việc sàng lọc có thể được hoàn thành bằng các phương pháp

sàng lọc hiển thị thực khuẩn thể bằng cách sử dụng, ví dụ, sự tiếp cận tổ hợp kép phân tầng được bộc lộ trong công bố PCT số WO92/01047. Trong việc tiếp cận này, cụm khuẩn riêng rẽ chứa dòng chuỗi H hoặc L được sử dụng để lây nhiễm toàn bộ thư viện dòng mã hóa chuỗi còn lại (L hoặc H), và miền gắn kết kháng nguyên đặc hiệu hai chuỗi thu được được chọn tương ứng với các kỹ thuật hiển thị thực khuẩn thể như được mô tả.

Một phương án khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 35 và vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 36.

Một phương án khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 37 và vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 38.

Một phương án khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ của chuỗi nặng (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) và 3 (HCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 7, 8 và 9, và các CDR của chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) và 3 (LCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 10, 11 và 12.

Một phương án khác theo sáng chế là kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau bao gồm các vùng quyết định tính bổ trợ của chuỗi nặng (CDR) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) và 3 (HCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 13, 14 và 15, và chuỗi nhẹ CDR 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) và 3 (LCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 16, 17 và 18.

Trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể được phân lập mà gắn kết PHF-tau có thể được nhân tính hóa.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, ví dụ bằng phương pháp tế bào lai (Kohler and Milstein *Nature* 256:495-7, 1975). Các mAb ghép chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thu được từ kháng thể cho (chuột thông thường) liên quan đến các chuỗi ổn định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng

thu được từ kháng thể thụ thể (loài động vật có vú thông thường khác như người) có thể được điều chế bằng phương pháp được bộc lộ trong Patent Mỹ số US 4816567. mAb đã được ghép CDR có các CDR thu được từ globulin miễn dịch cho không phải ở người (chuột thông thường) và các phần thu được globulin miễn dịch còn lại của phân tử thu được từ một hoặc nhiều globulin miễn dịch ở người có thể được điều chế bằng các kỹ thuật đã được biết bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành như được bộc lộ trong Patent Mỹ số US 5225539. Các mAb hoàn chỉnh ở người thiếu trình tự không phải người bất kỳ có thể được điều chế từ chuột chuyển gen globulin miễn dịch ở người bằng các kỹ thuật được tham khảo trong (Lonberg, và các đồng tác giả *Nature* 368:856-9, 1994, Fishwild, và các đồng tác giả *Nat Biotechnol* 14:845-51, 1996, Mendez, và các đồng tác giả *Nat Genet* 15:146-56, 1997). Các mAb ở người cũng có thể được điều chế và tối ưu hóa từ các thư viện hiển thị thực khuẩn thể (Knappik, và các đồng tác giả *J Mol Biol* 296:57-86, 2000, Krebs, và các đồng tác giả *J Immunol Methods* 254:67-84, 2001, Shi, và các đồng tác giả *J Mol Biol* 397:385-96, 2010).

Việc nhân tính hóa kháng thể có thể được hoàn thành bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ, như tái tạo bề mặt các gốc xác định tính đặc hiệu (specificity determining residues resurfacing-SDRR) (công bố patent US số 2010/0261620), tái tạo bề mặt (Padlan và các đồng tác giả *Mol. Immunol.* 28:489-98, 1991), siêu nhân tính hóa (Công bố patent quốc tế số WO04/006955) và tối ưu hóa hàm lượng chuỗi ở người (Patent Mỹ số US 7,657,380). Các trình tự khung ở người hữu ích trong việc ghép/nhân tính hóa có thể được chọn từ các cơ sở dữ liệu có liên quan bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành. Các khung được chọn còn có thể được biến đổi để bảo toàn hoặc tăng cường ái lực gắn kết bằng các kỹ thuật như các kỹ thuật được bộc lộ trong Queen và các đồng tác giả (Queen, và các đồng tác giả *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:10029-33, 1989) hoặc trong công bố patent US số 2011/0092372.

Việc điều chế PHF-tau để sử dụng làm kháng nguyên để miễn dịch hóa hoặc phân lập các kháng thể từ các thư viện hiển thị thực khuẩn thể có thể được tiến hành bằng cách sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ. Trong phương pháp mẫu, PHF-tau được phân lập từ não của bệnh nhân mắc AD bằng cách sử dụng các quy trình

đã được biết rõ, như được mô tả trong tài liệu của Greenberg và Davies (Greenberg and Davies *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5827-31, 1990). PHF-tau có thể được phân lập từ vỏ não sau khi chết của bệnh nhân mắc Alzheimer. PHF-tau phân lập được này được mô tả đặc điểm về tình trạng độ tinh khiết và sự siêu phosphoryl hóa của nó bằng các kháng thể đã được biết để phản ứng với PHF-tau. Trong việc điều chế PHF-tau cụ thể, các dải được siêu phosphoryl hóa mà di cư ở khoảng 60, 64, 68 và 72kDa trong thẩm tách western (Spillantini and Goedert *Trends Neurosci* 21:428-33, 1998) được dò tìm bằng kháng thể AT8 mà gắn kết đặc hiệu với PHF-tau được siêu phosphoryl hóa mà không phải là PHF-tau được khử phosphoryl hóa.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có các đặc tính gồm không gắn kết tau đối chứng có SEQ ID NO: 6. Các kháng thể này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trên đây và thử nghiệm các kháng thể về sự thiếu gắn kết của chúng với tau đối chứng trong thẩm tách western, sau đó là thuốc nhuộm Coomassie như được mô tả trên đây. Tau đối chứng có thể được biểu hiện và tinh chế tái tổ hợp bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Các kháng thể mẫu gắn kết PHF-tau mà không gắn kết tau đối chứng là các kháng thể PT1 và PT3. Các kháng thể theo sáng chế còn có thể được đánh giá về tính đặc hiệu của chúng, ví dụ, bằng cách sử dụng hóa học mô miễn dịch trên các lát đối chứng và lát não mắc AD.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có ái lực về phía PHF-tau với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} hoặc 10^{-12} M. Ái lực của phân tử này đối với PHF-tau có thể được xác định bằng thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. Các phương pháp này có thể sử dụng dụng cụ Biacore, ProteOn hoặc KinExA, ELISA hoặc các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh đã được biết bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành.

Khía cạnh khác theo sáng chế là kháng thể hoặc đoạn được phân lập mà cạnh tranh để PHF-tau gắn kết với kháng thể đơn dòng bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 35 và vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 36, hoặc vị trí

gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 37 và vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 38.

Sự cạnh tranh giữa việc gắn kết với PHF-tau có thể được thử nghiệm *in vitro* bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ. Ví dụ, việc gắn kết của kháng thể được đánh dấu bằng este của MSD Sulfo-Tag™ NHS với PHF-tau trong sự có mặt của kháng thể không đánh dấu có thể được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch, sau đó là phát hiện phát quang điện hóa.

Một vài phương pháp luận đã được biết rõ ngoài việc gắn kết cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định epitop gắn kết của các kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, khi các cấu trúc của hai thành phần riêng rẽ đã được biết, điểm nối protein-protein *in silico* có thể được tiến hành để nhận diện các vị trí tương tác tương thích. Việc trao đổi hydro-đơteri (H/D) có thể được tiến hành với phức hợp kháng nguyên và kháng thể để vạch ra các vùng trên kháng nguyên mà có thể được gắn kết bằng kháng thể. Sự phát sinh đột biến đoạn và điểm kháng nguyên có thể được sử dụng để định vị các axit amin quan trọng trong việc gắn kết kháng thể. Cấu trúc đồng tinh thể của phức hợp kháng thể-kháng nguyên được sử dụng để nhận diện các góc cấu thành epitop và paratop.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể đơn dòng của các lớp kháng thể IgG, IgD, IgA hoặc IgM. Các kháng thể theo sáng chế có thể là đặc hiệu kép hoặc đa hiệu. Kháng thể đặc hiệu kép mẫu có thể gắn kết hai epitop riêng biệt trên PHF-tau hoặc có thể gắn kết PHF-tau và dạng bột beta (A β). Một kháng thể đặc hiệu kép mẫu khác có thể gắn kết PHF-tau và thụ thể xuyên bào qua hàng rào máu não nội sinh như thụ thể insulin, thụ thể chuyển hóa, thụ thể của yếu tố tăng trưởng 1 dạng insulin, và thụ thể lipoprotein. Kháng thể mẫu là dạng IgG1.

Các tính chất tác động miễn dịch của các kháng thể theo sáng chế có thể được tăng cường hoặc làm giảm thông qua các biến đổi Fc bằng các kỹ thuật đã được biết bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành. Ví dụ, các chức năng tác động Fc như gắn kết C1q, độc tố tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity-CDC), độc tố tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-ADCC), thực bào, sự điều tiết về phía sau của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào

B; BCR), v.v. có thể được tạo ra và/hoặc đối chứng bằng cách biến đổi các gốc trong Fc chịu trách nhiệm về các hoạt động này. Các tính chất được động học cũng có thể được tăng cường bằng cách làm đột biến các gốc trong miền Fc mà kéo dài chu kỳ sống của kháng thể (Strohl *Curr Opin Biotechnol* 20:685-91, 2009).

Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế có thể được biến đổi sau dịch mã bằng các quá trình như glycosyl hóa, đồng phân hóa, khử glycosyl hóa hoặc biến đổi đồng hóa trị xảy ra không tự nhiên như việc bổ sung các gốc polyetylen glycol (PEG hóa) và lipid hóa. Các biến đổi này có thể xảy ra *in vivo* hoặc *in vitro*. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào polyetylen glycol (được PEG hóa) để cải thiện các tính chất được động học của chúng. Việc kết hợp có thể được tiến hành bằng các kỹ thuật đã được biết bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành. Việc kết hợp các kháng thể điều trị bệnh với PEG đã được thể hiện để tăng cường được động học trong khi không gây trở ngại cho chức năng này (Knight, và các đồng tác giả *Platelets* 15:409-18, 2004, Leong, và các đồng tác giả *Cytokine* 16:106-19, 2001, Yang, và các đồng tác giả *Protein Eng* 16:761-70, 2003).

