(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) **1-0032517**

(51)[7] **C07K 16/18**; C07K 16/28

(13) **B**

(21) 1-2018-01376
(22) 30/09/2016
(86) PCT/EP2016/073411 30/09/2016
(87) WO 2017/055540 06/04/2017
(30) 15188064.8 02/10/2015 EP
(45) 25/07/2022 412
(43) 27/08/2018 365A
(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
(72) DUERR, Harald (DE); FENN, Sebastian (DE); GOEPFERT, Ulrich (DE); IMHOF-JUNG, Sabine (DE); KLEIN, Christian (DE); LARIVIERE, Laurent (FR); MOLHOJ, Michael (DK); REGULA, Joerg Thomas (DE); RUEGER, Petra (DE); SCHAEFER, Wolfgang (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG A-BETA CỦA NGƯỜI/THỤ THỂ TRANSFERIN CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người và thụ thể transferin của người, phương pháp sản xuất kháng thể này, dược phẩm chứa kháng thể này, và sử dụng nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khoảng 70% trường hợp bị chứng mất trí là do bệnh Alzheimer mà gắn liền với sự tổn thương chọn lọc các vùng não và các mạng thần kinh quan trọng trong sự nhận thức. Bệnh Alzheimer được đặc trưng bởi các đám rối sợi thần kinh cụ thể là trong các nơron hình tháp của vùng hải mã và nhiều mảng bám amyloit chứa phần lớn là lõi lớp lắng đọng amyloit dày đặc và các vầng ít đày đặc hơn.

Các mảng bám viêm thần kinh ngoại bào chứa lượng lớn chủ yếu là peptit dạng sợi được gọi là "amyloit β", "A-beta", "Aβ4", "β-A4" hoặc "Aβ"; xem Selkoe, Ann. Rev. Cell Biol. 10 (1994) 373-403; Koo PNAS 96 (1999) 9989-9990; US 4,666,829; Glenner BBRC 12 (1984) 1131). Amyloit này được lấy từ "protein tiền chất Alzheimer/protein tiền chất P-amyloit" (APP). APP là glycoprotein tích hợp vào màng (xem Sisodia PNAS 89 (1992) 6075) và được phân cắt theo cách phân giải protein bên trong trong trình tự AP bởi proteaza, α-secretaza màng bào tương (xem Sisodia (1992), Joe. cit.). Hơn nữa, ngoài hoạt tính secretaza, cụ thể là hoạt tính β-secretaza và γ-secretaza dẫn đến giải phóng amyloit-β (Aβ) ngoại bào chứa 39 axit amin (Aβ39), 40 axit amin (Aβ 40), 42 axit amin (Aβ 42) hoặc 43 axit amin (Aβ 43) (xem Sinha PNAS 96 (1999) 11094-1053; Price, Science 282 (1998) 1078-1083; WO 00/72880 hoặc Hardy, TINS 20 (1997) 154).

Lưu ý là A-beta có vài dạng có trong tự nhiên, theo đó các dạng xuất hiện ở người là các dạng Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 và Aβ43 được đề cập ở trên. Dạng chiếm ưu thế nhất, Aβ42, có trình tự axit amin (bắt đầu từ đầu tận N): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 05). Ở dạng Aβ41, Aβ40, Aβ39, axit amin đầu tận C A, IA và VIA bị thiếu, một cách

tương ứng. Ở dạng Aβ43, gốc threonin bổ sung được chứa ở đầu tận C của trình tự nêu trên.

Thời gian cần để cấu tạo nhân các sợi Aβ40 được thể hiện là lâu hơn đáng kể so với thời gian để cấu tạo nhân các sợi Aβ42 (xem ví dụ Lansbury, Jr., P. T. và Harper, J. D., Ann. Rev. Biochem. 66 (1997) 385-407). Như đã được nêu trong tài liệu của Wagner (J. Clin. Invest. 104 (1999) 1239-1332) Aβ42 thường gặp hơn khi gắn liền với mảng bám viêm thần kinh và được coi là dễ tạo thành các sợi nhỏ hơn ở cấp độ in vitro. Cũng đã có đề xuất rằng Aβ42 sử dụng làm "nhân" trong quá trình polyme hóa phụ thuộc vào sự hình thành nhân của peptit Aβ không kết tinh được sắp đặt (xem ví dụ Jarrett, Cell 93 (1993) 1055-1058). Quá trình xử lý APP bị biến đổi và/hoặc việc tạo ra các mảng bám ngoại bào chứa các chất lắng đọng không chỉ được biết đến ở bệnh lý Alzheimer mà cả ở đối tượng bị các rối loạn thần kinh khác và/hoặc rối loạn thoái hóa thần kinh. Các rối loạn này bao gồm, không kể những bệnh khác, hội chứng Down, chảy máu não di truyền với chứng thoái hóa dạng tinh bột kiểu Hà lan, bệnh Parkinson, ALS (bệnh xơ cứng cột bên tẹo cơ), bệnh Creutzfeldt Jacob, chứng mất trí liên quan đến HIV và bệnh dây thần kinh vận động.

Cho đến nay, chỉ có các chương trình can thiệp y tế hạn chế đối với các bệnh liên quan đến amyloit đã được mô tả. Ví dụ, chất ức chế cholinesteraza như galantamin, rivastigmin hoặc donepezil được thảo luận là có lợi cho các bệnh nhân Alzheimer có tình trạng bệnh ở mức độ từ nhẹ đến trung bình. Tuy nhiên, các sự kiện bất lợi cũng được thông báo do tác động tiết cholin của thuốc này. Trong các phương pháp điều trị tăng cường tiết axetyl cholin tạo ra một số tác dụng về mặt triệu chứng, đáp ứng trị liệu không thỏa đáng cho phần lớn các bệnh nhân được điều trị. Người ta ước tính rằng sự cải thiện nhận thức đáng kể chỉ xuất hiện ở khoảng 5% bệnh nhân được điều trị và có ít bằng chứng cho thấy rằng việc điều trị làm thay đổi đáng kể quá trình tiến triển của bệnh.

Kết quả là vẫn có nhu cầu lâm sàng to lớn để điều trị hiệu quả hơn và cụ thể là các chất mà có thể kìm hãm hoặc làm trễ sự tiến triển của bệnh. Chất đối kháng thụ thể-NMDA, như memantin, đã được sử dụng gần đây.

Tuy nhiên, các sự kiện bất lợi đã được thông báo do tác động dược lý. Hơn nữa, phương pháp điều trị bằng chất đối kháng thụ thể NMDA này có thể chỉ được coi là các giải pháp triệu chứng và chứ không làm biến đổi bệnh.

Các phương pháp điều biến miễn dịch để điều trị các rối loạn liên quan đến amyloit cũng đã được đề xuất. WO 99/27944 bộc lộ thể liên hợp mà chứa các phần của peptit A-beta và phân tử chất mang theo đó phân tử chất mang này nên tăng cường đáp ứng miễn dịch. Một phương pháp gây miễn dịch chủ động khác được đề cập trong WO 00/72880, trong đó các đoạn A-beta cũng được sử dụng để gây ra đáp ứng miễn dịch.

Các phương pháp gây miễn dịch thụ động với các kháng thể kháng A-beta thông thường cũng đã được đề xuất trong WO 99/27944 hoặc WO 01/62801 và các kháng thể được làm giống như của người đặc hiệu trực tiếp kháng các phần của A-beta được mô tả trong WO 02/46237, WO 02/088306 và WO 02/088307. WO 00/77178 mô tả các kháng thể gắn kết trạng thái chuyển tiếp được chấp nhận thông qua β-amyloit trong quá trình thủy phân. WO 03/070760 bộc lộ phân tử kháng thể nhận biết hai trình tự axit amin không liên tục trên peptit A-beta.

WO 2014/033074 đề cập đến con thoi hàng rào máu não mà gắn kết với thụ thể trên hàng rào máu não và phương pháp sử dụng con thoi này. Việc phân phối thuốc qua hàng rào máu não của protein dung hợp IgG với kháng thể đơn dòng thụ thể transferin được thông báo bởi Pardridge, W. (Exp. Opin. Drug Deliv. 12 (2015) 207-222). Yu, Y.J. et al. (Sci. Translat. Med. 6 (2014) 261ra154-261ra154) đã thông báo rằng kháng thể đặc hiệu kép trị liệu vượt qua hàng rào máu não ở động vật linh trưởng không phải người. Việc tan rã của mảng bám amyloit trong não của chuột chuyển gen bệnh Alzheimer được dùng dưới da hằng ngày kháng thể đặc hiệu kép hóa trị bốn hướng đích thụ thể transferin và peptit abeta amyloit được thông báo bởi Sumbria, R.K., et al. (Mol. Pharm. 10 (2013) 3507-3513). Niewoehner, J., et al. (Neuron 81 (2014) 49-609 đã thông báo khả năng xâm nhập vào não và công hiệu của kháng thể trị liệu tăng bằng cách sử dụng phân tử con thoi hóa trị một.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể (chiều dài đầy đủ) chứa hai cặp của mỗi chuỗi nhẹ kháng thể (chiều dài đầy đủ) và chuỗi nặng kháng thể (chiều dài đầy đủ), trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp trong số cặp của chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ) và chuỗi nhẹ (chiều dài đầy đủ) gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một trong các chuỗi nặng của kháng thể (chiều dài đầy đủ), trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong số các chuỗi nhẹ kháng thể (chiều dài đầy đủ) chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong số các chuỗi nặng kháng thể (chiều dài đầy đủ) chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) và miền chuỗi nặng không đổi 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Theo một phương án, đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit.

Theo một phương án, đầu tận N của miền biến đổi chuỗi nặng của đoạn Fab được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ hoặc đầu tận C của tác nhân liên kết peptit.

Theo một phương án,

a) chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ được dung hợp với đoạn Fab bổ sung có các gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C tripeptit LSP trong đó prolin của nó được dung hợp trực tiếp với gốc axit amin thứ nhất của đoạn Fab bổ sung hoặc của tác nhân liên kết peptit qua liên kết peptit, và

b) chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ mà không được dung hợp với đoạn Fab bổ sung có các gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C tripeptit LSP, hoặc SPG, hoặc PGK.

Theo một phương án, kháng thể (chiều dài đầy đủ) là

a) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người,

b) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người,

c) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G,

d) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G,

e) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng tương ứng còn lại,

f) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng tương ứng còn lại,

g) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, I253A, H310A và H435A trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng tương ứng còn lại, hoặc

h) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T và T256E trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng tương ứng còn lại.

Theo một phương án, kháng thể (chiều dài đầy đủ) là

a) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người,

b) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người,

c) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G,

d) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G,

e) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng tương ứng còn lại,

f) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng tương ứng còn lại,

g) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, I253A, H310A và H435A trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng tương ứng còn lại,

h) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T và T256E trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng tương ứng còn lại, hoặc

i) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, H310A, H433A và Y436A trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng

và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng tương ứng còn lại.

Theo một phương án, đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng chứa đột biến T366W, hoặc với đầu tận C của chuỗi nặng chứa các đột biến T366S, L368A, và Y407V.

Theo một phương án,

kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng tương ứng còn lại, và

đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng chứa đột biến T366W, hoặc với đầu tận C của chuỗi nặng chứa các đột biến T366S, L368A, và Y407V.