Một phương án khác theo sáng chế là polynucleotit phân lập được mã hóa các kháng thể theo sáng chế hoặc bộ thể của chúng, hoặc các đoạn của chúng. Các polynucleotit được phân lập mẫu là các polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm các CDR của chuỗi nặng globulin miễn dịch HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 7, 8 và 9 hoặc 13, 14 và 15, hoặc các polypeptit bao gồm các CDR của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt được thể hiện trong SEQ ID NO: 10, 11 và 12 hoặc 16, 17 và 18, và các polynucleotit có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 31-34, mã hóa các vùng biến đổi kháng thể theo sáng chế. Các polynucleotit khác mà, thể hiện sự thoái hóa của mã di truyền hoặc sự ưa thích codon trong hệ biểu hiện cho trước, mã hóa các kháng thể theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các axit nucleic phân lập được theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp hoặc tổng hợp đã được biết rõ. DNA mã hóa các kháng thể đơn dòng dễ dàng được phân lập và tạo trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành. Khi tế bào lai được tạo ra, các tế bào này

có thể đóng vai trò làm nguồn của DNA này. Theo một cách khác, bằng cách sử dụng các kỹ thuật hiển thị mà trong đó trình tự mã và sản phẩm dịch mã được liên kết, như thư viện hiển thị thực khuẩn thể hoặc ribosom, việc chọn chất gắn kết và axit nucleic được đơn giản hóa. Sau khi chọn thực khuẩn thể, các vùng mã hóa kháng thể từ thực khuẩn thể có thể được phân lập và được sử dụng để tạo ra toàn bộ các kháng thể, bao gồm các kháng thể người, hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên được mong đợi khác bất kỳ, và được biểu hiện vật chủ được mong đợi bất kỳ, bao gồm các tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, men, và vi khuẩn.

Một phương án khác theo sáng chế là vector bao gồm ít nhất một polynucleotit theo sáng chế. Các vector này có thể là các vector plasmit, các vector virus, các vector dựa trên gen nhảy hoặc vector khác bất kỳ thích hợp cho việc đưa các polynucleotit theo sáng chế vào cơ quan cho trước hoặc nền tảng di truyền bằng phương pháp bất kỳ.

Một phương án khác theo sáng chế là tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit theo sáng chế. Các tế bào vật chủ này có thể là các tế bào nhân chuẩn, các tế bào vi khuẩn, tế bào thực vật hoặc tế bào cổ khuẩn. Các tế bào nhân chuẩn mẫu có thể là của động vật có vú, côn trùng, chim hoặc các giống động vật khác. Các tế bào nhân chuẩn của động vật có vú bao gồm các dòng tế bào được cố định như các tế bào lai hoặc các dòng tế bào u tủy như SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) và dòng tế bào chuột Ag653 (ATCC CRL-1580). Dòng tế bào u tủy ở người là U266 (ATCC CRL-TIB-196). Dòng tế bào hữu dụng khác bao gồm các dòng tế bào thu được từ các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary-CHO) như CHO-K1SV (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) hoặc DG44.

Một phương án khác theo sáng chế là phương pháp tạo ra kháng thể mà gắn kết PHF-tau bao gồm nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế và thu hồi kháng thể được tạo ra bằng tế bào vật chủ. Các phương pháp tạo ra các kháng thể và tinh chế chúng đã được biết rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành.

Các phương pháp điều trị

Các kháng thể kháng PHF-tau theo sáng chế hoặc các đoạn của chúng, bao gồm Fab, (Fab')₂, đoạn scFv, hoặc các kháng thể bao gồm các vị trí gắn kết kháng nguyên của các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, làm giảm hoặc ngăn ngừa các triệu chứng ở các bệnh nhân mắc bệnh thoái hóa thần kinh mà liên quan đến sự kết tụ bệnh lý của tau trong não, như bệnh nhân mắc AD hoặc bệnh do protein tau bất kỳ khác. Trong khi không muốn bị giới hạn ở lý thuyết cụ thể bất kỳ, các kháng thể theo sáng chế có thể tạo ra tác động có lợi của chúng bằng cách làm giảm sự kết tụ bệnh lý của tau và tạo ra lượng PHF-tau trong não. Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh nhân là động vật thuộc phân loại bất kỳ. Các ví dụ về các động vật này bao gồm bao gồm động vật có vú như người, loài gặm nhấm, chó, mèo và gia súc. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế là hữu dụng trong việc điều chế thuốc chữa bệnh để điều trị AD, trong đó thuốc chữa bệnh này được điều chế để dùng theo liều được xác định ở đây.

Một phương án khác theo sáng chế là phương pháp làm giảm sự kết tụ của tau ở bệnh nhân cần được điều trị của nó bao gồm việc cho bệnh nhân dùng một lượng hữu hiệu điều trị bệnh kháng thể phân lập được theo sáng chế trong thời gian đủ để làm giảm sự kết tụ của tau.

Một phương án khác theo sáng chế là phương pháp điều trị hoặc làm giảm các triệu chứng của bệnh thoái hóa thần kinh mà liên quan đến sự kết tụ của tau ở bệnh nhân bao gồm việc cho bệnh nhân dùng một lượng hữu hiệu điều trị bệnh kháng thể phân lập được theo sáng chế trong thời gian đủ để điều trị hoặc làm giảm các triệu chứng của bệnh thoái hóa thần kinh.

Trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, bệnh thoái hóa thần kinh mà liên quan đến sự kết tụ của tau là bệnh do protein tau.

Trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của VH có SEQ ID NO: 35 và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL có SEQ ID NO: 36.

Trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể mà gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng

nguyên của VH có SEQ ID NO: 37 và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL có SEQ ID NO: 38.

Như được sử dụng ở đây, “bệnh do protein tau” bao gồm bệnh thoái hóa thần kinh bất kỳ mà liên quan đến sự kết tụ bệnh lý của tau trong não. Ngoài AD do di truyền và ngẫu nhiên, các bệnh do protein tau mẫu khác là bệnh sa sút trí tuệ trán – thái dương với hội chứng bệnh Parkinson được liên kết với nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), chứng liệt trên nhân tiến triển, thoái hóa thân nền vỏ não, bệnh Pick, chứng tăng thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, bệnh sa sút trí tuệ chỉ rối loạn thần kinh, các rối loạn sợi thần kinh phổ biến do canxi hóa, bệnh sa sút trí tuệ thớ ưa bạc, phức hợp hội chứng bệnh parkinson xơ cứng teo cơ bên – bệnh sa sút trí tuệ, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm cơ thể vùi, bệnh Creutzfeld-Jakob, bệnh teo đa hệ, bệnh Niemann-Pick dạng C, bệnh mạch máu não dạng bột do protein prion, viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển, chứng loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh neuron vận động không có guanamin với các rối loạn sợi thần kinh, hội chứng Parkinson sau viêm não, và chấn thương mạn tính ở não, như chứng sa sút trí tuệ do chấn thương não (bệnh chấn thương não). (Morris, và các đồng tác giả *Neuron* 70:410-26, 2011).

Hiện tượng hành vi liên quan đến bệnh do protein tau bao gồm sự suy giảm nhận thức, thay đổi nhân cách sớm và mất phản xạ có điều kiện, thờ ơ, mất ý chí, cảm, mất khả năng dùng động tác, dai dẳng, hành vi/chuyển động lặp khuôn, nói nhiều, mất tổ chức, mất khả năng hoạch định hoặc tổ chức các nhiệm vụ theo trình tự, ích kỉ/nhẫn tâm, các dấu hiệu khó gần, thiếu sự đồng cảm, lưỡng lự, nói chuyện không chủ đích mà thường xuyên mắc các lỗi cấu trúc nhưng khả năng hiểu được duy trì tương đối, khả năng hiểu bị suy giảm và thiếu hụt khả năng tìm từ ngữ, bất ổn trong dáng đi tiến triển chậm, sự đẩy lùi, xa cách, ngã thường xuyên, sự không linh động hướng tâm đáp ứng không có levodopa, chứng liệt khả năng nhìn trên nhân, co giật sóng vuông, rối tầm mắt nhìn dọc, chứng liệt hành tủy, mất khả năng dùng động tác chi, rối loạn trương lực, mất cảm giác vỏ não, và rung mình.

Các bệnh nhân phải điều trị bao gồm các cá nhân có triệu chứng có nguy cơ mắc AD hoặc bệnh do protein tau khác cũng như bệnh nhân hiện đang biểu hiện các triệu chứng. Các bệnh nhân phải điều trị này bao gồm các cá nhân mà có nguy

cơ mắc AD di truyền đã biết, như tiền sử gia đình mắc AD hoặc có các yếu tố có nguy cơ di truyền trong hệ gen. Các yếu tố nguy cơ mẫu là các đột biến trong protein tiền thân dạng bột (amyloid precursor protein-APP), đặc biệt là ở vị trí 717 và các vị trí 670 và 671 (lần lượt là các đột biến Hardy và Swedish). Các yếu tố nguy cơ khác là các đột biến trong các gen presenilin, PS1 và PS2, và ApoE4, tiền sử gia đình mắc chứng bệnh dư cholesterol hoặc bệnh xơ cứng thành động mạch. Các cá nhân hiện mắc AD có thể được nhận dạng bởi sự sa sút trí tuệ đặc trưng bằng sự có mặt của các yếu tố nguy cơ được mô tả trên đây. Ngoài ra, một số thử nghiệm chẩn đoán có sẵn để nhận diện các cá nhân mắc AD. Các thử nghiệm này bao gồm đo mức tau lỏng thuộc não tủy và A β 42. Mức tau tăng lên và A β 42 giảm đi biểu hiện sự có mặt của AD. Các cá nhân mắc AD cũng có thể được chẩn đoán bằng tiêu chuẩn kết hợp AD và các rối loạn liên quan.

Cách dùng/Dược phẩm

Các kháng thể kháng PHF-tau theo sáng chế là thích hợp làm chất điều trị bệnh và phòng ngừa bệnh để điều trị hoặc ngăn ngừa các bệnh thoái hóa thần kinh mà liên quan đến sự kết tụ bệnh lý của tau, như AD hoặc các bệnh do protein tau khác. Ở các bệnh nhân có triệu chứng, việc điều trị có thể bắt đầu ở độ tuổi bất kỳ (ví dụ, ở khoảng 10, 15, 20, 25, 30 tuổi). Tuy nhiên, thông thường, không cần thiết phải bắt đầu điều trị cho đến khi bệnh nhân đến khoảng 40, 50, 60, hoặc 70 tuổi. Việc điều trị thông thường đòi hỏi nhiều liều trong một khoảng thời gian. Việc điều trị có thể được giám sát bằng cách thử nghiệm kháng thể, hoặc tế bào T hoặc tế bào B hoạt tính đáp ứng chất điều trị bệnh qua thời gian. Nếu không đáp ứng, liều tăng cường được chỉ định.

Trong các ứng dụng phòng ngừa bệnh, các dược phẩm hoặc thuốc chữa bệnh được dùng cho bệnh nhân dễ mắc, hoặc nếu không thì có nguy cơ mắc, AD với lượng đủ để loại bỏ hoặc làm giảm nguy cơ, hạn chế tính nghiêm trọng, hoặc trì hoãn sự phát bệnh, bao gồm các triệu chứng sinh hóa, mô học và/hoặc hành vi của bệnh, các biến chứng của nó và các hiện tượng bệnh lý trung gian có trong khi bệnh tiến triển. Trong các ứng dụng điều trị bệnh, các dược phẩm hoặc thuốc chữa bệnh được dùng cho bệnh nhân nghi mắc, hoặc đã mắc, bệnh như vậy với lượng đủ để làm giảm, ngăn chặn, hoặc trì hoãn triệu chứng bất kỳ trong số các triệu chứng của

bệnh (sinh hóa, mô học và/hoặc hành vi). Việc dùng điều trị bệnh có thể làm giảm hoặc loại bỏ sự suy giảm nhận thức nhẹ ở các bệnh nhân mà chưa phát triển bệnh lý của Alzheimer đặc trưng. Một lượng đủ hoàn thành việc điều trị bệnh hoặc phòng ngừa bệnh được xác định là liều hữu hiệu điều trị bệnh hoặc phòng ngừa bệnh. Trong chế độ phòng ngừa bệnh và điều trị bệnh, các dược phẩm hoặc thuốc chữa bệnh thường được dùng một vài liều cho đến khi đạt được đủ sự đáp ứng miễn dịch.