Theo một phương án của tất cả các khía cạnh, vị trí gắn kết A-beta của người chứa trình tự VH như trong SEQ ID NO: 18, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó, và trình tự VL như trong SEQ ID NO: 19, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo một phương án của tất cả các khía cạnh, vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa trình tự VH như trong SEQ ID NO: 20, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó, và trình tự VL như trong SEQ ID NO: 21, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép chứa

i) chuỗi nhẹ với trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 01 là 70% hoặc lớn hơn,

ii) chuỗi nặng với trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 02 là 70% hoặc lớn hơn,

iii) chuỗi nhẹ với trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 03 là 70% hoặc lớn hơn, và

iv) đoạn Fab chuỗi nặng với trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 04 là 70% hoặc lớn hơn,

trong đó

SEQ ID NO: 01 có trình tự axit amin

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG
ASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNMPITFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC,

SEQ ID NO: 02 có trình tự axit amin

VELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE
WVSAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG,

SEQ ID NO: 03 có trình tự axit amin

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKL
LIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNYASSNV
DNTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSC, và

SEQ ID NO: 04 có trình tự axit amin

QSMQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLE
WIGYIWSGGSTDYASWAKSRVTISKTSTTVSLKLSSVTAADTAVYYCAR
RYGTSYPDYGDASGFDPWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT

ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa chuỗi nhẹ (chiều dài đầy đủ) mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 01, chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ) mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 02, chuỗi nhẹ (chiều dài đầy đủ) mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 03, và đoạn Fab kháng thể chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 04.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể đơn dòng.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là tế bào chủ chứa axit nucleic nêu trong bản mô tả này mã hóa kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này chứa các bước sau:

a) nuôi cấy tế bào chủ nêu trong bản mô tả này sao cho kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra, và

b) thu hồi kháng thể đặc hiệu kép từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy và nhờ đó tạo ra kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này và chất gây độc tế bào.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này và chất mang dược dụng.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là kháng thể nêu trong bản mô tả này để sử dụng làm thuốc.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong điều trị bệnh Alzheimer.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong ức chế/làm chậm sự hình thành mảng bám trong não.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong làm phân hủy mảng bám β-amyloit.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này trong sản xuất thuốc.

Theo một phương án, thuốc là để điều trị các rối loạn amyloit.

Theo một phương án, thuốc để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh gắn liền với tạo ra amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit. Theo một phương án, bệnh này được chọn từ nhóm bao gồm chứng mất trí, bệnh Alzheimer, bệnh dây thần kinh vận động, hội chứng Down, bệnh Creutzfeldt Jacob, chứng chảy máu não di truyền với chứng thoái hóa dạng tinh bột kiểu Hà lan, bệnh Parkinson, chứng mất trí liên quan đến HIV, ALS hoặc rối loạn thần kinh liên quan đến lão hóa. Theo một phương án được ưu tiên, thuốc được dùng để điều trị bệnh Alzheimer.

Theo một phương án, thuốc được dùng để ức chế/làm chậm sự hình thành mảng bám trong não. Theo một phương án, thuốc là thuốc làm tan rã mảng bám β-amyloit.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh gắn liền với sự thoái hóa amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh Alzheimer bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là phương pháp làm tan rã mảng bám β-amyloit trong não của cá thể bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này để làm tan rã mảng bám β-amyloit trong não.

Một khía cạnh nêu trong bản mô tả này là phương pháp ức chế/làm chậm sự hình thành mảng bám trong não của cá thể bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này để ức chế/làm chậm sự hình thành mảng bám trong não.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các mô-đun đime hóa gắn phần phình vào phần lõm (knobs into holes) và việc sử dụng chúng trong thiết kế kháng thể được mô tả trong tài liệu của Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, Volume 2, Number 1, February 1996, các trang 73-73. Cầu đisulphua bổ sung trong miền CH3 được báo cáo trong tài liệu: Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681.

Thông tin chung liên quan đến trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch của người được nêu trong: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Trong bản mô tả này, các vị trí axit amin của tất cả các vùng cố định và các miền của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đánh số theo hệ thống đánh số Kabat được mô tả trong Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) và được gọi là "đánh số theo Kabat" trong bản mô tả này. Cụ thể là, hệ thống đánh số Kabat (xem các trang 647-660) của Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) được sử dụng cho miền cố định chuỗi nhẹ CL của isotyp kappa và lambda, và hệ thống đánh số chỉ số Kabat EU (xem các trang 661-723) được sử dụng cho miền cố định chuỗi nặng (CH1, vùng bản lề, CH2 và CH3, trong bản mô tả này còn được làm rõ bằng cách nói đến "đánh số theo chỉ số Kabat EU" trong trường hợp này).

I. Định nghĩa

"Hàng rào máu não" hoặc "BBB" dùng để chỉ hàng rào sinh lý giữa hệ tuần hoàn ngoại vi và não và tủy sống được tạo ra bằng mối liên hệ chặt chẽ bên trong màng tế bào nội bì vi mạch máu não, tạo ra hàng rào chặt chẽ hạn chế sự vận chuyển của các phân tử vào trong não, ngay cả với các phân tử rất nhỏ như ure (60 Daltons). BBB trong não, hàng rào máu não tủy sống bên trong tủy sống, và hàng rào máu-võng mạc bên trong võng mạc là hàng rào mạch máu liên tục bên trong CNS, và trong bản mô tả này được gọi chung là hàng rào máu não hoặc BBB. BBB cũng bao gồm hàng rào máu-CSF (dây đám rối màng mạch) nơi mà hàng rào này được cấu thành từ tế bào đệm màng ống hơn là tế bào nội mạc mạch.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng A-beta của người" và "kháng thể gắn kết đặc hiệu với A-beta của người" dùng để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết peptit A-beta của người với ái lực thích hợp sao cho kháng thể có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán và/hoặc trị liệu trong hướng đích peptit A-beta.

Lưu ý là A-beta của người có vài dạng có trong tự nhiên, theo đó các dạng của người được đề cập là Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 và Aβ43. Dạng phong phú nhất, Aβ42, có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 05. Trong Aβ41, Aβ40, Aβ39, các axit amin đầu tận C A, IA và VIA bị thiếu, một cách tương ứng. Ở dạng Aβ43 gốc threonin bổ sung được bao gồm ở đầu tận C của SEQ ID NO: 05. Theo một phương án, protein A-beta của người có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 05.

Vì vậy, thuật ngữ này cũng bao gồm kháng thể mà gắn kết vào đoạn được làm ngắn của polypeptit A-beta của người.

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

"Thụ thể hàng rào máu não" (được viết tắt là "BBBR" trong bản mô tả này) là protein thụ thể được liên kết màng ngoại bào được biểu hiện trên tế bào nội mô của não mà có khả năng vận chuyển các phân tử qua BBB hoặc được sử dụng để vận chuyển phân tử được sử dụng ngoại sinh. Các ví dụ về BBBR trong bản mô tả này bao gồm: thụ thể transferin (TfR), thụ thể insulin, thụ thể yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF-R), thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp bao gồm không giới hạn protein liên quan đến thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp 1 (LRP1) và protein liên quan đến thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp 8 (LRP8), và yếu tố tăng trưởng giống yếu tố tăng trưởng biểu bì gắn kết heparin (HB-EGF). Một BBBR được ưu tiên là thụ thể transferin (TfR).

"Thụ thể transferin" ("TfR") là glycoprotein xuyên màng (với trọng lượng phân tử là khoảng 180.000 Da) bao gồm hai tiểu phần nhỏ được liên kết đisulphua (mỗi tiểu phần có trọng lượng phân tử biểu kiến là khoảng 90.000 Da) tham gia vào quá trình hấp thụ sắt ở động vật có xương sống. Theo một phương án, TfR như được đề cập trong bản mô tả này là TfR của người chứa trình tự axit amin được nêu trong Schneider et al (Nature 311 (1984) 675-678), ví dụ. Theo một phương án, thụ thể transferin của người có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22.

"Kháng thể đa đặc hiệu" để chỉ kháng thể có các tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất hai epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên hoặc hai kháng nguyên khác nhau. Kháng thể đa đặc hiệu được lấy làm ví dụ có thể gắn kết với cả BBBR và kháng nguyên não. Kháng thể đa đặc hiệu có thể được tạo ra là kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn kháng thể (ví dụ kháng thể đặc hiệu kép $F(ab')_2$) hoặc tổ hợp của nó (ví dụ, kháng thể có chiều dài đầy đủ cộng đoạn scFv hoặc Fab bổ sung). Các kháng thể được thiết kế với hai, ba hoặc nhiều hơn ba (ví dụ 4) vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng cũng đã được thông báo (xem, ví dụ, US 2002/0004587 Al).

"Khung nhận của người" đối với mục đích trong bản mô tả này là khung chứa trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được lấy từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như được định nghĩa dưới đây. Khung nhận của người "được lấy từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể chứa cùng trình tự axit amin của nó, hoặc có thể chứa các thay đổi trong trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lượng các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, khung nhận VL của người có trình tự giống với trình tự khung globulin miễn dịch VL của người hoặc trình tự khung liên ứng của người.

"Ái lực" dùng để chỉ độ bền của tổng cộng của tương tác không cộng hóa trị giữa một ví trí gắn kết của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi được quy định khác, trong bản mô tả này, "ái lực gắn kết" dùng để chỉ ái lực gắn kết thực chất mà phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tác Y của nó có thể thông thường được biểu diễn bằng hằng số phân ly (k_d). Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp nêu trong bản mô tả này.

Kháng thể có "ái lực được thuần thục" dùng để chỉ kháng thể với một hoặc nhiều các thay đổi trong một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR), so với kháng thể bố mẹ mà không có các thay đổi này, các thay đổi này dẫn đến cải thiện ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

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

Thuật ngữ "khả năng gây độc tế bào do tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC)" là một chức năng được điều tiết bằng cách gắn kết thụ thể Fc và dùng để chỉ sự phân giải tế bào đích bởi kháng thể nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của tế bào thực hiện. ADCC được đo theo một phương án bằng cách điều trị bằng chế phẩm của tế bào hồng cầu biểu hiện CD19 (ví dụ tế bào K562 biểu hiện CD19 tái tổ hợp của người) với kháng thể nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của tế bào thực hiện như PBMC (tế bào máu đơn nhân ngoại vi) mới được phân lập hoặc tế bào thực hiện được tinh chế từ các lớp đệm, như tế bào bạch cầu đơn nhân to hoặc tế bào NK (tế bào tiêu diệt tự nhiên). Tế bào mục tiêu được đánh dấu bằng ^{51}Cr và sau đó được ủ với kháng thể. Các tế bào đã đánh dấu được ủ với tế bào thực hiện và dịch nổi bề mặt được phân tích về ^{51}Cr được giải phóng. Các đối chứng bao gồm ủ tế bào nội mạc đích với tế bào thực hiện nhưng không có kháng thể. Khả năng của kháng thể để gây ra các bước ban đầu điều tiết ADCC được nghiên cứu bằng cách đo khả năng gắn kết của chúng vào tế bào biểu hiện thụ thể Fcγ, như các tế bào, biểu hiện tái tổ hợp FcγRI và/hoặc FcγRIIA hoặc tế bào NK (chủ yếu biểu hiện FcγRIIIA). Theo một phương án được ưu tiên, gắn kết vào FcγR trên tế bào NK được đo.

"Đoạn kháng thể" dùng để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn nhưng chứa một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết vào kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn này gắn vào đó. Các ví dụ về đoạn kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody); kháng thể mạch thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các đoạn kháng thể.

Thuật ngữ kháng thể "thể khảm" dùng để chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được lấy từ loài hoặc nguồn cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được lấy từ loài hoặc nguồn khác.

"Lớp" của kháng thể dùng để chỉ loại miền cố định hoặc vùng cố định mà chuỗi nặng của nó có. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một số lớp

trong số này có thể được chia tiếp thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 và IgA_2. Các miền cố định chuỗi nặng tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α, δ, ε, γ và μ, một cách tương ứng.

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" trong bản mô tả này dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá hủy tế bào. Chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ (ví dụ, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu); chất hoặc thuốc hóa trị (ví dụ, metotrexat, adriamixin, vinca alkaloit (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomyxin C, clorambuxil, daunorubixin hoặc các chất can thiệp khác); chất ức chế sinh trưởng; enzym và đoạn của chúng như enzym phân giải axit nucleic; chất kháng sinh; độc tố như độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các đoạn và/hoặc các biến thể của chúng; và các chất chống khối u hoặc các chất chống ung thư khác nhau được nêu dưới đây.

Thuật ngữ "khả năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC)" dùng để chỉ sự phân giải tế bào cảm ứng bởi kháng thể nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của bổ thể. CDC được đo theo một phương án, bằng cách điều trị tế bào nội mạc ở người biểu hiện CD19 bằng kháng thể nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của bổ thể. Tế bào theo một phương án, được đánh dấu bằng calcein. CDC được phát hiện là kháng thể gây sự phân giải tế bào mục tiêu 20% hoặc lớn hơn ở nồng độ là 30μg/mL hay không. Gắn kết vào yếu tố bổ thể C1q có thể được đo bằng ELISA. Trong thử nghiệm này về nguyên tắc đĩa ELISA được phủ bằng các khoảng nồng độ của kháng thể, với C1q người hoặc huyết thanh người được tinh chế được bổ sung. Việc gắn kết với C1q được phát hiện bằng kháng thể trực tiếp kháng C1q sau đó là thể liên hợp được đánh dấu peroxidaza. Việc phát hiện sự gắn kết (gắn kết tối đa Bmax) được đo là mật độ quang ở 405 nm (OD405) đối với cơ chất peroxidaza ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etylbenzthiazolin-6-sulfonat (6)]).

"Chức năng tác động" dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, mà khác với lớp kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động của kháng thể bao gồm: gắn kết C1q và khả năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); gắn kết thụ thể Fc; khả năng gây độc tế bào được điều tiết bởi tế bào phụ thuộc kháng thể

(ADCC); thực bào; điều hòa giảm của các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B); và sự hoạt hóa tế bào B.

Chức năng tác động phụ thuộc sự gắn kết thụ thể Fc có thể được điều tiết bởi sự tương tác của vùng Fc của kháng thể với thụ thể Fc (FcR), mà là thụ thể bề mặt tế bào đặc hiệu hóa trên tế bào sinh huyết. Thụ thể Fc thuộc siêu họ globulin miễn dịch, và được thể hiện là điều tiết bằng cách loại bỏ nguồn bệnh được phủ kháng thể bằng thực bào của phức hợp miễn dịch, và phân giải hồng cầu và các đích tế bào khác khác nhau (ví dụ các tế bào khối u) được bọc bằng kháng thể tương ứng, thông qua khả năng gây độc tế bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (xem ví dụ Van de Winkel, J.G. và Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524). FcR được xác định bằng tính đặc hiệu của chúng đối với isotyp globulin miễn dịch: Thụ thể Fc đối với các kháng thể IgG được gọi là FcγR. Việc gắn kết thụ thể Fc được mô tả ví dụ trong Ravetch, J.V. và Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341; và Gessner, J.E., et al., Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248.

Liên kết ngang của thụ thể đối với vùng Fc của các kháng thể IgG (FcγR) kích khởi rất nhiều chức năng tác động bao gồm thực bào, khả năng gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể, và giải phóng chất điều biến viêm, cũng như sự thanh thải phức hợp miễn dịch và điều hòa quá trình sản xuất kháng thể. Ở người, ba lớp FcγR được mô tả đặc điểm, đó là:

- FcγRI (CD64) gắn kết IgG monome với ái lực lớn và được biểu hiện trên đại thực bào, bạch cầu đơn nhân to, bạch cầu đơn nhân và bạch cầu ưa eozin. Việc cải biến trong vùng Fc IgG ít nhất ở một trong các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327 và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat) làm giảm khả năng gắn kết vào FcγRI. Các gốc IgG2 tại các vị trí 233–236, được thay thế thành IgG1 và IgG4, gắn kết vào FcγRI giảm khoảng 10^3 lần và loại bỏ đáp ứng bạch cầu đơn nhân người với tế bào hồng cầu được làm nhạy bằng kháng thể (Armour, K.L., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613–2624).
- FcγRII (CD32) gắn kết với IgG phức hợp với ái lực từ thấp đến trung bình và được biểu hiện phổ biến. Thụ thể này có thể được chia thành hai phân lớp,

FcγRIIA và FcγRIIB. FcγRIIA được phát hiện ở nhiều tế bào tham gia vào quá trình tiêu diệt (ví dụ đại thực bào, bạch cầu đơn nhân to, bạch cầu trung tính) và dường như có thể hoạt hóa quá trình tiêu diệt. FcγRIIB dường như đóng vai trò trong quá trình ức chế và được phát hiện trên tế bào B, đại thực bào và dưỡng bào và bạch cầu ưa eozin. Trên tế bào B nó dường như có chức năng ức chế quá trình sản xuất globulin miễn dịch khác và chuyển isotyp thành, ví dụ, lớp IgE. Trên đại thực bào, FcγRIIB tác động để ức chế thực bào như được điều tiết qua FcγRIIA. Trên bạch cầu ưa eozin và dưỡng bào dạng B có thể hỗ trợ hoạt hóa các tế bào này thông qua IgE gắn kết vào thụ thể riêng của nó. Việc gắn kết với FcγRIIA giảm được phát hiện ví dụ đối với kháng thể chứa vùng Fc của IgG có các đột biến ít nhất ở một trong số các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292, và K414 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

FcγRIII (CD16) gắn kết IgG với ái lực từ trung bình đến thấp và tồn tại ở hai loại. FcγRIIIA được phát hiện trên tế bào NK, đại thực bào, bạch cầu ưa eozin và một số bạch cầu đơn nhân to và tế bào T và điều tiết ADCC. FcγRIIIB được biểu hiện nhiều trên bạch cầu trung tính. Việc gắn kết vào FcγRIIIA giảm được phát hiện ví dụ đối với kháng thể chứa vùng Fc IgG với đột biến ít nhất ở một trong số các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 và D376 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Việc lập bản đồ các vị trí gắn kết trên IgG1 của người đối với các thụ thể Fc, các vị trí đột biến và phương pháp đo khả năng gắn kết vào FcγRI và FcγRIIA được đề cập ở trên được mô tả trong Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

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

Thuật ngữ "thụ thể Fc" trong bản mô tả này dùng để chỉ thụ thể hoạt hóa được đặc trưng bởi sự có mặt của trình tự ITAM tế bào chất gắn liền với thụ thể này (xem ví dụ Ravetch, J.V. và Bolland, S., Annu. Rev. Immunol. 19 (2001) 275-290). Các thụ thể này là FcγRI, FcγRIIA và FcγRIIIA. Thuật ngữ "không gắn kết của FcγR" để chỉ rằng

ở nồng độ kháng thể là 10 µg/mL, việc gắn kết của kháng thể nêu trong bản mô tả này với tế bào NK là 10% hoặc ít hơn việc gắn kết được phát hiện đối với kháng thể kháng OX40L LC.001 như được thông báo trong WO 2006/029879.

Trong khi IgG4 thể hiện khả năng gắn kết FcR giảm, các kháng thể của các phân lớp IgG khác thể hiện khả năng gắn kết mạnh. Tuy nhiên Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (không có hydrat cacbon Fc), Pro329 và 234, 235, 236 và 237 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, và His435 là các gốc mà cung cấp nếu thay đổi cũng làm giảm khả năng gắn kết FcR (Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., FASEB J. 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; và EP 0 307 434). Theo một phương án, kháng thể nêu trong bản mô tả này là của phân lớp IgG1 hoặc IgG2 và chứa đột biến PVA236, GLPSS331, và/hoặc L234A/L235A. Theo một phương án, kháng thể nêu trong bản mô tả này là của phân lớp IgG4 và chứa đột biến L235E. Theo một phương án, kháng thể còn chứa đột biến S228P.

Thuật ngữ "vùng Fc" trong bản mô tả này được sử dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần vùng cố định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc của trình tự nguyên gốc và vùng Fc biến thể. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) của vùng Fc này có thể có hoặc có thể không có mặt. Trừ khi có quy định khác, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng cố định là theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong tài liệu Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

Kháng thể nêu trong bản mô tả này chứa vùng Fc, theo một phương án, vùng Fc được lấy từ người. Theo một phương án, vùng Fc chứa tất cả các phần của vùng cố định của người. Vùng Fc của kháng thể trực tiếp tham gia vào sự hoạt hóa bổ thể, gắn kết C1q, hoạt hóa C3 và gắn kết thụ thể Fc. Trong khi sự ảnh hưởng của kháng thể lên hệ thống bổ thể phụ thuộc vào các điều kiện nhất định, việc gắn kết vào C1q được gây ra bởi các vị trí gắn kết xác định trong vùng Fc. Các vị trí gắn kết này được biết trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả ví dụ bởi Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-

2560; Brunhouse, R., và Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; và EP 0 307 434. Các vị trí gắn kết này ví dụ là L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat; Trừ khi có quy định khác, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng cố định là theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong tài liệu Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242). Các kháng thể của phân lớp IgG1, IgG2 và IgG3 thường thể hiện sự hoạt hóa bổ thể, gắn kết vào C1q và hoạt hóa C3, trong khi đó IgG4 không hoạt hóa hệ thống bổ thể, không gắn kết vào C1q và không hoạt hóa C3. "Vùng Fc của kháng thể" là thuật ngữ đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được định nghĩa trên cơ sở phân cắt kháng thể nhờ papain. Theo một phương án, vùng Fc là vùng Fc của người. Theo một phương án, vùng Fc là phân lớp IgG4 của người chứa các đột biến S228P và/hoặc L235E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án, vùng Fc là phân lớp IgG1 của người chứa các đột biến L234A và L235A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

"Khung" hoặc "FR" dùng để chỉ các gốc của miền biến đổi mà không phải là các gốc của vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường bao gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3 và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau đây trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Các thuật ngữ "kháng thể có chiều dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn" và "kháng thể toàn phần" được sử dụng trong bản mô tả này theo cách thay thế cho nhau để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự với cấu trúc của kháng thể nguyên gốc hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc nêu trong bản mô tả này. "Kháng thể có chiều dài đầy đủ" là kháng thể chứa vùng biến đổi gắn kết kháng nguyên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (VL, VH) cũng như miền cố định chuỗi nhẹ (CL) và miền cố định chuỗi nặng, CH1, CH2 và CH3. Các miền cố định có thể là miền cố định trình tự nguyên thể (ví dụ miền cố định trình tự nguyên thể của người) hoặc các biến thể trình tự axit amin của chúng. Cụ thể hơn, kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai chuỗi nhẹ kháng thể (mỗi chuỗi nhẹ

chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền cố định chuỗi nhẹ) và hai chuỗi nặng kháng thể (mỗi chuỗi nặng chứa miền biến đổi chuỗi nặng, vùng bản lề và các miền cố định chuỗi nặng CH1, CH2 và CH3). Các gốc axit amin đầu tận C K hoặc GK có thể xuất hiện hoặc không độc lập với nhau trong hai chuỗi nặng kháng thể của kháng thể có chiều dài đầy đủ. Đồng thời, kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể chứa các đoạn bổ sung axit amin, đột biến và khuyết đoạn trong các miền nhưng không khuyết toàn bộ miền.

Các thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ" và "giống cấy tế bào chủ" được sử dụng theo cách thay thế cho nhau và dùng để chỉ tế bào trong đó axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thế hệ sau của tế bào này. Tế bào chủ bao gồm "thể biến nạp" và "tế bào biến nạp", bao gồm tế bào biến nạp sơ cấp và thế hệ sau có nguồn gốc từ chúng, không tính đến số lần cấy chuyển. Thế hệ sau có thể không hoàn toàn giống về thành phần axit nucleic với tế bào bố mẹ, mà có thể chứa đột biến. Thế hệ sau đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn lọc trong tế bào biến nạp ban đầu được bao gồm trong các thuật ngữ này.

"Khung liên ứng của người" là khung đại diện cho các gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất trong một tập hợp trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Nhìn chung, tập hợp trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm trình tự miền biến đổi. Thông thường, phân nhóm trình tự này là phân nhóm như nêu trong tài liệu Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như nêu trong tài liệu Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như nêu trong tài liệu Kabat et al., nêu trên.

Kháng thể "được làm giống như của người" dùng để chỉ kháng thể thể khảm chứa các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ các FR của người. Theo các phương án cụ thể, kháng thể được làm giống như của người về cơ bản sẽ chứa toàn bộ của ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các HVR (ví dụ, CDR) đều tương ứng với các HVR (ví dụ, CDR) của kháng thể không phải của người, và toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các FR đều tương ứng với các FR của kháng thể của người. Kháng thể được làm giống như của người tùy ý có thể chứa ít nhất một phần vùng cố định của kháng thể được lấy từ kháng

thể của người. "Dạng được làm giống như của người" của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, dùng để chỉ kháng thể trải qua quá trình làm giống như của người.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR", trong bản mô tả này, dùng để chỉ mỗi trong số các vùng của miền biến đổi của kháng thể chứa gốc axit amin căng duỗi mà có tính biến đổi rất lớn về trình tự ("vùng quyết định bổ sung" hoặc "CDR") và/hoặc tạo thành các vòng xác định về mặt cấu trúc ("vòng siêu biến"), và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc kháng nguyên ("vị trí tiếp xúc kháng nguyên"). Thông thường, kháng thể chứa sáu HVR; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3).