Kháng thể kháng PHF-tau hoặc các đoạn của nó theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các chất khác mà hữu hiệu để điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh liên quan. Trong trường hợp mắc AD, các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các chất mà làm giảm hoặc ngăn ngừa sự kết lắng của dạng bột beta ($A\beta$). Có thể là các bệnh lý PHF-tau và $A\beta$ là hiệp đồng. Do đó, liệu pháp điều trị kết hợp nhằm đồng thời đến sự làm sạch của PHF-tau và $A\beta$ và các bệnh lý liên quan đến $A\beta$ có thể hữu hiệu hơn so với nhằm đến từng yếu tố riêng rẽ.

Trong trường hợp bệnh Parkinson và các bệnh thoái hóa thần kinh liên quan, sự điều biến miễn dịch để làm sạch các dạng được kết tụ của protein α -synuclein cũng là liệu pháp điều trị nổi bật. Liệu pháp điều trị kết hợp mà nhằm đến đồng thời sự làm sạch của tau và các protein α -synuclein có thể hữu hiệu hơn so với nhằm đến từng protein riêng rẽ.

Trong các phương pháp theo sáng chế, “lượng hữu hiệu điều trị bệnh” của kháng thể trong việc điều trị hoặc cải thiện các triệu chứng của bệnh do protein tau có thể được xác định bằng các kỹ thuật nghiên cứu tiêu chuẩn. Ví dụ, liều kháng thể có thể được xác định bằng cách cho các mô hình động vật có liên quan đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành dùng chất này.

Ngoài ra, các thử nghiệm *in vitro* có thể được sử dụng tùy ý để giúp nhận dạng các khoảng liều tối ưu. Việc chọn liều hữu hiệu cụ thể có thể được xác định (ví dụ, thông qua các thử nghiệm lâm sàng) bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành dựa trên việc xem xét một vài yếu tố. Các yếu tố này bao gồm bệnh cần được điều trị hoặc ngăn ngừa, các triệu chứng liên quan, trọng lượng cơ thể bệnh nhân, tình trạng miễn dịch của bệnh nhân và các yếu tố khác đã được biết bởi các chuyên gia. Liều chính xác được sử dụng trong chế

phẩm cũng sẽ phụ thuộc vào đường dùng, và tính nghiêm trọng của bệnh, và nên được xác định theo sự phán đoán của bác sĩ và từng trường hợp của bệnh nhân. Các liệu hữu hiệu có thể được ngoại suy từ các biểu đồ phản ứng liệu thu được từ *in vitro* hoặc các hệ thử nghiệm mô hình động vật.

Cách dùng đối với việc sử dụng các kháng thể theo sáng chế để điều trị bệnh có thể là đường thích hợp bất kỳ mà phân phối được chất vào vật chủ. Các dược phẩm của các kháng thể này là hữu dụng để dùng ngoài đường ruột, ví dụ, trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi hoặc trong sọ hoặc chúng có thể được dùng vào dịch não tủy của não hoặc cột sống.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được điều chế làm các dược phẩm chứa lượng hữu hiệu kháng thể làm thành phần hoạt tính trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ "chất mang" đề cập đến chất làm loãng, chất hỗ trợ, tá dược, hoặc tá dược lỏng mà kháng thể được dùng với. Các tá dược lỏng này có thể là các chất lỏng, như nước và dầu bao gồm dầu mỡ, dầu động vật, dầu thực vật hoặc dầu thô tổng hợp, như dầu đậu phộng, dầu đậu tương, dầu khoáng, dầu vừng và dầu tương tự. Ví dụ, nước muối 0,4% và glyxin 0,3% có thể được sử dụng. Các dung dịch này vô trùng và nói chung là không có chất hạt. Chúng có thể được vô trùng bằng các kỹ thuật vô trùng thông thường đã được biết rõ (ví dụ, lọc). Các chế phẩm có thể chứa các chất hỗ trợ dược dụng như được yêu cầu đối với các điều kiện sinh lý học gần đúng như điều chỉnh độ pH và đệm các chất, làm ổn định, làm dày, làm trơn và tạo màu các chất, v.v. Nồng độ các kháng thể theo sáng chế trong dược phẩm này có thể thay đổi rất nhiều, tức là, từ ít hơn khoảng 0,5%, thường bằng hoặc ít nhất khoảng 1% đến nhiều nhất bằng 15 hoặc 20% theo trọng lượng và sẽ được chọn chủ yếu dựa trên liệu được yêu cầu, thể tích dịch lỏng, độ nhớt, v.v., theo cách dùng cụ thể được chọn.

Việc điều trị có thể được đưa ra ở lịch trình liều đơn, hoặc là lịch trình nhiều liều trong đó tiến trình điều trị cơ bản có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10 liều riêng biệt, sau đó là các liều khác được đưa ra ở các khoảng thời gian tiếp theo được yêu cầu để duy trì và hoặc tăng cường sự đáp ứng, ví dụ, trong từ 1 đến 4 tháng đối với liều thứ hai, và nếu cần thiết, (các) liều tiếp theo sau một vài tháng. Các ví dụ về các lịch trình điều trị thích hợp bao gồm: (i) 0, 1 tháng và 6 tháng, (ii)

0, 7 ngày và 1 tháng, (iii) 0 và 1 tháng, (iv) 0 và 6 tháng, hoặc các lịch trình khác đủ để suy ra các đáp ứng mong muốn được mong muốn để làm giảm các triệu chứng bệnh, hoặc làm giảm tính nghiêm trọng của bệnh.

Do đó, dược phẩm theo sáng chế dùng để tiêm trong cơ có thể được điều chế để chứa 1ml nước được đệm vô trùng, và nằm trong khoảng từ 1ng đến 100mg, nằm trong khoảng từ 50ng đến 30mg hoặc nằm trong khoảng từ 5mg đến 25mg kháng thể theo sáng chế. Tương tự, dược phẩm theo sáng chế dùng để truyền trong tĩnh mạch có thể được điều chế để chứa khoảng 250ml dung dịch Ringer vô trùng, và nằm trong khoảng từ 1mg đến 30mg hoặc nằm trong khoảng từ 5mg đến 25mg kháng thể theo sáng chế. Các phương pháp thực tế để điều chế chế phẩm có thể dùng ngoài ruột đã được biết rõ và được mô tả chi tiết hơn trong, ví dụ, "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được làm khô lạnh để lưu giữ và hoàn nguyên trong chất mang thích hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã được thể hiện là hữu hiệu với kháng thể và các chế phẩm protein khác và các kỹ thuật làm khô lạnh và hoàn nguyên đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành có thể được sử dụng.

Các phương pháp và kit chẩn đoán

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán AD hoặc bệnh do protein tau khác trong đối tượng. Phương pháp này bao gồm dò tìm, trong đối tượng, sự có mặt của PHF-tau bằng cách sử dụng chất phản ứng chẩn đoán như kháng thể hoặc đoạn của nó theo sáng chế.

PHF-tau có thể được dò tìm trong mẫu sinh học từ đối tượng (ví dụ, máu, nước tiểu, dịch tủy não) bằng cách cho mẫu sinh học tiếp xúc với chất phản ứng kháng thể chẩn đoán, và dò tìm sự gắn kết của chất phản ứng kháng thể chẩn đoán với PHF-tau trong mẫu từ đối tượng. Các thử nghiệm để tiến hành việc dò tìm bao gồm các phương pháp đã được biết rõ như ELISA, hóa học mô miễn dịch, thẩm tách western, hoặc tạo ảnh *in vivo*. Các kháng thể chẩn đoán mẫu là các kháng thể PT1 và PT3 theo sáng chế, và là IgG1, dạng κ.

Các kháng thể chẩn đoán hoặc các chất phản ứng tương tự có thể được dùng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch vào cơ thể bệnh nhân, hoặc trực tiếp vào não bằng đường thích hợp bất kỳ mà phân phối được chất đến vật chủ như được ví dụ trên đây. Liều kháng thể nên nằm trong các khoảng giống như đối với các phương pháp điều trị bệnh. Thông thường, kháng thể được đánh dấu, mặc dù trong một số phương pháp, kháng thể sơ cấp có ái lực đối với PHF-tau không được đánh dấu và chất đánh dấu thứ cấp được sử dụng để gắn kết với kháng thể sơ cấp. Việc chọn nhãn phụ thuộc vào phương tiện dò tìm. Ví dụ, nhãn huỳnh quang thích hợp cho dò tìm quang học. Việc sử dụng các nhãn thuận từ thích hợp cho dò tìm cắt lớp mà không có sự can thiệp của phẫu thuật. Các nhãn phóng xạ cũng có thể được dò tìm bằng cách sử dụng PET hoặc SPECT.

Việc chẩn đoán được thực hiện bằng cách so sánh số lượng, kích cỡ, và/hoặc cường độ của PHF-tau đã được đánh dấu, các kết tụ tau, và/hoặc các rối loạn sợi thần kinh trong mẫu từ đối tượng hoặc trong đối tượng, đến các trị số ranh giới tương ứng. Các trị số ranh giới có thể là các mức trung bình trong quần thể các cá nhân không mắc bệnh. Các trị số ranh giới cũng có thể là các mức trước được xác định trong cùng đối tượng.

Các phương pháp chẩn đoán được mô tả trên đây cũng có thể được sử dụng để giám sát phản ứng của đối tượng với liệu pháp điều trị bằng cách dò tìm sự có mặt của PHF-tau trong đối tượng trước khi, trong khi hoặc sau khi điều trị. Sự giảm về trị số so với ranh giới báo hiệu sự phản ứng tích cực đối với việc điều trị. Các trị số cũng có thể tăng tạm thời trong các dịch thể sinh học do tau bệnh lý được làm sạch khỏi não.

Sáng chế còn đề xuất kit để tiến hành các phương pháp chẩn đoán và giám sát được mô tả trên đây. Thông thường, các kit này chứa chất phản ứng chẩn đoán như các kháng thể theo sáng chế, và tùy ý nhãn có thể dò tìm được. Tự kháng thể chẩn đoán có thể chứa nhãn có thể dò tìm được (ví dụ, phân tử huỳnh quang, biotin, v.v.) mà có thể dò tìm được một cách trực tiếp hoặc có thể dò tìm được thông qua phản ứng thứ cấp (ví dụ, phản ứng với streptavidin). Theo một cách khác, chất phản ứng thứ hai chứa nhãn có thể dò tìm được có thể được sử dụng, khi chất phản ứng thứ hai có tính đặc hiệu gắn kết đối với kháng thể sơ cấp. Trong kit chẩn đoán thích

hợp để đo PHF-tau trong mẫu sinh học, các kháng thể của kit có thể được cung cấp được liên kết trước vào pha rắn, như vào các lọ của đĩa vi chuẩn.