HVR bao gồm

(a) các vòng siêu biến xuất hiện tại các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) và 96-101 (H3) (Chothia, C. và Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);

(b) Các CDR xuất hiện tại các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.);

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

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

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

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

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật đã được thuần hóa (ví dụ bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ

và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột Rattus). Theo các phương án cụ thể, cá thể hoặc đối tượng là người.

Kháng thể "đã được phân lập" là kháng thể đã được tách ra khỏi một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bằng, ví dụ, kỹ thuật điện di (ví dụ, SDS-PAGE, tập trung theo điểm đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc kỹ thuật sắc ký (ví dụ, HPLC trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo). Để biết tổng quan về các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, xem, ví dụ, tài liệu Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

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

"Axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người" dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc đoạn của chúng), bao gồm (các) phân tử axit nucleic trong một vectơ đơn lẻ hoặc trong các vectơ riêng biệt, và (các) phân tử axit nucleic có mặt tại một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể thu được từ một quần thể kháng thể về cơ bản tương đồng, tức là, các kháng thể cá thể trong quần thể này giống nhau và/hoặc gắn kết vào cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc xuất hiện trong quá trình tạo ra chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng nhỏ. Ngược lại với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường chứa các kháng thể khác nhau hướng tới các yếu tố quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng chỉ hướng tới một yếu tố quyết định trên kháng nguyên. Vì vậy, từ bổ nghĩa "đơn dòng" thể hiện đặc tính của kháng thể là được thu nhận từ một quần thể kháng thể về cơ bản tương đồng, và không được hiểu là yêu cầu phải tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không

giới hạn ở, phương pháp tế bào lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa toàn bộ hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp tiêu biểu khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được trình bày trong bản mô tả này.

"Kháng thể trần" dùng để chỉ kháng thể không được liên hợp với gốc khác loại (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong dược phẩm.

"Kháng thể nguyên gốc" dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên với các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, kháng thể IgG nguyên gốc là glycoprotein dị tetrame khoảng 150.000 dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau được nối với nhau bằng liên kết disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền biến đổi chuỗi nặng hoặc miền biến đổi của chuỗi nặng, theo sau bởi ba miền cố định (CH1, CH2 và CH3), theo đó giữa miền cố định thứ nhất và thứ hai vùng bản lề được bố trí. Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc miền biến đổi của chuỗi nhẹ, theo sau bởi một miền cố định chuỗi nhẹ (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được gán vào một trong hai typ, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên cơ sở trình tự axit amin của miền cố định của nó.

Thuật ngữ "tờ hướng dẫn sử dụng" dùng để chỉ các hướng dẫn thường được đưa vào trong các gói hàng thương mại chứa sản phẩm trị liệu, chứa thông tin về chỉ định, cách sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng sản phẩm trị liệu này.

"Phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin" so với trình tự polypeptit tham chiếu được định nghĩa là phần trăm các gốc axit amin trong trình tự đang quan tâm mà giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp hàng các trình tự này và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm độ đồng nhất trình tự tối đa, và không coi bất kỳ sự thay thế bảo toàn nào là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp hàng nhằm mục đích xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính công bố công khai như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu

biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định các thông số thích hợp để sắp hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, đối với các mục đích trong bản mô tả này, giá trị% độ đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp với tài liệu hướng dẫn sử dụng tại Cơ quan bản quyền Hoa Kỳ (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, được đăng ký tại đó với số đăng ký bản quyền Hoa Kỳ là TXU510087. Chương trình ALIGN-2 được công bố công khai bởi Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 cần được biên dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D số hóa. Tất cả các thông số so sánh trình tự đều được đặt bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong trường hợp ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin,% độ đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã cho với, đối với hoặc so với trình tự axit amin B đã cho (có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin A đã cho có hoặc chứa% độ đồng nhất trình tự axit amin cụ thể với, đối với hoặc so với trình tự axit amin B đã cho) được tính như sau:

100 lần của phân số X/Y

trong đó X là số lượng gốc axit amin được chấm điểm là các ghép cặp giống nhau bởi chương trình sắp hàng trình tự ALIGN-2 trong bước sắp hàng A và B bằng chương trình đó, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Cần phải hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng với chiều dài của trình tự axit amin B, thì% độ đồng nhất trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng với% độ đồng nhất trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả các giá trị% độ đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả này được thu nhận như được mô tả trong đoạn ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "dược phẩm" dùng để chỉ chế phẩm ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính chứa trong đó có tác dụng, và không chứa các thành phần bổ sung mà độc không thể chấp nhận được đối với đối tượng sử dụng chế phẩm này.

"Chất mang dược dụng" dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, mà không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

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

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà liên quan đến việc gắn kết kháng thể vào kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, một cách tương ứng) của kháng thể nguyên gốc thường có cấu trúc tương tự, trong đó mỗi miền chứa bốn vùng khung (FR) bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). (Xem, ví dụ, tài liệu Kindt, T.J. et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), trang 91). Miền VH hoặc VL đơn lẻ có thể là đủ để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể mà gắn kết vào kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể mà gắn kết vào kháng nguyên để sàng lọc thư viện miền VL hoặc VH bổ sung, một cách tương ứng. Xem, ví dụ, Portolano, S. et al., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., Nature 352 (1991) 624-628).

Thuật ngữ "vectơ", trong bản mô tả này, dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân giống axit nucleic khác mà nó được liên kết vào đó. Thuật ngữ này bao gồm vectơ là cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vectơ được tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ mà nó được đưa vào đó. Một số vectơ cụ thể có khả năng điều khiển sự biểu hiện của axit nucleic mà nó được liên kết theo cách có thể kiểm soát vào đó. Các vectơ như vậy trong bản mô tả này được gọi là "vectơ biểu hiện".

II. Chế phẩm và phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa một phần vào việc phát hiện ra rằng kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người nêu trong bản mô tả này có các đặc tính được cải thiện. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người. Kháng thể nêu trong bản mô tả này hữu dụng, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị bệnh Alzheimer.

A. Kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được lấy làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép đã được phân lập mà gắn kết vào A-beta của người và thụ thể transferin của người. Các kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm kháng thể lõi có chiều dài đầy đủ và đoạn Fab được dung hợp trong đó các miền này được trao đổi chéo. Vì vậy, kháng thể đặc hiệu kép thu được là không đối xứng. Vì thế, kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách sử dụng công nghệ dị đime hóa được gọi là kỹ thuật gắn phần phình vào phần lõm (knobs-into-holes) bằng cách sử dụng chuỗi nặng thứ nhất với phần tử được gọi là phần phình (knob) (HCknob) và chuỗi nặng thứ hai với phần tử được gọi là phần lõm (vùng khoảng không xung quanh gốc) (HChole).

Kháng thể 0012, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ bốn polypeptit có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 06 đến 09.

Kháng thể 0012 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp trong số các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi chuỗi nặng của các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Kháng thể 0015, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ bốn polypeptit mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 01 đến 03 và SEQ ID NO: 10.

Kháng thể 0015 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mà mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp của các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi chuỗi nặng của các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) và miền chuỗi nặng không đổi 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Kháng thể 0020, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ ba polypeptit mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11 đến 13.

Kháng thể 0020 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp trong các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi chuỗi nặng của các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit

glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai là đoạn Fab chuỗi đơn, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Kháng thể 0024, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ bốn polypeptit mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14 đến 17.

Kháng thể 0024 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp trong số các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) và miền chuỗi nặng không đổi 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Sự phân phối /tổ hợp khác nhau của các polypeptit tương ứng trên plasmit biểu hiện khác nhau và tỷ lệ khác nhau của các plasmit thu được được sử dụng để sản xuất tái tổ hợp kháng thể đặc hiệu kép. Các kết quả được trình bày trong Bảng sau.

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	Vùng đỉnh tương đối [%] (CE-SDS; phân tích không khử)			
		LC	½ mAb lỗ	Dime chuỗi lỗ-lỗ	kháng thể monome
0012	1(HChole+LC):3(HCknob +LCcross)		12	9	78
0012	1(LC):1(HChole+LC):3(H Cknob+LCcross)	1	9	9	79
0012	1(LC+HChole):3(Hcknob +LC):1(LCcross)	6	9	9	75
0015	1(HChole+LC):3(HCknob +LCcross)		7	23	62
0015	1(LC):1(HChole+LC):3(H Cknob+LCcross)		4	17	75
0015	1(LC+HChole):3(Hcknob +LC):1(LCcross)		4	20	66
0020	1(HChole+LC):4(HCknob +LCcross)		16	11	72

Kháng thể đặc hiệu kép được sản xuất ở quy mô nhỏ và sự phân bố phụ phẩm được phân tích sau bước tinh chế thứ nhất bằng cách sử dụng sắc ký ái lực protein A và sau bước tinh chế thứ hai sử dụng sắc ký phân loại theo kích thước điều chế. Các kết quả được trình bày trong bảng sau.

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	Thu hoạch 3l sản phẩm lên men sau khi tinh chế sản phẩm monome bằng sắc ký ái lực protein A (CE-SDS không khử/ hiệu suất)	Phân phối phụ phẩm (CE-SDS không khử)		
			LC	½ mAb lỗ	lỗ-lỗ dime + ¾ mAb
0012	1:1:3	65% 13,3 mg	3%	28%	3,5%
0024	1:1:3	70% 14,8 mg	6%	15%	7%
0015	1:3	85% 15,8 mg	4%	5%	5%
0020	1:4	29% 6 mg	11%	44%	8%

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	Thu hoạch 3l sản phẩm lên men sau khi tinh chế sản phẩm monome bằng sắc ký ái lực protein A và SEC điều chế (CE-SDS không khử/hiệu suất)	phân phối phụ phẩm (CE-SDS không khử)		
			LC	½ mAb lỗ	lỗ-lỗ dime + 3/4 mAb
0012	1:1:3	>90% 2,8 mg	5%	3%	2,5%
0024	1:1:3	78% 4 mg	11%	5%	6%
0015	1:1:3	>95% 5,8 mg	1%	0,5%	1%
0020	1:4	68% 0,8 mg	13%	10%	8,6%

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	Thu hoạch 3l sau khi tinh chế monome bằng sắc ký điều chế protein A bằng SEC	phụ phẩm SEC [%]		sản phẩm cuối bằng SEC	phụ phẩm SEC [%]	
			PHÂN TỬ LƯỢNG CAO	LMW		Phân tử lượng cao	Phân tử lượng thấp
0012	1:1:3	78%	0	22	97,5%	0	2,5
0024	1:1:3	80%	0	20	96%	0	4
0015	1:1:3	87%	0	13	97%	0	3
0020	1:4	53%	7	40	97%	0	3

Vị trí gắn kết kháng A-beta chứa vị trí glycosyl hóa bổ sung. Vì thế quá trình glycosyl hóa được xác định. Các kết quả được nêu trong bảng sau.

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	HChole HCknob CE-SDS; khử; vùng đỉnh tương đối [%]			
		không-glycol hóa	Glycol hóa	không-glycol hóa	Glycol hóa
0012	1(HChole+LC):3(HCknob +LCcross)	10	14	8	18
0012	1(LC):1(HChole+LC):3(H Cknob+LCcross)	9	13	8	21
0012	1(LC+HChole):3(Hcknob +LC):1(LCcross)	10	13	7	18
0015	1(HChole+LC):3(HCknob +LCcross)	7	16	5	25
0015	1(LC):1(HChole+LC):3(H Cknob+LCcross)	6	16	5	29
0015	1(LC+HChole):3(Hcknob +LC):1(LCcross)	7	15	6	26
0020	1(HChole+LC):4(HCknob +LCcross)	9	18	7	21

Tỷ lệ phần trăm của Fab không glycosyl hóa trong 3l sản phẩm lên mên sau khi tinh chế ProtA

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	HChole HCknob CE-SDS; khử			
		không glycol hóa	Glycol hóa	không glycol hóa	Glycol hóa
0012	1(LC):1(HChole+LC):3(H Cknob+LCcross)	23	77	10	90
0015	1(LC):1(HChole+LC):3(H Cknob+LCcross)	16	84	8	92
0024	1(LC):1(HChole+LC):3(H Cknob+LCcross)	16	84	7,5	92,5

Tỷ lệ phần trăm của Fab không glycosyl hóa trong 3l sản phẩm lên men sau khi tinh chế ProtA + SEC

	Tỷ lệ plasmit	HChole HCknob

Kháng thể		CE-SDS; khử			
		không glycol hóa	Glycol hóa	không glycol hóa	Glycol hóa
0012	1(LC):1(HChole+LC):3(HCknob+LCcross)	8	92	6	94
0015	1(LC):1(HChole+LC):3(HCknob+LCcross)	10	90	4,5	95,5
0024	1(LC):1(HChole+LC):3(HCknob+LCcross)	8	92	4,5	95,5

Độ ổn định của kháng thể đặc hiệu kép được thử nghiệm bằng cách ủ trong 14 ngày ở giá trị pH cụ thể trong chất đệm. Các kết quả được trình bày trong bảng sau.