Nội dung của tất cả các phần được viện dẫn (bao gồm các tài liệu sáng chế, các patent đã được cấp, các đơn patent đã được công bố, và các đơn patent yêu cầu cấp) được trích dẫn trong cả bản mô tả này được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tinh chế các sợi xoắn đã ghép cặp-tau (paired helical filament: PHF-tau)

Tinh chế từng phần PHF-tau bằng phương pháp đã được sửa đổi của Greenberg và Davies (Greenberg and Davies *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5827-31, 1990). Nói tóm lại, tinh chế từng phần mô sau khi chết lấy từ vỏ não thu được từ bệnh nhân mắc Alzheimer được xác định theo mô học. Thông thường, đồng nhất hóa 5mg vỏ não trán trong 10 phần thể tích của chất đệm nguội Buffer H (10mM Tris, 800mM NaCl, 1mM EGTA và sucroza 10%/pH 7,4) bằng cách sử dụng máy đồng nhất mô thủy tinh/Teflon Potter (IKA Works, Inc; Staufen, Đức) ở 1000rpm. Ly tâm vật liệu đã được đồng nhất ở 27000g trong 20 phút trong bộ phận quay Sorvall SS34. Loại bỏ viên và điều chỉnh lớp bề mặt đến nồng độ cuối cùng của N-lauroylsarcosin 1% (trọng lượng/thể tích) và 2-mercaptoetanol 1% (thể tích/thể tích) và ủ trong 2 giờ ở 37°C. Tiếp đó, ly tâm lớp bề mặt ở 108000g trong 35 phút ở 20°C trong bộ phận quay Beckman 60Ti. Rửa cẩn thận viên trong PBS và tạo huyền phù trong PBS. Ly tâm lớp bề mặt lần thứ hai như được mô tả và hòa tan viên cuối cùng, phân ước và làm đông ở -80°C. Đánh giá chất lượng của các chế phẩm PHF-tau trên SDS-PAGE 12% và thẩm tách western bằng các kháng thể kháng tau AT8 và HT7 (ThermoScientific, Rockford, IL). AT8 dò tìm PHF-tau được phosphoryl hóa ở S202/T205, nhưng không gắn kết tau với PHF không được phosphoryl hóa cũng như tau dạng thô. HT7 gắn kết với epitop không được phosphoryl hóa ở axit amin Tau 159-163 (có SEQ ID NO: 6), và nhận diện cả tau và PHF-tau. Chế phẩm PHF-tau chất lượng tốt bao gồm 4 dải có trọng lượng phân tử là khoảng 60, 64, 66 và 72kDa trên thẩm tách western được dò tìm bằng kháng thể phản ứng với PHF-tau được siêu phosphoryl hóa như AT8. Hai chế phẩm PHF-

tau riêng rẽ với chất lượng và độ tinh khiết có thể so sánh được được làm từ cùng một mẫu não. Sử dụng chế phẩm 1 cho việc miễn dịch.

Ví dụ 2: Tạo ra các kháng thể đơn dòng kháng lại PHF-tau

Tạo ra kháng thể kháng PHF-tau bằng cách sử dụng kỹ thuật tế bào lai tiêu chuẩn trong chuột bạch thông thường (Kohler and Milstein *Nature* 256:495-7, 1975). Gieo tế bào lai thu được trong các đĩa có 96 lọ và sàng lọc sau 10 ngày trong ELISA trực tiếp trên 25ng/lọ được phủ PHF-tau như được mô tả dưới đây. Thử nghiệm các tế bào dương về khả năng phản ứng chéo trên 10ng/lọ được phủ bằng tau đổi chứng (SEQ ID NO: 6) được thể hiện trong tế bào *E. Coli* BL21 và tinh chế bằng cách xử lý nhiệt và kết tủa amoni sulphat, và tái tạo dòng ngay lập tức và làm đông các dòng dương trong nitơ lỏng. Trồng các tế bào lai trong môi trường của Eagle biến đổi Dulbecco được bổ sung bằng huyết thanh phôi thai bê 10% (Hyclone, Châu Âu), phụ thể dòng dung hợp tế bào lai (2%) (Roche, Brussels, Bỉ) 2% HT (Sigma, Mỹ), 1mM natri pyruvat, 2mM L-glutamin và penixilin (100 U/ml) và Streptomycin (50 mg/ml).

Tạo dòng các vùng biến đổi kháng thể từ các tế bào lai được chọn lên trên IgG1/IgG2/ nền κ của chuột và biểu thị và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường.

ELISA trực tiếp để chọn kháng thể

Phủ 25ng/lọ PHF-tau qua đêm ở 4°C trong các tấm vi chuẩn có 96 lọ gắn kết cao đáy phẳng NUNC Maxisorp (Life Technologies) trong 50μl/lọ chất đệm phủ (10mM Tris, 10mM NaCl, và 10mM NaN₃, pH 8,5). Ngày tiếp theo, bảo vệ các tấm bằng 75μl/lọ casein 0,1% trong PBS trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, bổ sung 50μl lớp bề mặt tế bào lai và ủ trong 1 giờ ở 37 °C. Sau khi rửa, dò tìm các kháng thể đơn dòng được liên kết bằng 50 μl/lọ IgG chuột kháng cừu được kết hợp với peroxidaza ở lạc trong 1 giờ ở 37 °C (Amersham-Pharmacia Biotech). Pha loãng cả hai chất phản ứng trong Cazein/PBS 0,1%. Rửa các đĩa và 50μl dung dịch chứa 0,42mM 3,5,3',5'-tetrametyl-benzidin, 0,003 % (thể tích/thể tích) H₂O₂ trong 100mM axit xitric và bổ sung 100mM dinatri hydro phosphat (pH 4,3) làm chất nền. Cho phép tiến hành phản ứng tối đa 15 phút trên máy lắc tấm ở nhiệt độ trong

phòng, sau đó ngừng sự phát triển màu bằng H_2SO_4 2N, 50 μl /lọ và các tấm, được đọc trên bộ đọc tấm vi chuẩn ở 450nm (Thermomax, Molecular Devices).

Tính đặc hiệu của các kháng thể đơn dòng

Thử nghiệm các kháng thể chọn lọc thu được từ việc sàng lọc tế bào lai về khả năng phản ứng chéo của chúng với tau đối chứng được biểu hiện tái tổ hợp (SEQ ID NO: 6). Nạp mẫu 500ng PHF-tau và 200ng tau đối chứng lên gel NuPAGE® Novex® Bis-Tris 4-12% và thẩm tách trên màng nitroxenluloza bằng cách sử dụng hệ iBlot (Invitrogen), theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Bảo vệ các màng này trong 1 giờ bằng Tween-20 nước muối được đệm Tris (TBS-T; 1M Tris, 150mM NaCl và Tween-20 0,05%, pH 8,5) chứa sữa bột không béo (non fat dry milk-NFDM) (5% trọng lượng/thể tích; Biorad) và rửa ba lần trong TBS-T. Tiến hành ủ qua đêm ở 4°C bằng các kháng thể đối chứng sơ cấp (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) HT7, AT8, AT100 (ThermoScientific, Rockford, IL), và BT2 được pha loãng trong TBS-T chứa NFDM (5% trọng lượng/thể tích). Bổ sung các kháng thể đơn dòng PT1, PT2, PT3, PT4 và PT5 được chọn từ việc sàng lọc tế bào lai trong lớp bề mặt nuôi cấy chứa FCS 10%. Dò tìm các kháng thể sơ cấp bằng cách sử dụng Ig của chuột kháng cừu được kết hợp với HRPO (1:20000 trong TBS-T, Amersham Biosciences) thông qua West Dura® được tăng cường quang hóa (Pierce, ThermoScientific). Các tín hiệu được thu bằng hệ tạo ảnh Lumi (Roche Diagnostic). Cho PT1 và PT3 phản ứng với PHF-tau và không phản ứng với tau đối chứng trong thẩm tách western. Cho PT2 phản ứng với cả hai protein. Tiêu sử gắn kết của HT7 và AT8 được mô tả trên đây. AT100 gắn kết với Ser212/Thr214 được phosphoryl hoá và gắn kết với PHF-tau nhưng không gắn kết với tau dạng thô. BT2 nhận diện epitop không được phosphoryl hóa bao gồm S199/S202, và do đó nhận diện tau dạng thô mà không nhận diện PHF-tau.

Gắn kết epitop có thể cạnh tranh

Đánh giá các kháng thể đơn dòng PT1, PT2, PT3, PT4, PT5, AT8 (ThermoScientific, Rockford, IL), AT100 (ThermoScientific, Rockford, IL) và HT7 (MN1000) (Thermo Scientific, Rockford, IL) về sự gắn kết cạnh tranh với PHF-tau hoặc các peptit tau được phosphoryl hóa. Đánh dấu các kháng thể bằng

cách sử dụng este MSD® SULF0-TAG NHS (Meso Scale Discovery) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Để cạnh tranh với PT1 được đánh dấu, phủ PT3, AT100 và HT7, 5 μ L (50 μ g/mL)/lọ của các protein PHF-tau được làm giàu (được tinh chế như được mô tả trên đây) trên tấm MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng (room temperature-RT). Để cạnh tranh với AT8, phủ 25 μ L của 0,1mg/lọ RSGYSSPG(pS)PG(pT)PGSRSR-OH được biotinyl hóa tổng hợp và peptit được peg hóa (New England Peptide, LLC., Gardner, MA) (SEQ ID NO: 39) tương ứng với các gốc 194-211 của tau đối chứng (SEQ ID NO: 6) được phosphoryl hóa ở các gốc tương ứng với S202/T205 trong tau đối chứng trên các tấm được nạp Streptavidin (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD). Sau khi phủ, bảo vệ các lọ bằng 150 μ L chất đệm A bảo vệ MSD 5% ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ, và rửa ba lần bằng chất đệm HEPES 0,1M, pH 7,4. Bổ sung 25 μ L hỗn hợp của kháng thể kháng tau riêng rẽ được đánh dấu (10nM hoặc 50nM) và chất pha loãng hàng loạt của các kháng thể cạnh tranh được đánh dấu khác nhau (nằm trong khoảng từ 1nM đến 2 μ M) trên từng lọ. Ủ các tấm trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng cách lắc nhẹ và rửa 3 lần như trên. Bổ sung 150 μ L/lọ chất đệm T đọc MSD đã được pha loãng và đọc các tấm trong bộ thu ảnh SECTOR 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).