Thông số		kháng thể 0012	kháng thể 0015	kháng thể 0024
gắn kết peptit A-beta (1-40) tương đối bằng BIAcore	14 ngày, độ pH=6,0, 40°C, chất đệm His/NaCl	87%	96%	97%
	14 ngày, độ pH=7,4, 37°C, đệm PBS	82%	86%	101%
gắn kết thụ thể transferin của người tương đối bằng BIAcore	14 ngày, độ pH=6,0, 40°C, đệm His/NaCl	101%	91%	93%
	14 ngày, độ pH=7,4, 37°C, đệm PBS	78%	85%	90%

Nhiệt độ kết tụ đối với kháng thể 0015 và 0024 được xác định xấp xỉ 53-55°C và đối với kháng thể 0012 là xấp xỉ 54-56°C.

Hệ số tắt (off-rate) (k_d trong [1/Ms]) để gắn kết vào thụ thể transferin của người như được xác định bằng BIAcore tương đương với các kháng thể 0015 và 0024 cũng

như đối với kháng thể kháng thụ thể transferin của người ban đầu ở 25°C, 37°C và 40°C: 1,86E-02 đến 1,97E-02, 1,98E-2 đến 2,03E-2 và 1,44E-02, một cách tương ứng.

Chức năng tác động đặc hiệu A-beta của tất cả các kháng thể tương đương với kháng thể kháng A-beta đặc hiệu đơn ban đầu trong thử nghiệm tế bào U937. Số liệu được thể hiện trong bảng sau.

Kháng thể	IL-8 [ng/mL]	IP-10 [ng/mL]
Kháng thể kháng A-beta kháng thể ban đầu	5	4,3
kháng thể-0012	7	5,3
kháng thể-0015	-	5
kháng thể-0020	7	4,5
kháng thể-0024	8	5,2

Không có kháng thể nào trong số các kháng thể đặc hiệu kép thể hiện hoạt tính hoạt hóa bạch cầu trung tính in vitro.

Toàn bộ kháng thể 0015 thể hiện các đặc tính thích hợp và vì thế là khía cạnh ưu tiên theo sáng chế. Ngoài ra, kháng thể này có các đặc tính được cải thiện, trong số những đặc điểm khác, có profin sản phẩm phụ được cải thiện.

Theo một khía cạnh sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp trong các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay

cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi chuỗi nặng của các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) và miền chuỗi nặng không đổi 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Một khía cạnh khác nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp trong số các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi chuỗi nặng của các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) và miền chuỗi nặng không đổi 1 (CH1) được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người,

trong đó vị trí gắn kết A-beta của người chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18 và trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19, và

trong đó vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20 và trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 21.

Theo các phương án cụ thể, trình tự VH có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa đột biến thế (ví dụ, đột biến thế bảo toàn), đột biến chèn hoặc đột biến khuyết so với trình tự tham chiếu, nhưng vị trí gắn kết chứa trình tự giữ lại khả năng vào gắn kết vào kháng nguyên của nó. Theo các phương án cụ thể, tổng 1 đến 10 axit amin được thế, gắn chèn và/hoặc bị khuyết trong SEQ ID NO: 18 hoặc 20. Theo các phương án cụ thể, đột biến thế, đột biến chèn hoặc đột biến khuyết diễn ra trong các vùng bên ngoài HVR (tức là, trong FR).

Theo các phương án cụ thể, trình tự VL có độ đồng nhất ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa đột biến thế (ví dụ, đột biến thế bảo toàn), đột biến chèn hoặc đột biến khuyết so với trình tự tham chiếu, nhưng vị trí gắn kết chứa trình tự giữ lại khả năng gắn kết vào kháng nguyên của nó. Theo các phương án cụ thể, tổng 1 đến 10 axit amin được thế, gắn chèn và/hoặc bị khuyết trong SEQ ID NO: 19 hoặc 21. Theo các phương án cụ thể, đột biến thế, đột biến chèn hoặc đột biến khuyết diễn ra trong vùng bên ngoài HVR (tức là, trong FR).

Theo một phương án, vị trí gắn kết A-beta của người chứa trình tự VH như trong SEQ ID NO: 18, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó, và trình tự VL như trong SEQ ID NO: 19, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo một phương án, vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa trình tự VH như trong SEQ ID NO: 20, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó, và trình tự VL như trong SEQ ID NO: 21, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép chứa

i) chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 01 là 70-100%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc lớn hơn,

ii) chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 02 là 70-100%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc lớn hơn,

iii) chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 03 là 70-100%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc lớn hơn, và

iv) đoạn Fab chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 04 là 70-100%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc lớn hơn,

trong đó

SEQ ID NO: 01 có trình tự axit amin

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR
LLIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCLQIYNMPIT
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC,

SEQ ID NO: 02 có trình tự axit amin

QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG
LEWVSAINASGTRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG,

SEQ ID NO: 03 có trình tự axit amin

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKL LIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNYASSNV DNTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC, và

SEQ ID NO: 04 có trình tự axit amin

QSMQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLE WIGYIWSGGSTDYASWAKSRVTISKTSTTVSLKLSSVTAADTAVYYCAR RYGTSYPDYGDASGFDPWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Một khía cạnh khác nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa:

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng cặp trong số các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc

axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi chuỗi nặng của các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) và miền chuỗi nặng không đổi 1 (CH1) được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người,

trong đó vị trí gắn kết A-beta của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19, và

trong đó vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 21.

Một khía cạnh khác nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp của các cặp chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, trong đó kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa vùng Fc được tạo ra bằng polypeptit vùng Fc, mỗi vùng chứa miền CH1, CH2 và CH3, của hai chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ, và

b) một đoạn Fab bổ sung, trong đó đoạn Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi nhẹ của các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) tại vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và tại vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi chuỗi nặng của các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng không đổi thứ nhất (CH1) tại vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và tại vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó đoạn Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho vùng chuỗi nhẹ không đổi (CL) và miền chuỗi nặng không đổi 1 (CH1) được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người,

trong đó vị trí gắn kết A-beta của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19,

trong đó vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) mà có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 21, và

trong đó polypeptit vùng Fc là

a) thuộc phân lớp IgG1 của người,

b) thuộc phân lớp IgG4 của người,

c) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G,

d) thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G,

e) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G ở cả polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong các polypeptit vùng Fc tương ứng,

f) thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P và P329G ở cả polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc khác tương ứng,

g) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, I253A, H310A và H435A ở cả polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc khác tương ứng,

h) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T và T256E ở cả polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc khác tương ứng, hoặc

i) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, H310A, H433A và Y436A trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng tương ứng còn lại.

Theo khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu được mô tả trong các phần 1-3 dưới đây, ở dạng đơn lẻ hoặc ở dạng kết hợp:

1. Kháng thể thể khảm và kháng thể được làm giống như của người

Theo các phương án cụ thể, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể thể khảm. Các kháng thể thể khảm cụ thể được mô tả, ví dụ, trong US 4,816,567; và Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). Trong một ví dụ, kháng thể thể khảm chứa vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi được lấy từ chuột nhắt, chuột Rattus, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải là người, như khỉ) và vùng cố định của người. Trong ví dụ khác, kháng thể thể khảm là kháng thể "được chuyển lớp" trong đó lớp hoặc phân lớp được thay đổi so với lớp hoặc phân lớp của kháng thể bố mẹ. Kháng thể thể khảm bao gồm đoạn gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể thể khảm là kháng thể được làm giống như của người. Thông thường, kháng thể không phải của người được làm giống như của người để làm giảm tính sinh miễn dịch đối với người, nhưng vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể bố mẹ không phải của người. Thông thường, kháng thể được làm giống như của người chứa một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các HVR, ví dụ, các CDR, (hoặc các phần của chúng) được lấy từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các phần của chúng) được lấy từ các trình tự kháng thể của người. Kháng thể được làm giống như của người tùy ý cũng chứa ít nhất một phần của vùng cố định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm giống như của người được thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà các gốc HVR được lấy từ đó), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được làm giống như của người và các phương pháp tạo ra chúng được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633, và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu Riechmann, I. et al., Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; US 5,821,337, US 7,527,791, US 6,982,321, và US 7,087,409; Kashmiri, S.V. et al., Methods 36 (2005) 25-34 (mô tả kỹ thuật ghép vùng xác định tính đặc hiệu (SDR)); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (mô tả "kỹ thuật tái tạo bề mặt"); Dall'Acqua, W.F. et al., Methods 36 (2005) 43-60 (mô tả "kỹ thuật xáo trộn FR"); và

Osbourn, J. et al., Methods 36 (2005) 61-68 và Klimka, A. et al., Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (mô tả phương pháp "chọn lọc có hướng dẫn" để làm xáo trộn FR).

Các vùng khung của người mà có thể được sử dụng trong bước làm giống như của người bao gồm, nhưng không giới hạn ở: vùng khung được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp "khớp tốt nhất" (xem, ví dụ, tài liệu Sims, M.J. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308; vùng khung được lấy từ trình tự liên ứng của kháng thể của người thuộc phân nhóm cụ thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (xem, ví dụ, tài liệu Carter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; và Presta, L.G. et al., J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632); vùng khung hoàn thiện (được gây đột biến soma) của người hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem, ví dụ, tài liệu Almagro, J.C. and Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633); và vùng khung được lấy bằng việc sàng lọc các thư viện FR (xem, ví dụ, tài liệu Baca, M. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684 và Rosok, M.J. et al., J. Biol. Chem. 271 (19969 22611-22618).

2. Các kháng thể của người

Theo các phương án cụ thể, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể của người. Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể của người được mô tả chung trong tài liệu van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374 và Lonberg, N., Curr. Opin. Immunol. 20 (2008) 450-459.

Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất sinh miễn dịch cho động vật chuyển gen đã được cải biến để tạo ra kháng thể nguyên vẹn của người hoặc kháng thể nguyên vẹn có vùng biến đổi của người nhằm đáp ứng lại thách thức kháng nguyên. Động vật này thường chứa toàn bộ hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người, thay cho locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt bên ngoài nhiễm sắc thể hoặc được tích hợp một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của động vật. Trong chuột nhắt chuyển gen như vậy, locus globulin miễn dịch nội sinh thường bị làm bất hoạt. Để biết tổng quan về các phương pháp thu nhận kháng thể của người từ động vật chuyển gen, xem tài liệu Lonberg, N., Nat. Biotech. 23 (2005) 1117-1125. Xem thêm, ví dụ, US 6,075,181 và US 6,150,584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; US 5,770,429 mô tả công nghệ HuMAB®; US 7,041,870 mô tả công nghệ K-M MOUSE® và US

2007/0061900 mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Vùng biến đổi của người từ kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bởi động vật này có thể được cải biến tiếp, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng cố định khác của người.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp dựa trên cơ sở tế bào lai. Dòng tế bào u tủy của người và dòng tế bào u tủy khác loại của chuột nhắt-người dùng để tạo ra kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. (Xem, ví dụ, tài liệu Kozbor, D., J. Immunol. 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), các trang 51-63; và Boerner, P. et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Kháng thể của người được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai đối với tế bào B của người cũng được mô tả trong tài liệu Li, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562. Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong US 7,189,826 (mô tả việc tạo ra kháng thể IgM đơn dòng của người từ dòng tế bào lai) và trong tài liệu Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (mô tả tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong tài liệu Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937 và Vollmers, H.P. and Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191.