Các epitop không chồng nhau của các mAb kháng Tau HT7, AT100 và AT8 được mô tả trên đây. Dựa trên dữ liệu đã được công bố, các kháng thể này không được mong đợi cạnh tranh với nhau trong việc gắn kết với các protein tau hoặc peptit.

Dựa trên các thử nghiệm cạnh tranh được tiến hành, không có kháng thể nào cạnh tranh với nhau về gắn kết, chỉ ra rằng tất cả chúng gắn kết với các epitop khác nhau. Trong mỗi thử nghiệm, only self-inhibition was observed. Các fig từ 1 đến 5 thể hiện các kết quả của các thử nghiệm cạnh tranh với lần lượt AT8 được đánh dấu, PT1, PT3, AT100, và HT7.

Ví dụ 3: các kháng thể kháng PHF-tau làm giảm sự tích lũy PHF-tau *in vivo*

Điều trị chuột cái P301L 5 tháng tuổi (Taconic, cat#002508) mỗi tuần một lần với IgG1 của chuột, nước muối, PT3 (500 μ g/con) hoặc AT8 (được biểu hiện từ tế bào lai ECACC, số kết lắng 9110086) trong 5 tháng. Gây mê chuột, truyền dịch bằng PBS nguội và giải phẫu não trên đá. Đối với mỗi con, đồng nhất một bán cầu não trong 10 phần thể tích chất đệm H, sau đó, ly tâm ở 21.000g trong 20 phút ở 4°C. Lớp bề mặt thu được còn được ly tâm ở 100.000g trong 60 phút. Sau khi ly tâm, thu hồi viên (đoạn P1) và tái tạo huyền phù bằng chất đệm phân giải để phân tích Tây và ELISA, như được mô tả bởi Chai và các đồng tác giả *J Biol Chem* 286:34457-67, 2011. Đối với các mẫu vỏ não, đoạn P1 còn được điều trị bằng (trọng lượng/thể tích) N-lauroylsarcosine 1% và siêu ly tâm để làm giàu thêm PHF-tau trong viên. Phát hiện ra rằng chuột đực P301L có biểu hiện chuyển gen thấp và không có trong các phân tích.

Tau được phosphoryl hóa được đo trong các thể đồng nhất thân não (đoạn P1) bằng lớp kẹp ELISA bằng cách sử dụng các kháng thể AT8 và AT100 làm các kháng thể thu, sau đó là dò tìm bằng HT7 được biotinyl hóa và avidin-HRP (Fig.6A và 6B), và bằng AT100 trong thẩm tách western (Fig.6C) về cơ bản là như được mô tả trong Chai và các đồng tác giả *J Biol Chem* 286:34457-67, 2011. Nói tóm lại, viên P1 được tái tạo huyền phù bằng chất đệm phân giải (Cell Signaling). Ủ các mẫu viên P1 trong các lọ được phủ trước AT8 hoặc AT100 (Thermo Scientific) và kháng thể HT-7 được đánh dấu biotin. Sau đó, rửa các mẫu 5 lần bằng chất đệm, sau đó là ủ bằng avidin-HRP trong một giờ. Sau đó, ủ các mẫu bằng chất nền TMB một bước (Thermo Scientific) trong 30 phút, sau đó là bằng H₂SO₄ 2N. Cuối cùng, đọc phản ứng ở 450nm và xác định số lượng tau có thể phản ứng với AT8 hoặc AT100 trong não bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn thu được từ các thể đồng nhất não người mắc AD, và vẽ đồ thị là lượng tương đối thể đồng nhất não mắc AD (ng/ml) cung cấp tín hiệu ELISA giống như các mẫu trung bình từ động vật không chuyển gen (B6).

Sự giảm đáng kể về mặt thống kê hoặc dấu hiệu về xu hướng trong tau được phosphoryl hóa được quan sát ở các động vật chuyển gen P301L bằng PT3 khi so với các động vật được dùng để đối chứng lớp kháng thể trong các thử nghiệm ELISA bằng cách sử dụng AT100 (p=0,057) hoặc AT8 (p=0,0475) để dò tìm sự

phosphoryl hóa (tín hiệu ELISA: nhóm nước muối ($1135 \pm 228,8$); nhóm IgG1 ($1344 \pm 245,6$); nhóm PT3 ($660.5 \pm 134,5$); nhóm AT8 (1271 ± 274)).

Để xác nhận dữ liệu thu được bằng ELISA, phân tích các thể đồng nhất thần não (đoạn P1) từ các động vật được điều trị bằng IgG1 hoặc PT3 trên thẩm tách western bằng cách dò tìm PHF-tau bằng cách sử dụng kháng thể AT100. Thẩm tách các bộ lọc bằng cách sử dụng kháng thể kháng actin làm đối chứng nạp mẫu (Fig.6B). Thẩm tách western thể hiện lượng PHF-tau suy giảm được dò tìm bằng kháng thể AT100 khi so với các động vật được điều trị bằng IgG1.

Đối với phân tích vỏ não, phân tích cả hai đoạn vỏ não có thể hòa tan được sarcosyl (là tau có thể hòa tan được) và không thể hòa tan được (là PHF-tau) bằng lớp kẹp ELISA bằng cách sử dụng kháng thể pan-tau (PT4) hoặc kháng thể phospho-tau (AT8) để thu, sau đó là kháng thể pan-tau biotin (hTau10), sau đó nữa là HRP-avidin. Các động vật được điều trị bằng PT3 có các mức tổng tau tương tự so với các động vật được điều trị bằng đối chứng lớp kháng thể IgG1. Các mức PHF-tau thấp hơn về hướng là rõ ràng trong các động vật được điều trị bằng PT3 khi so với đối chứng lớp kháng thể trong các đoạn không hòa tan được N-lauroylsarcosin (ELISA, thu bằng PT4: nhóm IgG: 851026 ± 261198 và nhóm PT3: 585639 ± 120498 ; ELISA, thu bằng AT8: nhóm IgG: 1125886 ± 286240 (N=10) và nhóm pT3: 746582 ± 124970 (N=7)).

Ví dụ 4: Đặc tính của các kháng thể kháng PHF-tau

Xác định ái lực

Sự tương tác của các kháng thể đơn dòng PT1 và PT3 với tau có thể hòa tan được tái tổ hợp ở người hoặc PHF-tau được nghiên cứu bằng ProteOn. Nghiên cứu tất cả các tương tác ở 25°C bằng cách sử dụng PBS có độ pH 7,4, bổ sung bằng 3mM EDTA, và Tween-20 0,005% để chạy hoặc làm hệ đệm. Sử dụng hai hình thức mẫu khác nhau, một để tương tác với tau đối chứng được biểu hiện tái tổ hợp và một để tương tác với PHF-tau. Trong các thử nghiệm HT7 này (Pierce, cat #MN1000), sử dụng kháng thể chuột kháng tau làm đối chứng dương.

Để nghiên cứu sự tương tác với tau đối chứng được biểu hiện tái tổ hợp, điều chế bề mặt cảm biến sinh học bằng cách ghép kháng thể đặc hiệu đoạn Fcγ kháng

IgG của người hoặc của chuột (Ab) vào bề mặt của vi mạch cảm biến GLC (ProteOn) bằng cách sử dụng từng chỉ dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép amin (~5000 đơn vị phản ứng (response unit-RU)). Chất đệm ghép là 10mM natri axetat, độ pH = 4,5. Pha loãng các kháng thể kháng PHF-tau trong chất đệm chạy và tiêm để thu được vật thu nằm trong khoảng từ 60 đến 130RU. Sau việc thu mAb kháng PHF-Tau bằng cách tiêm tau đối chứng được biểu hiện tái tổ hợp (Tau-441, Sigma catalog# T0576-50ug) trong dung dịch (0,1 đến 75nM trong dung dịch loãng trộn 5 lần). Giám sát sự kết hợp trong 2 phút (80μL được tiêm với tốc độ 40 μL/phút). Giám sát sự phân ly trong 10 phút. Sự tái tạo của bề mặt cảm biến thu được bằng H₃PO₄ 0,85%, hoặc H₃PO₄ 0,85%, sau đó là 50mM NaOH. Dữ liệu được làm thích hợp bằng cách sử dụng mô hình gắn kết 1:1.

Bảng 2.

mAb	Kháng nguyên	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	*K _D (pM)
PT1	Tau đối chứng	**		
PT1	PHF-Tau	2,01E+05	6,47E-05	322
PT3	Tau đối chứng	***		
PT3	PHF-Tau	(1,23±0,06)E+06	(2,18±0,28)E-05	18 ±2

* Đối với PHF-tau, đây là ái lực bên trong rõ ràng khi KD thu được làm tỉ lệ $k_{off}/k_{on}-1$ thu được từ đợt được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình gắn kết hai hóa trị.

** Không có gắn kết đáng kể

***Không có gắn kết trong 4 trong 5 thử nghiệm

Để nghiên cứu sự tương tác với PHF-tau, điều chế bề mặt cảm biến sinh hóa bằng PHF-tau thu-ghép bằng cách sử dụng HT7 làm chất phản ứng thu. ProteOn

đòi hỏi việc điều chế bổ sung PHF-tau như được mô tả trên đây để giới hạn lượng vật liệu không thể hòa tan được đi vào các chất lỏng. PHF-tau như được mô tả trên đây còn được điều chế bằng cách ly tâm 2 lần ở 5000g, 5°C, 10 phút khi lớp bề mặt từ việc ly tâm thứ hai sau đó được pha loãng 1/20 hoặc 1/40 trong chất đệm chạy. Để điều chế vi mạch, cố định đồng hóa trị HT7 vào bề mặt vi mạch cảm biến GLC (ProteOn) bằng cách sử dụng từng chỉ dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép amin (~3000 đơn vị phản ứng (response unit-RU)). Chất đệm ghép là 10mM natri axetat, độ pH = 4,5. Sau khi tiêm PHF-tau cố định HT7 và thu (~300 RU) bằng HT7. Sau khi thu, cố định đồng hóa trị PHF-tau vào vi mạch cảm biến bằng cách kích hoạt vi mạch bằng cách sử dụng từng chỉ dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép amin. Các vị trí có thể phản ứng còn lại cuối cùng được bảo vệ bằng cách tiêm etanolamin. Sau khi điều chế và làm ổn định bề mặt biến đổi PHF-tau và bề mặt tham chiếu (không chứa kháng nguyên), hòa tan các kháng thể kháng PHF-tau trong chất đệm chạy và tiêm trong dung dịch (0,1-75nM trong dung dịch loãng trộn 5 lần). Giám sát sự kết hợp trong 3 phút (120μL được tiêm với tốc độ 40μL/phút). Giám sát sự phân ly trong 10 hoặc 15 phút. Sự tái tạo của bề mặt cảm biến thu được bằng 10mM Gly có độ pH = 2. Dữ liệu được làm thích hợp bằng cách sử dụng mô hình gắn kết hóa trị hai khi ái lực bên trong rõ ràng được báo cáo làm tỉ lệ của koff-1/kon-1.

Dựa trên các thử nghiệm ProteOn PT1 gắn kết PHF-tau với 322pM ái lực và không thể hiện có gắn kết với tau đối chứng trong các điều kiện thử nghiệm (Bảng 2). PT3 gắn kết PHF-tau với 18 ± 2 pM ái lực và không thể hiện có gắn kết với tau đối chứng trong 4 trong số 5 thử nghiệm trong các điều kiện thử nghiệm. Một trong số 5 phép đo ProteOn thể hiện gắn kết yếu mà có thể được sử dụng để loại bỏ ái lực > 75 nM dựa trên nồng độ tau đối chứng được sử dụng cao nhất.

Sáng chế đã được mô tả hoàn toàn, sáng chế này sẽ là rõ ràng đối với một chuyên gia có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chuyên ngành mà các thay đổi và biến đổi có thể được thực hiện thêm vào đó mà không vượt ra khỏi tinh thần hoặc phạm vi của yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập được gắn kết PHF-tau bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 37, và vị trí gắn kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 38.
2. Kháng thể phân lập được gắn kết PHF-tau, trong đó vị trí gắn kết kháng nguyên của VH bao gồm các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) chuỗi nặng 1 (HCDR1), CDR chuỗi nặng 2 (HCDR2) và CDR chuỗi nặng 3 (HCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 13, 14 và 15, và vị trí gắn kết kháng nguyên của VL bao gồm các CDR chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), CDR chuỗi nhẹ 2 (LCDR2) và CDR chuỗi nhẹ 3 (LCDR3) lần lượt có SEQ ID NO: 16, 17 và 18.
3. Kháng thể phân lập được theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này được nhân tính hóa.
4. Polynucleotit phân lập được mã hóa VH kháng thể bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt có SEQ ID NO: 13, 14 và 15.
5. Polynucleotit phân lập được mã hóa VL kháng thể bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt có SEQ ID NO: 16, 17 và 18.
6. Vector bao gồm polynucleotit theo điểm 4 hoặc 5.
7. Tế bào vật chủ bao gồm vector theo điểm 6.
8. Kháng thể phân lập được gắn kết PHF-tau bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR) 1, vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR) 2 và vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR) 3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có SEQ ID NO: 37, và vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 1, vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 2 và vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) 3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có SEQ ID NO: 38.
9. Kháng thể phân lập được theo điểm 8, trong đó HCDR1, HCDR2 và HCDR3 bao gồm các trình tự axit amin lần lượt có SEQ ID NO: 25, 26 và 27, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin lần lượt có SEQ ID NO: 28, 29 và 30.
10. Kháng thể phân lập được theo điểm 8, trong đó kháng thể được nhân tính hóa.

11. Kháng thể phân lập được theo điểm 9, trong đó kháng thể được nhân tính hóa.
12. Polynucleotit phân lập được mã hóa chuỗi nặng kháng thể bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO: 13, 14 và 15.
13. Polynucleotit phân lập được mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO: 16, 17 và 18.
14. Vector bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm 8.
15. Vector bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể, trong đó HCDR1, HCDR2 và HCDR3 bao gồm các trình tự axit amin lần lượt có SEQ ID NO: 13, 14 và 15, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 bao gồm các trình tự axit amin lần lượt có SEQ ID NO: 16, 17 và 18.
16. Vector bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm 9.
17. Tế bào vật chủ bao gồm polynucleotit theo điểm 12 hoặc 13.
18. Tế bào vật chủ bao gồm vector theo điểm 14.
19. Tế bào vật chủ bao gồm vector theo điểm 15.
20. Tế bào vật chủ bao gồm vector theo điểm 16.
21. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 8 và chất mang dược dụng.
22. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 9 và chất mang dược dụng.