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

3. Biến thể của kháng thể

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến biến thể của trình tự axit amin của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, có thể mong muốn là cải thiện ái lực gắn kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Biến thể của trình tự axit amin của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến như vậy bao gồm, ví dụ, đột biến khuyết và/hoặc đột biến chèn và/hoặc đột biến thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của đột biến khuyết, đột biến chèn

và đột biến thế có thể được thực hiện để thu được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết kháng nguyên.

a) Biến thể thế, biến thể chèn và biến thể khuyết

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến biến thể của kháng thể có một hoặc nhiều đột biến thế axit amin. Các vị trí được quan tâm để gây đột biến thế bao gồm HVR và FR. Các đột biến thế bảo toàn được thể hiện trong bảng dưới đây dưới tiêu đề là "đột biến thế được ưu tiên". Các thay đổi đáng kể hơn được trình bày trong bảng 1 dưới tiêu đề là "đột biến thế tiêu biểu," và như được mô tả thêm dưới đây liên quan đến các nhóm chuỗi bên axit amin. Đột biến thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể đang quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc để thu nhận hoạt tính mong muốn, ví dụ, sự gắn kết kháng nguyên được giữ lại/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm, hoặc ADCC hoặc CDC cải thiện.

BẢNG

Gốc ban đầu	Đột biến thế tiêu biểu	Đột biến thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile

Gốc ban đầu	Đột biến thế tiêu biểu	Đột biến thế được ưu tiên
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Các axit amin có thể được nhóm theo các tính chất chuỗi bên chung:

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

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

(3) có tính axit: Asp, Glu;

(4) có tính bazơ: His, Lys, Arg;

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

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các đột biến thế không bảo toàn sẽ phải trao đổi thành viên thuộc một trong số các lớp này cho lớp khác.

Một loại biến thể thế bao gồm việc thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể bố mẹ (*ví dụ, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể của người*). Thông thường, (các) biến thể tạo thành được chọn lọc để nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến (ví dụ, các cải thiện) về một số tính chất sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực tăng, tính sinh miễn dịch giảm) so với kháng thể bố mẹ và/hoặc sẽ có một số tính chất sinh học cụ thể của kháng thể bố mẹ được giữ lại về cơ bản. Biến thể thế tiêu biểu là kháng

thể hoàn thiện ái lực, mà có thể được tạo ra một cách thông thường, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật hoàn thiện ái lực dựa trên cơ sở biểu hiện thể thực khuẩn như các kỹ thuật nêu trong bản mô tả này. Một cách ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được hoàn thiện và kháng thể biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc để thu nhận hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết).

Các thay đổi (ví dụ, đột biến thế) có thể được tạo ra trong HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực của kháng thể. Các thay đổi này có thể được tạo ra trong "điểm nóng" HVR, tức là, các gốc được mã hóa bởi các codon mà trải qua quá trình đột biến với tần suất cao trong quá trình hoàn thiện soma (xem, ví dụ, tài liệu Chowdhury, P.S., Methods Mol. Biol. 207 (2008) 179-196), và/hoặc các gốc tiếp xúc với kháng nguyên, và biến thể VH hoặc VL tạo thành được thử nghiệm về ái lực gắn kết. Sự hoàn thiện ái lực bằng cách tạo cấu trúc và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Hoogenboom, H.R. et al. trong tài liệu: Methods in Molecular Biology 178 (2002) 1-37. Theo một số phương án về việc hoàn thiện ái lực, sự đa dạng được đưa vào gen có khả năng biến đổi được chọn để hoàn thiện bằng phương pháp bất kỳ (ví dụ, PCR dễ bị lỗi, xáo trộn chuỗi, hoặc gây đột biến định hướng oligonucleotit). Thư viện thứ cấp sau đó được tạo ra. Thư viện này sau đó được sàng lọc để nhận diện biến thể bất kỳ của kháng thể mà có ái lực mong muốn. Phương pháp khác để đưa sự đa dạng vào bao gồm phương pháp định hướng HVR, trong đó một số gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc tại một thời điểm) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc HVR tham gia vào sự gắn kết kháng nguyên có thể được nhận diện một cách đặc hiệu, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật lập mô hình hoặc gây đột biến quét alanin. Cụ thể, CDR-H3 và CDR-L3 thường được nhắm tới.

Theo các phương án cụ thể, đột biến thế, đột biến chèn hoặc đột biến khuyết có thể xuất hiện trong một hoặc nhiều HVR, miễn là các thay đổi này về cơ bản không làm giảm khả năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ, các thay đổi bảo toàn (ví dụ, đột biến thế bảo toàn nêu trong bản mô tả này) mà về cơ bản không làm giảm ái lực gắn kết có thể được tạo ra trong HVR. Các thay đổi này có thể, ví dụ, ở bên ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên trong HVR. Theo các phương án cụ thể về trình tự VH và VL biến thể nêu trên, mỗi HVR không được làm thay đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba đột biến thế axit amin.

Phương pháp hữu dụng để nhận diện các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được nhắm tới để gây đột biến được gọi là "gây đột biến quét alanin" như được mô tả trong tài liệu Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. Trong phương pháp này, một gốc hoặc nhóm các gốc mục tiêu (ví dụ, các gốc mang điện như arg, asp, his, lys và glu) được nhận diện và được thay thế bằng axit amin trung tính hoặc mang điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các đột biến thế khác nữa có thể được đưa vào tại các vị trí axit amin thể hiện độ nhạy chức năng đối với các đột biến thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để nhận diện các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được nhắm tới hoặc được loại bỏ với vai trò là vị trí tiềm năng để thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem liệu chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Đột biến chèn trình tự axit amin bao gồm đột biến dung hợp đầu tận amino và/hoặc đầu tận carboxyl có chiều dài nằm trong khoảng từ một gốc đến polypeptit chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như đột biến chèn một hoặc nhiều gốc axit amin bên trong chuỗi. Các ví dụ về đột biến chèn đầu tận bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận N. Các biến thể chèn khác của phân tử kháng thể bao gồm đột biến dung hợp với đầu tận N hoặc đầu tận C của kháng thể đối với enzym (ví dụ, đối với ADEPT) hoặc polypeptit làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể.

b) Biến thể glycosyl hóa

Theo các phương án cụ thể, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này được biến đổi để làm tăng hoặc giảm mức độ kháng thể được glycosyl hóa. Việc thêm hoặc bớt các vị trí glycosyl hóa vào kháng thể có thể được thực hiện thuận tiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc được loại bỏ.

Khi kháng thể chứa vùng Fc, hyđrat cacbon được gắn vào đó có thể được thay đổi. Kháng thể nguyên gốc được sản xuất bởi tế bào động vật có vú thông thường chứa oligosacarit phân nhánh, hai râu thông thường được gắn bằng liên kết N với Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Xem, ví dụ, Wright, A. và Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32. Oligosacarit có thể bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, mannoza, N-

axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza gắn vào GlcNAc trong "thân" của cấu trúc oligosacarit hai râu. Theo một số phương án, việc cải biến oligosacarit trong kháng thể nêu trong bản mô tả này có thể được tạo ra để tạo ra kháng thể biến thể với các đặc tính được cải thiện.

Theo một phương án, kháng thể biến thể theo sáng chế có cấu trúc hydrat cacbon thiếu fucoza được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) với vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể là từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính lượng fucoza trung bình bên trong chuỗi đường ở Asn297, so với tổng các cấu trúc glyco gắn vào Asn 297 (ví dụ các cấu trúc phức hợp, lai và nhiều mannoza) như được đo bằng phổ khối MALDI-TOF, như được mô tả trong WO 2008/077546, ví dụ. Asn297 dùng để chỉ gốc asparagin được nằm ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (việc đánh số EU các gốc trong vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể được nằm khoảng ± 3 axit amin ngược dòng hoặc xuôi dòng vị trí 297, tức là, giữa các vị trí 294 và 300, do sự thay đổi trình tự nhỏ trong kháng thể. Việc fucosyl hóa các biến thể có thể cải thiện chức năng ADCC. Xem, ví dụ, US 2003/0157108; US 2004/0093621. Các ví dụ về các tài liệu công bố liên quan đến kháng thể biến thể "được khử fucosyl" hoặc "thiếu fucoza" bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Các ví dụ về các dòng tế bào có khả năng tạo ra các kháng thể được khử fucosyl bao gồm các tế bào Lec13 CHO thiếu hụt sự fucosyl hóa protein (Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108; và WO 2004/056312, đặc biệt ở Ví dụ 11), và các dòng tế bào bất hoạt gen, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8,* tế bào CHO bất hoạt (xem, ví dụ, Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; và WO 2003/085107).

Các kháng thể biến thể còn được bao gồm oligosacarit được tách đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai nhánh gắn vào vùng Fc của kháng thể được tách đôi bằng GlcNAc. Các kháng thể biến thể này có thể được khử fucosyl hóa và/hoặc được cải thiện chức

năng ADCC. Các ví dụ về các kháng thể biến thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 2003/011878; US 6,602,684; và US 2005/0123546. Kháng thể biến thể với ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit được gắn vào vùng Fc cũng được đề xuất. Các kháng thể biến thể này có thể được cải thiện chức năng CDC. Các kháng thể biến thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087; WO 1998/58964; và WO 1999/22764.

c) Biến thể của vùng Fc

Theo các phương án cụ thể, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này, từ đó tạo ra biến thể của vùng Fc. Biến thể của vùng Fc có thể chứa trình tự vùng Fc của người (*ví dụ*, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) chứa cải biến axit amin (*ví dụ, đột biến thế*) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể biến thể mà có một số nhưng không phải toàn bộ chức năng tác động, mà làm cho nó là đối tượng mong muốn cho các ứng dụng trong đó thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là quan trọng chức năng tác động nhất định (như bổ thể và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để khẳng định việc giảm/loại bỏ hoàn toàn hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể thiếu khả năng gắn kết FcγR (do đó có thể thiếu hoạt tính ADCC), nhưng vẫn giữ lại khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào chủ yếu điều tiết ADCC, tế bào NK, biểu hiện Fc(chỉ RIII, trong khi đó bạch cầu đơn nhân to biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện FcR trên tế bào sinh huyết được tóm tắt trong Bảng 3 ở trang 464 của Ravetch, J.V. và Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Các ví dụ không nhằm giới hạn sáng chế về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm được mô tả trong US 5,500,362 (xem, ví dụ Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; và Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); US 5,821,337 (xem Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). Theo cách khác, phương pháp thử nghiệm không phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm khả năng gây độc tế bào không phóng xạ ACTI™ để phân tích tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm khả năng gây độc tế bào CytoTox 96® không phóng xạ (Promega, Madison, WI). Tế bào thực hiện

hữu dụng để thử nghiệm bao gồm tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) và tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, *ví dụ*, trong mô hình động vật như mô hình động vật được mô tả trong Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. Thử nghiệm gắn kết với C1q cũng có thể được thực hiện để khẳng định kháng thể không thể gắn kết với C1q và vì thế thiếu hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052; và Cragg, M.S. và M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). Việc xác định sự gắn kết FcRn và tốc độ thanh thải/thời gian bán hủy *in vivo* cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006: 1759-1769).

Các kháng thể có chức năng tác động giảm bao gồm các kháng thể có đột biến thế của một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US 6,737,056). Các thể đột biến Fc này bao gồm các thể đột biến Fc có các đột biến thế tại hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến Fc được gọi là "DANA" có đột biến thế gốc 265 và 297 thành alanin (US 7,332,581).

Các kháng thể biến thể cụ thể với khả năng gắn kết vào FcR được cải thiện hoặc bị giảm đi được mô tả. (Xem, ví dụ, US 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

Theo các phương án cụ thể, kháng thể biến thể chứa vùng Fc với một hoặc nhiều đột biến thế axit amin mà cải thiện ADCC, ví dụ, đột biến thế tại các vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (các gốc được đánh số theo EU).

Theo một số phương án, các thay đổi được thực hiện trong vùng Fc mà dẫn đến biến đổi (*tức là*, cải thiện hoặc giảm bớt) khả năng gây độc tế bào gắn kết vào C1q và/hoặc phụ thuộc bổ thể (CDC), ví dụ, như được mô tả trong US 6,194,551, WO 99/51642, và Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Kháng thể có thời gian bán hủy tăng và khả năng gắn kết vào thụ thể Fc mới sinh (FcRn) được cải thiện, mà chịu trách nhiệm vận chuyển IgG của mẹ đến bào thai (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, và Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994)

2429-2434), được mô tả trong US 2005/0014934. Kháng thể này chứa vùng Fc với một hoặc nhiều đột biến thế trong đó để cải thiện sự gắn kết của vùng Fc vào FcRn. Các biến thể Fc như vậy bao gồm các biến thể Fc có các đột biến thế tại một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, đột biến thế gốc vùng Fc 434 (US 7,371,826).