FIG. 1

Sự cạnh tranh của AT8 được đánh dấu bởi các mAb khác nhau

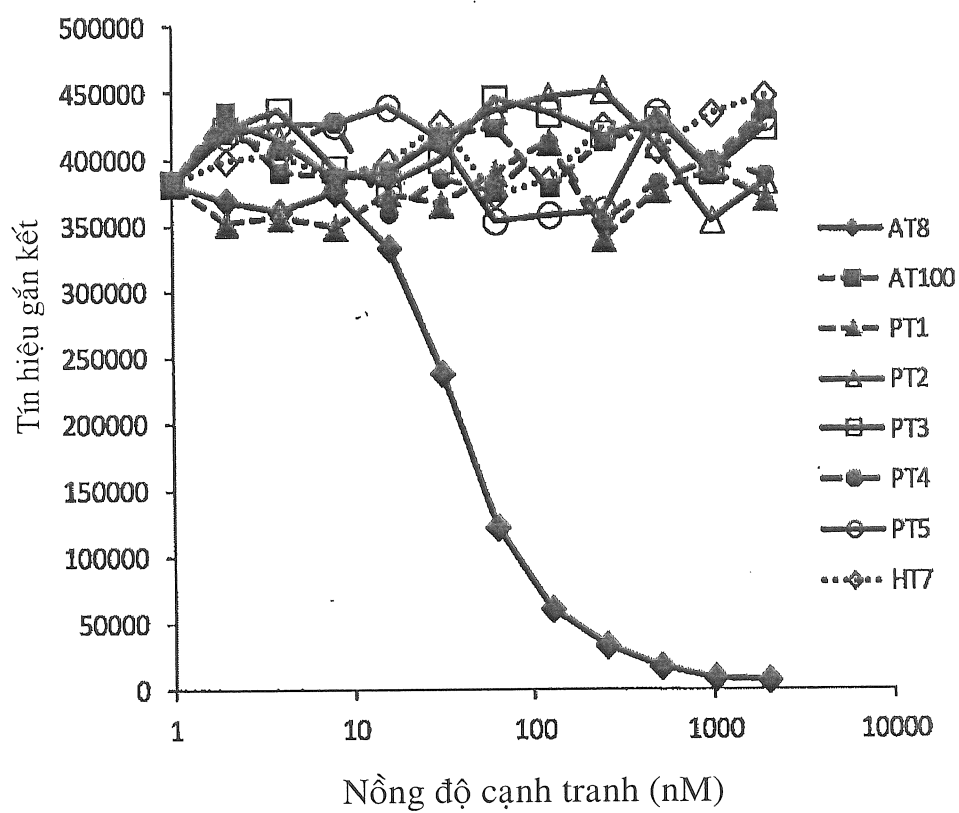


FIG. 2A

Sự cạnh tranh của PT1 được đánh dấu bởi các mAb khác nhau

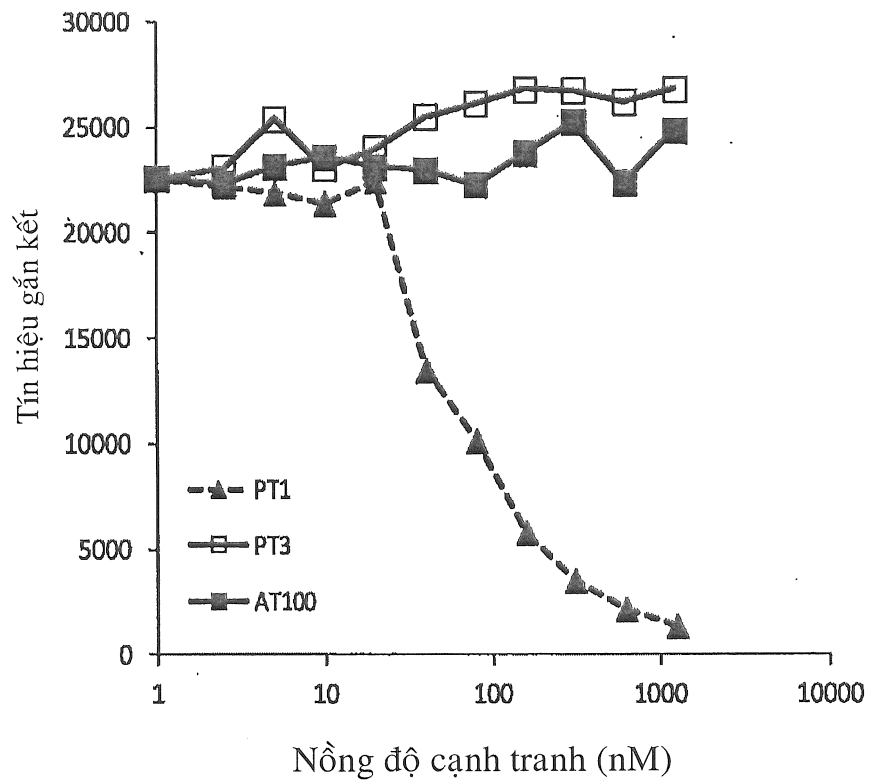


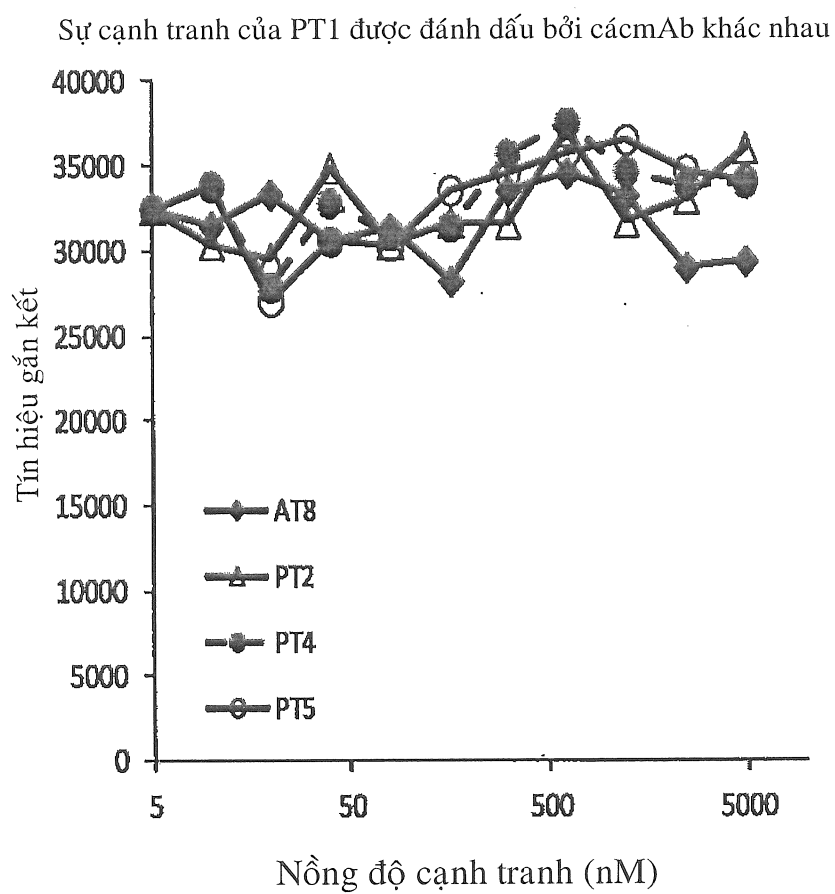
FIG. 2B

FIG. 3A

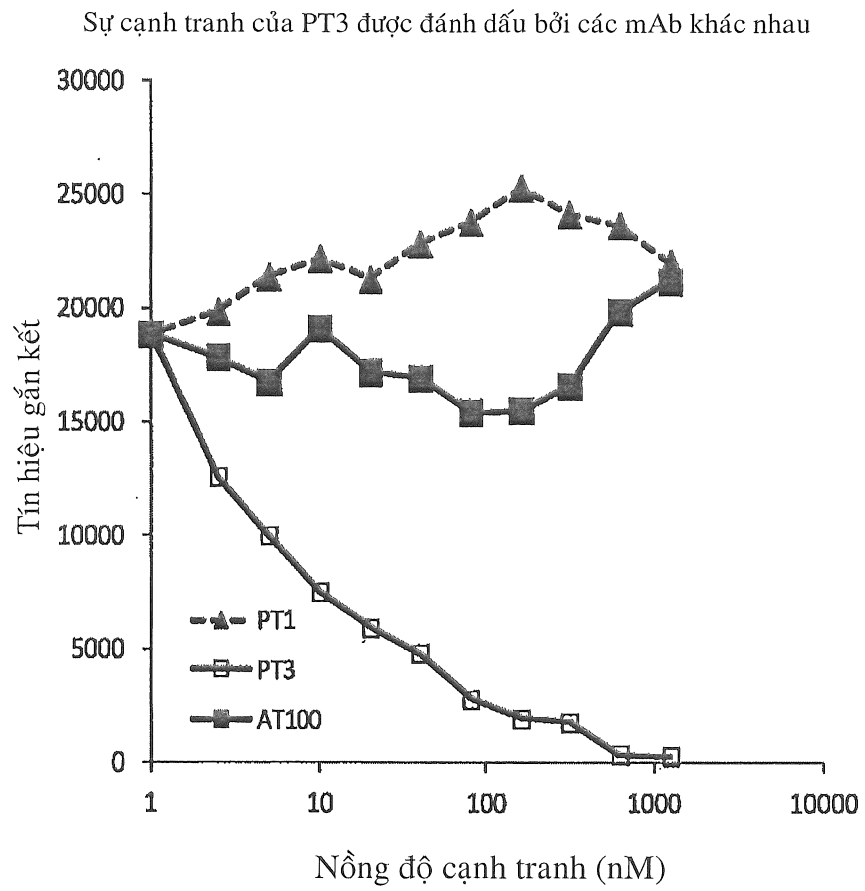


FIG. 3B

Sự cạnh tranh của PT3 được đánh dấu bởi các mAb khác nhau

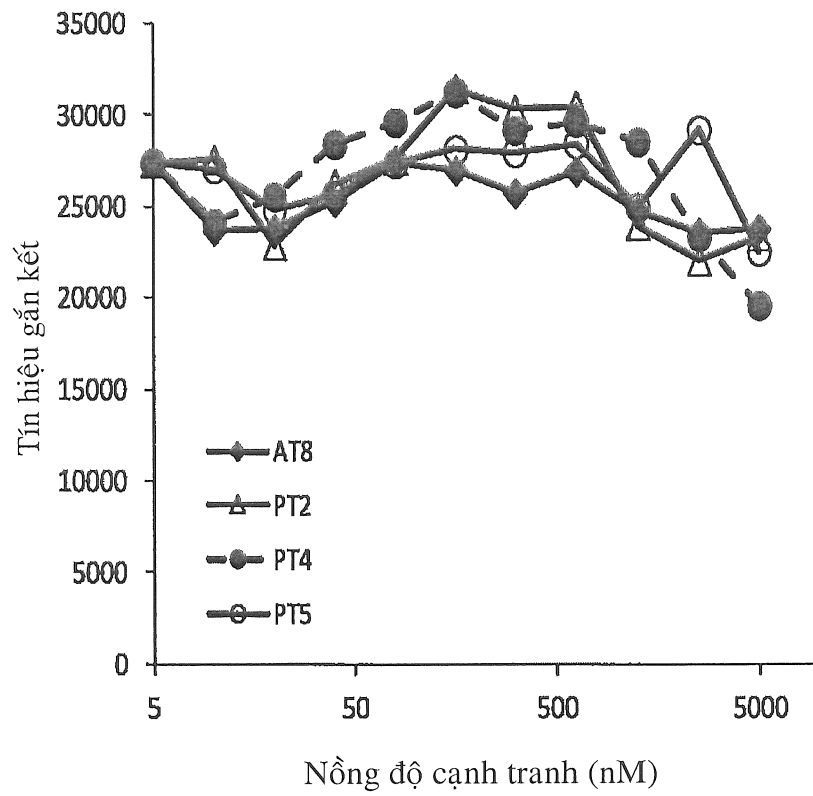


FIG. 4

Sự cạnh tranh của AT100 được đánh dấu bởi các mAb khác nhau

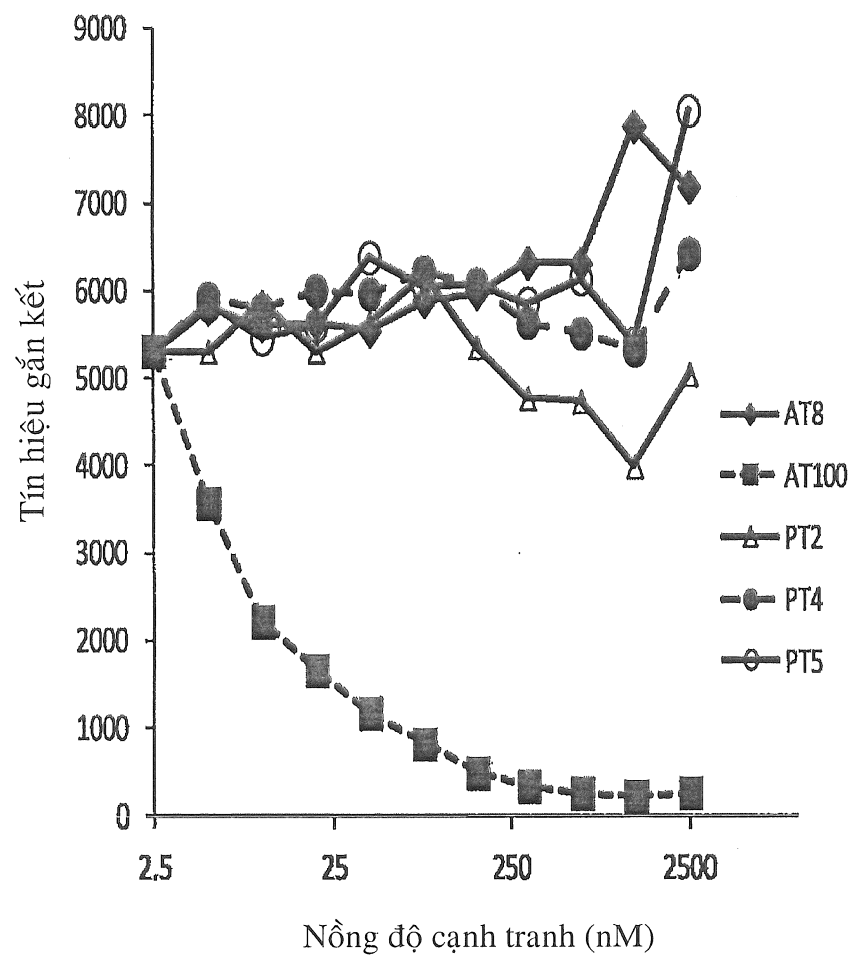


FIG. 5

Sự cạnh tranh của HT7 được đánh dấu bởi các mAb khác nhau

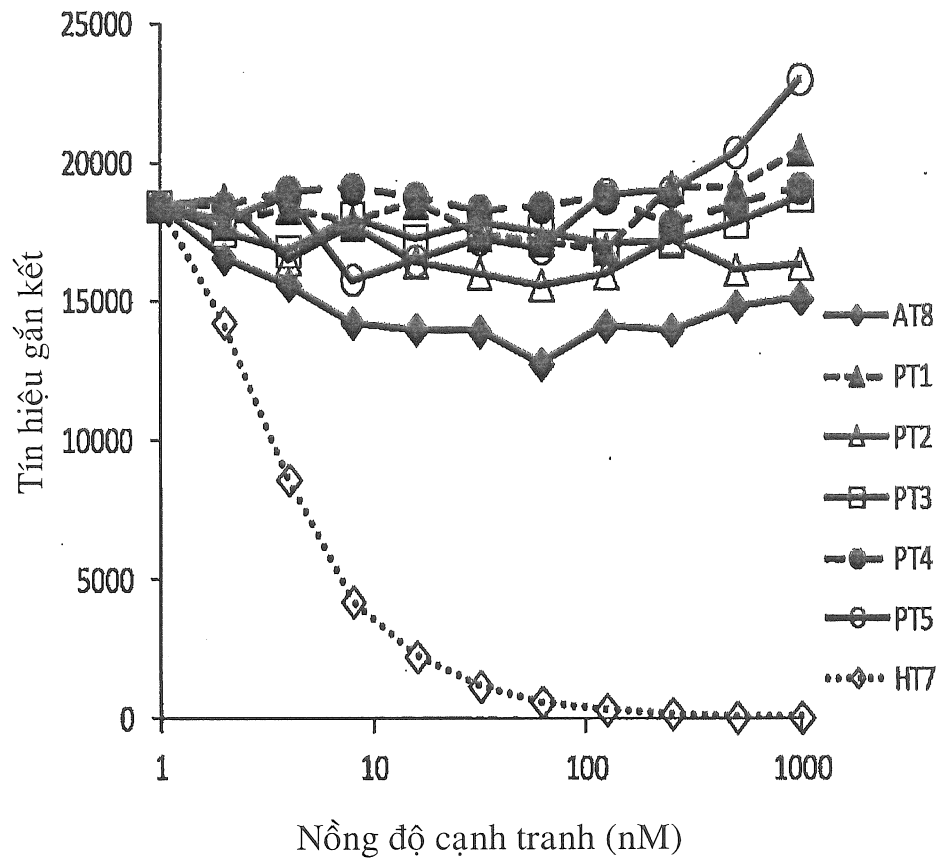


FIG. 6A

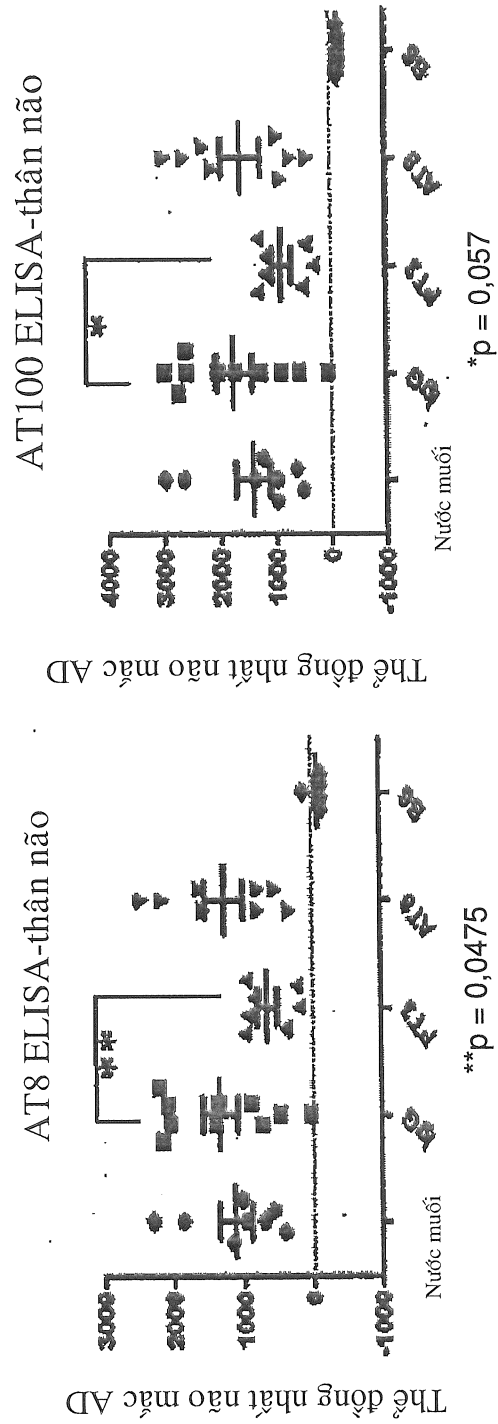


FIG. 6B

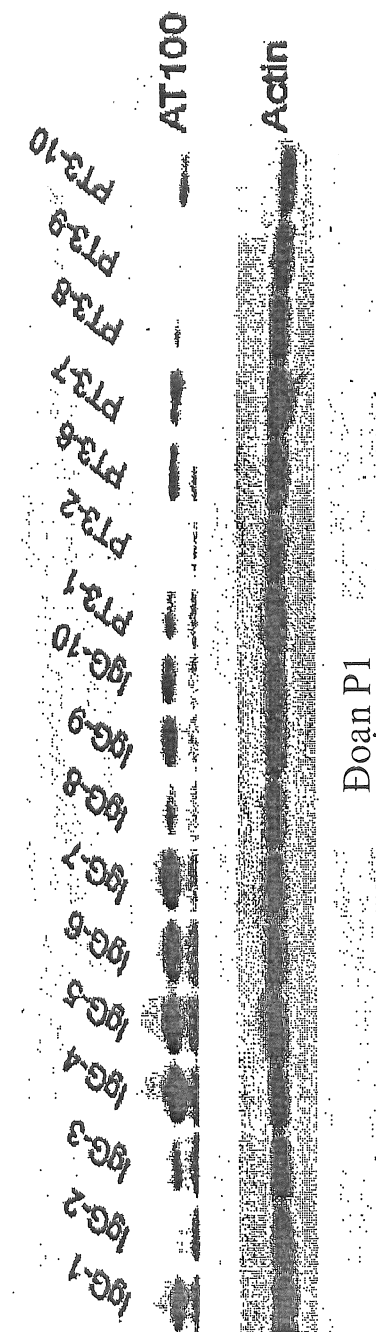
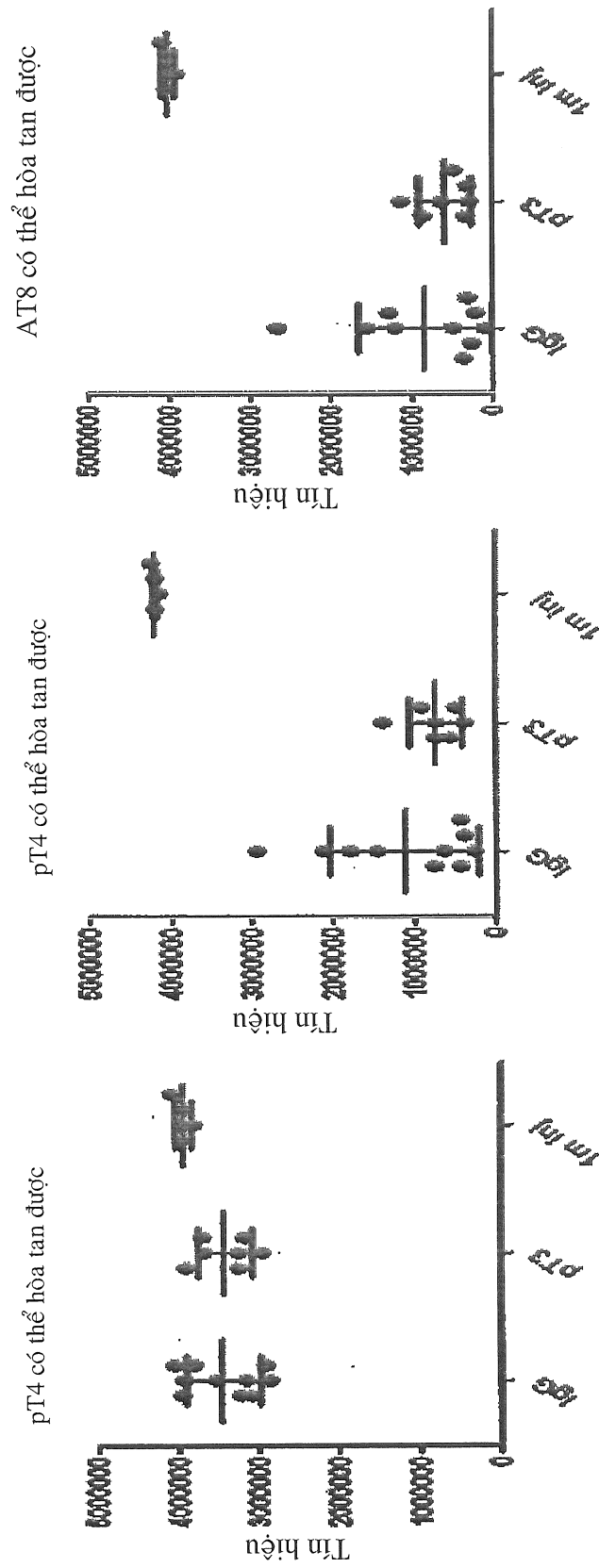


FIG. 7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Biotech, Inc.

<120> KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC KHÁNG PHF-TAU VÀ POLYNUCLEOTIT MÃ HÓA VÙNG BIẾN ĐỔI CHUỖI NẶNG HOẶC VÙNG BIẾN ĐỔI CHUỖI NHẸ CỦA KHÁNG THỂ NÀY

<130> CEN5316WOPCT

<150> 61/577817

<151> 2011-12-20

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 352

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 260 265 270

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 381

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 2

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

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

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

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

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 410

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro

145					150					155					160
Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro
				165					170					175	
Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly
			180					185					190		
Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser
		195					200					205			
Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys
	210					215					220				
Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys
225					230					235					240
Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val
				245					250					255	
Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly
			260					265					270		
Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr
		275					280					285			
Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly
	290					295					300				
Gln	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln
305					310					315					320
Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly
				325					330					335	
Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys
			340					345					350		
Ala	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr	Lys	Ser	Pro	Val	Val

355				360				365							
Ser	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly
370				375				380							
Ser	Ile	Asp	Met	Val	Asp	Ser	Pro	Gln	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Asp	Glu
385				390				395				400			
Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Gln	Gly	Leu						
405				410											

<210>	4
<211>	383
<212>	PRT
<213>	Người thông tuệ
<400>	4

Met	Ala	Glu	Pro	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Met	Glu	Asp	His	Ala	Gly
1				5					10					15	
Thr	Tyr	Gly	Leu	Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His
			20					25					30		
Gln	Asp	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Lys	Ala	Glu	Glu	Ala
		35					40					45			
Gly	Ile	Gly	Asp	Thr	Pro	Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val
	50					55					60				
Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val	Ser	Lys	Ser	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp
65					70					75					80
Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro
				85					90					95	
Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg
			100					105					110		
Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly
		115					120					125			

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 441

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285

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

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 6

<211> 441

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285

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

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 7

Ser Ser Trp Met Gly

1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 8

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

Gly

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 9

Ser	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Arg	Phe	Ala	Asn
1				5					10

<210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 10

Arg	Ser	Ser	Glu	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1				5					10					15	