Xem thêm tài liệu Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5,648,260; US 5,624,821; và WO 94/29351 liên quan đến các ví dụ khác về biến thể của vùng Fc.

d) Kháng thể biến thể được thiết kế xystein

Theo các phương án cụ thể, có thể mong muốn là tạo ra kháng thể được thiết kế xystein, ví dụ, "thioMAb", trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thế bằng gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thế xuất hiện tại các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể. Nhờ việc thế các gốc này bằng xystein, các nhóm thiol có tính phản ứng nhờ đó được đặt tại các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể với các gốc khác, như gốc thuốc hoặc gốc thuốc-nhóm liên kết, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch, như được mô tả thêm trong bản mô tả này. Theo các phương án cụ thể, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc sau đây có thể được thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số EU) của vùng Fc chuỗi nặng. Kháng thể được thiết kế xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong US 7,521,541.

e) Dẫn xuất của kháng thể

Theo các phương án cụ thể, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này có thể được cải biến tiếp để chứa các gốc không có bản chất protein khác đã biết trong lĩnh vực này và đã có sẵn. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất của kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyme tan được trong nước. Các ví dụ không nhằm giới hạn sáng chế về polyme tan được trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinylic, polyvinyl pyrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme của etylen/maleic anhydrit, axit polyamin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, propropylen glycol homopolyme, copolyme của prolypropylen oxit/etylen oxit, polyol đã được polyoxyetyl

hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinylic, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có ưu điểm trong sản xuất nhờ tính ổn định trong nước của nó. Polyme có thể có trọng lượng phân tử bất kỳ, và có thể là mạch nhánh hoặc mạch không nhánh. Số lượng polyme gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, thì chúng có thể là cùng một phân tử hoặc là các phân tử khác nhau. Thông thường, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các cân nhắc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, liệu dẫn xuất của kháng thể này có được sử dụng trong trị liệu dưới điều kiện xác định hay không, v.v..

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp của kháng thể và gốc không có bản chất protein mà có thể được làm nóng một cách chọn lọc bằng cách cho tiếp xúc với bức xạ. Theo một phương án, gốc không có bản chất protein là ống nano cacbon (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bước sóng mà không gây hại cho các tế bào bình thường, nhưng là các bước sóng mà làm nóng gốc không có bản chất protein đến nhiệt độ mà tại đó các tế bào trong vùng lân cận kháng thể-gốc không có bản chất protein bị tiêu diệt.

B. Phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm

Kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm, ví dụ, như được mô tả trong US 4,816,567. Theo một phương án, axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người nêu trong bản mô tả này được đề xuất. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin chứa VL và/hoặc trình tự axit amin chứa VH của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vectơ (ví dụ, vectơ biểu hiện) chứa axit nucleic này. Theo phương án khác nữa, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic này. Theo một phương án như vậy, tế bào chủ chứa (ví dụ, được biến nạp với): (1) vectơ chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và trình tự axit amin chứa VH của kháng thể, hoặc (2) vectơ thứ nhất chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và vectơ thứ hai chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào nhân chuẩn, ví dụ tế bào trứng chuột đồng Trung

Hoa (CHO) hoặc tế bào dạng lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được đề xuất, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể nêu trên trong điều kiện thích hợp đối với việc biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Để sản xuất kháng thể đặc hiệu kép tái tổ hợp kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người, axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như nêu trên, được phân lập và được chèn vào một hoặc nhiều vectơ để tiếp tục nhân dòng và/hoặc biểu hiện ở tế bào chủ. Axit nucleic này có thể được phân lập và giải trình tự dễ dàng bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng mẫu dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để nhân dòng hoặc biểu hiện vectơ mã hóa kháng thể bao gồm tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, kháng thể có thể được tạo ra ở vi khuẩn, đặc biệt là khi không cần đến quá trình glycosyl hóa và chức năng tác động Fc. Đối với việc biểu hiện đoạn kháng thể và polypeptit ở vi khuẩn, xem, ví dụ, US 5,648,237, US 5,789,199 và US 5,840,523. (xem thêm tài liệu Charlton, K.A., trong tài liệu: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), các trang 245-254, mô tả sự biểu hiện đoạn kháng thể ở *E. coli*.). Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ tế bào vi khuẩn thể nhão trong phân đoạn tan được và có thể được tinh chế tiếp.

Ngoài sinh vật nhân sơ, vi sinh vật nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men cũng là vật chủ nhân dòng hoặc biểu hiện thích hợp đối với vectơ mã hóa kháng thể, bao gồm các chủng nấm và nấm men mà quá trình glycosyl hóa của chúng đã "được làm giống như của người", dẫn đến việc tạo ra kháng thể có mô hình glycosyl hóa của người một phần hoặc hoàn toàn. Xem tài liệu Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; và Li, H. et al., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể đã được glycosyl hóa còn được lấy từ sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều

chủng baculovirus đã được nhận diện có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các giống cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978, và US 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để tạo ra kháng thể ở thực vật chuyển gen).

Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú được làm thích nghi để sinh trưởng ở trạng thái lơ lửng có thể được sử dụng. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu dụng là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (293 hoặc tế bào 293 được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); tế bào thận chuột đồng con (BHK); tế bào Sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76); tế bào canxinom cổ tử cung người (HELA); tế bào thận chó (MDCK; tế bào gan chuột Buffalo (BRL 3A); tế bào phổi người (W138); tế bào gan người (Hep G2); khối u vú chuột nhắt (MMT 060562); tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Các dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu dụng khác bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), bao gồm tế bào DHFR$^-$ CHO (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); và dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để biết tổng quan về các dòng tế bào vật chủ động vật có vú cụ thể thích hợp để tạo ra kháng thể, xem, ví dụ, tài liệu Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), các trang 255-268.

C. Phương pháp và chế phẩm dùng để chẩn đoán và phát hiện

Theo các phương án cụ thể, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được đề xuất trong bản mô tả này hữu dụng để phát hiện sự có mặt của A-beta trong mẫu sinh học. Thuật ngữ "phát hiện" trong bản mô tả này bao gồm tế bào hoặc mô.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện được đề xuất. Theo khía cạnh khác, phương pháp phát hiện sự có mặt của A-beta trong mẫu sinh

học được đề xuất. Theo các phương án cụ thể, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người như được nêu trong bản mô tả này trong điều kiện cho phép diễn ra sự gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người với A-beta, và phát hiện xem liệu có tạo ra phức hợp giữa kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người và A-beta hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp in vitro hoặc in vivo.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được đánh dấu được đề xuất. Chất đánh dấu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đánh dấu hoặc gốc mà được phát hiện một cách trực tiếp (như chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu sinh màu, chất đánh dấu dày đặc điện tử, chất đánh dấu phát quang và chất đánh dấu phóng xạ), cũng như gốc, như enzym hoặc phối tử, mà được phát hiện một cách gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu tiêu biểu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, và ^{131}I, nhóm huỳnh quang như chelat đất hiếm hoặc floresxein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, luxeriferaza, ví dụ, luxiferaza đom đóm và luxiferaza vi khuẩn (US 4,737,456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, β-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, oxidaza dị vòng như uricaza và xantin oxidaza, được cộng hợp với enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, chất đánh dấu chuyển động quay, chất đánh dấu thể thực khuẩn, gốc tự do ổn định, và tương tự.

D. Dược phẩm

Dược phẩm của kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người như được nêu trong bản mô tả này được bào chế bằng cách trộn kháng thể này có mức độ tinh khiết mong muốn với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)), ở dạng chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước. Chất mang dược dụng thường là không độc đối với người nhận tại liều lượng và nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không giới

hạn ở: chất đệm như phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octadexyl dimetylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit có trọng lượng phân tử thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như poly(vinylpyrolidon); axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; đối ion tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng tiêu biểu trong bản mô tả này còn bao gồm chất phân tán thuốc trong kẽ như hyaluronidaza glycoprotein tan được có hoạt tính trung tính (sHASEGP), ví dụ, PH-20 hyaluronidaza glycoprotein tan được của người, như rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Các sHASEGP được lấy làm ví dụ và phương pháp sử dụng, bao gồm rhuPH20, được mô tả trong US 2005/0260186 và US 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Các chế phẩm kháng thể đông khô tiêu biểu được mô tả trong US 6,267,958. Các chế phẩm kháng thể dạng nước bao gồm các chế phẩm được mô tả trong US 6,171,586 và WO 2006/044908, chế phẩm được nêu sau chứa chất đệm histidin-axetat.

Chế phẩm nêu trong bản mô tả này có thể còn chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính khi cần thiết đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là thành phần có hoạt tính bổ sung mà không gây tác động có hại cho nhau. Các thành phần hoạt tính này có mặt một cách thích hợp ở dạng kết hợp với lượng có hiệu quả đối với mục đích dự định.

Các thành phần hoạt tính có thể được bắt giữ trong vi nang được tạo ra, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc polyme hóa bề mặt phân cách, ví dụ, hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metyl metacrylat), một cách tương ứng, trong hệ đưa thuốc vào cơ thể dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và viên nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật như vậy được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980).

Chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm chất nền bán thấm gồm polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, chất nền này ở dạng vật phẩm đã được tạo hình dạng, ví dụ, màng hoặc vi nang. Các ví dụ về cơ chất giải phóng kéo dài bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-metacrylat), hoặc rượu poly(vinylic)), polylactit (US 3,773,919), copolyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không phân hủy, copolyme axit lactic-axit glycolic dễ phân hủy như LUPRON DEPOT™ (vi cầu tiêm được được cấu thành từ copolyme axit lactic-axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Chế phẩm để sử dụng in vivo thường là vô trùng. Tính vô trùng có thể được tạo ra dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm đẳng trương.

E. Phương pháp trị liệu và chế phẩm

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong phương pháp trị liệu.

Theo một khía cạnh, kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để sử dụng làm thuốc được đề xuất. Theo các khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh gắn liền với việc tạo ra amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit được đề xuất. Theo các phương án cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp điều trị được đề xuất. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh gắn liền với việc tạo ra amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người. Theo một phương án như vậy, phương pháp còn bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như được liệt kê dưới đây hoặc kháng thể kháng -pTau hoặc kháng alpha-synuclein. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong ức chế sự hình

thành mảng bám và/hoặc làm phân hủy mảng bám β-amyloit. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp ức chế sự hình thành mảng bám và/hoặc làm phân hủy mảng bám β-amyloit ở cá thể, bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để ức chế sự hình thành mảng bám và/hoặc làm tan rã mảng bám β-amyloit. Tốt hơn là "cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người trong sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc được dùng để điều trị bệnh gắn liền với việc tạo ra amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit. Theo phương án khác nữa, thuốc được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh gắn liền với tạo ra amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit bao gồm việc sử dụng cho cá thể mắc bệnh gắn liền với tạo ra amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit lượng hữu hiệu của thuốc này. Theo một phương án như vậy, phương pháp bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như được liệt kê dưới đây hoặc kháng thể kháng pTau hoặc kháng alpha synuclein. Theo phương án khác nữa, thuốc được dùng để ức chế sự hình thành mảng bám và/hoặc làm tan rã mảng bám β-amyloit. Theo phương án khác nữa, thuốc được sử dụng trong phương pháp ức chế sự hình thành mảng bám và/hoặc làm tan rã mảng bám β-amyloit ở cá thể, bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của thuốc này để ức chế sự hình thành mảng bám và/hoặc làm tan rã mảng bám β-amyloit. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh gắn liền với tạo ra amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho cá thể mắc bệnh liên quan đến amyloit và/hoặc tạo thành mảng bám amyloit lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như được nêu dưới đây hoặc kháng thể kháng pTau hoặc kháng alpha-synuclein. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự hình thành mảng bám và/hoặc làm phân hủy mảng bám β-amyloit ở cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho cá thể này lượng hữu hiệu của kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người để ức chế sự hình thành mảng bám và/hoặc làm tan rã mảng bám β-amyloit. Theo một phương án, "cá thể" là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được đề xuất trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu nêu trên. Theo một phương án, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được đề xuất trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo phương án khác, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người được đề xuất trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như được nêu dưới đây hoặc kháng thể kháng pTau hoặc kháng alpha-synuclein.