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 11

Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

<210> 12

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 12

Met Gln Tyr Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 13

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 14

Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asn Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người thông tuệ

<400> 15

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 17

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 18

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 20

Leu Pro Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 21

Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Phe Ala
1 5

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 22

Ser Glu Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 23

Arg Met Ser
1

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 24

Tyr Leu Glu Tyr Pro Leu
1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 26

Ser Lys Gly Gly Asn
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 27

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala
1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 28

Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
1 5

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 29

Arg Ala Asn
1

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 30

Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
1 5

<210> 31
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 31
 caggttcagc tgcagcagtc tggaactgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata
 60
 tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt agtccttga tgggggtgggt taagcagagg
 120
 cctggacatg gccttgagtg gattggagac attttacctg gaagtgggtg tactaactac
 180
 aatgagaggt tcaagggcaa ggccctcattc actgcagaaa catcctccaa cacagcctac
 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgt aagaagctac
 300
 tatgattacg accgctttgc taactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca
 357

<210> 32
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 32
 gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctctggaga gtcagtttcc
 60
 atctcctgca ggtctagtga gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg
 120
 ttctctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctcttgatat atcggatgtc caaccttgcc
 180
 tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc
 240
 agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaatatct agaatatccg
 300
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa
 336

<210> 33
 <211> 354

<212> ADN

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 33

gaagtgaagc tgggtggagtc tggggggagac ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcc a tgtcttgggt tcgccagaat
120

ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcattc attagtaagg gtggtaacac ctactatcca
180

aacagcgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctgtacctg
240

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccctttatt actgtgcaag aggctggggg
300

gattacgggt ggtttgctta ctggggccaa gtgactctgg tcactgtctc tgca
354

<210> 34

<211> 321

<212> ADN

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 34

gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact
60

atcacttgca aggcgagtc ggacattaat aggtatttaa actggttcca gcagaaacca
120

gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tgctagatgg ggtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tactctctca ccatcagcag cctggattat
240

gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcgggtgat
300

gggaccaagc tggagctgaa a
321

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 35

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

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

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

Gly Asp Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ser Phe Thr Ala Glu Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Val Arg Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Arg Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 36

<211> 112

<212> PRT

<213> Chuột nhất nhà

<400> 36

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Glu Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Tyr
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 37

<211> 118

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 37

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> Chuột nhắt nhà

<400> 38

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit tau được phosphoryl hóa tương ứng với các gốc 194-211 của
tau đối chứng

<220>

<221> Phosphoryl hóa

<222> (9)..(9)

<220>

<221> Phosphoryl hóa

<222> (12)..(12)

<400> 39

Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg
1				5					10					15	

Ser Arg