Kháng thể nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp với chất khác để trị liệu. Ví dụ, kháng thể nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án cụ thể, chất trị liệu bổ sung là chất trị liệu hữu hiệu để điều trị rối loạn thần kinh giống hoặc khác nhau như kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị. Các chất trị liệu bổ sung tiêu biểu bao gồm, nhưng không giới hạn ở: thuốc điều trị bệnh thần kinh khác nhau nêu trên, chất ức chế cholinesteraza (như donepezil, galantamin, rovastigmin, và tacrin), chất đối kháng thụ thể NMDA (như memantin), chất ức chế kết tụ peptit amyloit beta, chất chống oxy hóa, chất điều biến γ-secretaza, chất mô phỏng yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF) hoặc liệu pháp gen NGF, chất chủ vận PPARγ, chất ức chế HMS-CoA reductaza (statin), ampakin, chất phong bế kênh canxi, chất đối kháng thụ thể GABA, chất ức chế glycogen synthaza kinaza, globulin miễn dịch trong tĩnh mạch, chất chủ vận thụ thể muscarin, chất điều biến thụ thể nicrotin, chất miễn dịch peptit amyloit beta chủ động hoặc bị động, chất ức chế phosphodiesteraza, chất đối kháng thụ thể serotonin và kháng thể kháng peptit amyloit beta. Theo các phương án cụ

thể, ít nhất một chất trị liệu bổ sung được chọn lọc về khả năng của nó trong việc làm thuyên giảm một hoặc nhiều tác dụng phụ của thuốc điều trị bệnh thần kinh.

Các liệu pháp kết hợp được nêu trên bao gồm việc sử dụng kết hợp (khi hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng một chế phẩm hoặc các chế phẩm khác nhau), và sử dụng riêng rẽ, trong trường hợp đó, sử dụng kháng thể nêu trong bản mô tả này có thể diễn ra trước khi, trong khi, và/hoặc sau khi sử dụng chất hoặc các chất trị liệu bổ sung. Theo một phương án, sử dụng kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người và sử dụng chất trị liệu bổ sung xuất hiện trong khoảng một tháng, hoặc trong khoảng một, hai hoặc ba tuần, hoặc trong khoảng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày, với nhau. Kháng thể nêu trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với các liệu pháp can thiệp khác như, nhưng không giới hạn ở, xạ trị, liệu pháp hành vi, hoặc các liệu pháp khác đã biết trong lĩnh vực này và thích hợp cho rối loạn thần kinh cần điều trị hoặc ngăn ngừa.

Kháng thể nêu trong bản mô tả này (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được sử dụng theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hóa, trong phổi và trong mũi, và nếu cần để điều trị tại chỗ, sử dụng trong thương tổn. Việc truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng hoặc dưới da. Việc dùng liều có thể là theo đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm, như tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tùy thuộc một phần vào việc liệu việc sử dụng này là ngắn hạn hay dài hạn. Các lịch trình dùng liều khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng một lần hoặc sử dụng nhiều lần tại các thời điểm khác nhau, sử dụng thuốc liều cao (bolus) và truyền theo xung được dự tính đến trong bản mô tả này.

Kháng thể nêu trong bản mô tả này được phối chế, được dùng liều và được sử dụng theo cách thức phù hợp với tiêu chuẩn thực hành y tế tốt (GMP: good medical practice). Các yếu tố cần xem xét trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể cần điều trị, động vật có vú cụ thể cần điều trị, tình trạng lâm sàng của bệnh nhân cá thể, nguyên nhân gây ra rối loạn, vị trí đưa chất vào cơ thể, phương pháp sử dụng, lịch trình sử dụng và các yếu tố khác đã biết đối với bác sĩ. Kháng thể không cần phải, nhưng tùy ý được phối chế với một hoặc nhiều chất hiện đang được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đang quan tâm. Lượng hữu hiệu của các chất khác này phụ thuộc vào lượng

kháng thể có mặt trong chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Các chất này thường được sử dụng ở cùng liều lượng và theo đường sử dụng như được nêu trong bản mô tả này, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng nêu trong bản mô tả này, hoặc ở liều lượng bất kỳ và theo đường bất kỳ mà được xác định là thích hợp dựa vào kinh nghiệm/lâm sàng.

Các phương pháp dựa vào lipit để vận chuyển cấu trúc dung hợp hoặc hợp chất qua BBB bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bao nang cấu trúc dung hợp hoặc hợp chất trong liposom mà có thể bắt cặp với thể gắn kết hóa trị một mà gắn kết vào thụ thể trên nội mô mạch của BBB (xem ví dụ, US 2002/0025313), và bọc thể gắn kết hóa trị một trong các hạt lipoprotein tỷ trọng thấp (xem ví dụ, US 2004/0204354) hoặc apolipoprotein E (xem ví dụ, US 2004/0131692).

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể nêu trong bản mô tả này (khi được sử dụng ở dạng đơn lẻ hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần điều trị, loại kháng thể, mức độ trầm trọng và thời gian mắc bệnh, liệu kháng thể được sử dụng nhằm mục đích ngăn ngừa hay trị liệu, liệu pháp trị liệu đã dùng trước đó, tiền sử lâm sàng và đáp ứng của bệnh nhân với kháng thể, và quyết định của bác sĩ điều trị. Kháng thể được sử dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân tại một thời điểm hoặc qua một đợt điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ trầm trọng của bệnh, liều lượng kháng thể nằm trong khoảng từ khoảng 1µg/kg đến 15mg/kg (ví dụ 0,5mg/kg - 10mg/kg) có thể là liều lượng ứng cử ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, cho dù, ví dụ, bằng cách sử dụng riêng biệt một hoặc nhiều lần, hay bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1µg/kg đến 100 mg/kg hoặc lớn hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị thường sẽ được duy trì cho đến khi xảy ra sự ức chế triệu chứng bệnh mong muốn. Một liều lượng tiêu biểu của kháng thể sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg. Vì vậy, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều này có thể được sử dụng một cách gián đoạn, ví dụ một tuần một lần hoặc ba tuần một lần (ví dụ, sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi hoặc, ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Liều nạp ban đầu cao, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các chế độ dùng liều khác cũng có thể

được sử dụng. Tiến độ của liệu pháp này được theo dõi dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông dụng.

Cần phải hiểu rằng chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu nêu trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch nêu trong bản mô tả này thay thế hoặc ngoài kháng thể đặc hiệu kép kháng A-beta của người/thụ thể transferin của người.

III. Vật phẩm

Theo khía cạnh khác nêu trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất vật phẩm chứa nguyên liệu hữu dụng để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán rối loạn nêu trên. Vật phẩm chứa vật chứa và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng trên hoặc gắn liền với vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch, v.v.. Vật chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa đựng chế phẩm mà bản thân nó hoặc ở dạng kết hợp với chế phẩm khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh, và có thể có đầu vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút đậy có thể chọc thủng bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể nêu trong bản mô tả này. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm này được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh được lựa chọn. Ngoài ra, vật phẩm có thể chứa (a) vật chứa thứ nhất chứa chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này chứa kháng thể nêu trong bản mô tả này; và (b) vật chứa thứ hai chứa chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này chứa chất trị liệu khác nữa có hoạt tính gây độc tế bào hoặc có hoạt tính khác. Vật phẩm theo phương án này có thể còn chứa tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn chứa vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm dược dụng, như nước tiêm kìm hãm vi khuẩn (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn xét theo quan điểm thương mại và quan điểm của người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, chất độn, kim tiêm và bơm tiêm.

Cần phải hiểu rằng vật phẩm bất kỳ trong số các vật phẩm nêu trên có thể chứa thể liên hợp miễn dịch nêu trong bản mô tả này thay thế hoặc ngoài kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Cần phải hiểu rằng các phương án khác khác nhau có thể được thực hiện dựa vào phần mô tả chung nêu trên.

Vật liệu & phương pháp chung

Thông tin chung liên quan đến trình tự nucleotit của globulin miễn dịch của người chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được nêu trong: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Axit amin của các chuỗi kháng thể được đánh số và được viện dẫn theo cách đánh số theo Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp chuẩn được sử dụng để thao tác trên ADN như được mô tả trong Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Chất phản ứng sinh học phân tử được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn được tạo ra từ oligonucleotit được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học. Các đoạn gen dài, mà được chặn bằng các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn đơn, được lắp ráp bằng cách ghép và nối các oligonucleotit bao gồm khuếch đại PCR và sau đó được tách dòng qua các vị trí giới hạn định trước. Các trình tự ADN của các đoạn gen được tạo dòng trở lại được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Tổng hợp các đoạn gen theo thứ tự theo mô tả được nêu trong Geneart (Regensburg, Germany).

Xác định trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng cách giải trình tự mạch kép được thực hiện ở MediGenomix GmbH (Martinsried, Germany) hoặc SequiServe GmbH (Vaterstetten, Germany).

Phân tích trình tự và quản lý dữ liệu trình tự ADN và protein

Gói phần mềm GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) phiên bản 10.2 và Vectơ NT1 Advance suite của Infomax phiên bản 8.0 được sử dụng để tạo ra, lập bản đồ, phân tích, chú thích và minh họa trình tự.

Vectơ biểu hiện

Để biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép mong muốn, plasmit biểu hiện để biểu hiện tạm thời (ví dụ trong tế bào HEK293) dựa trên việc tổ chức cADN có hoặc không có vùng khởi đầu tận CMV-intron A hoặc tổ chức bộ gen với vùng khởi đầu tận CMV có thể được áp dụng.

Ngoài vectơ cat-xet biểu hiện kháng thể, các vectơ chứa:

- vùng khởi đầu sao chép cho phép sao chép plasmit này trong E. coli, và
- gen ß-lactamaza tạo tính kháng ampixilin ở E. coli.

Đơn vị phiên mã của gen kháng thể được cấu thành từ các thành phần sau:

- (các) vị trí giới hạn đặc thù ở đầu 5'
- yếu tố tăng cường sớm tức thì và vùng khởi đầu từ cytomegalovirut của người,
- trình tự intron A trong trường hợp tổ chức cADN,
- vùng 5'-không dịch mã được lấy từ gen kháng thể của người,
- trình tự tín hiệu chuỗi nặng globulin miễn dịch,
- axit nucleic mã hóa chuỗi kháng thể tương ứng là cADN hoặc với sự tổ chức exon-intron bộ gen,
- vùng 3' không dịch mã với trình tự tín hiệu polyadenyl hóa, và
- (các) vị trí giới hạn đặc thù ở đầu 3.

Gen dung hợp mã hóa các chuỗi kháng thể được tạo ra bằng PCR và/hoặc tổng hợp gen và được lắp ráp bằng phương pháp và kỹ thuật tái tổ hợp đã biết bằng cách nối các đoạn axit nucleic này ví dụ bằng cách sử dụng các vị trí giới hạn đặc thù trong các vectơ tương ứng. Các trình tự axit nucleic được tách dòng lại được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Để chuyển nhiễm tạm thời các lượng lớn plasmit được tạo ra bằng chế phẩm plasmit giống cấy E. coli được biến nạp (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Đối với tất cả các cấu trúc công nghệ dị đime hóa gắn phần phình vào phần lõm (knob-into-hole) được sử dụng với đột biến thế phần phình thông thường (T366W) trong miền CH3 thứ nhất và đột biến thế lỗ tương ứng (T366S, L368A và Y407V) trong miền CH3 thứ hai (cũng như hai gốc xystein được đưa vào bổ sung S354C/Y349'C) (được chứa trong trình tự chuỗi nặng (HC) tương ứng được mô tả ở trên).

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào chuẩn như được mô tả trong Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. và Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., được sử dụng.

Chuyển nhiễm tạm thời trong hệ thống HEK293-F

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách biểu hiện tạm thời. Vì thế quá trình chuyển nhiễm với plasmit tương ứng bằng cách sử dụng hệ thống HEK293-F (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất được thực hiện. Một cách ngắn gọn, tế bào HEK293-F (Invitrogen) sinh trưởng ở dạng lơ lửng trong bình lắc hoặc trong thiết bị lên men có khuấy trong môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293 không huyết thanh (Invitrogen) được chuyển nhiễm với hỗn hợp của plasmit biểu hiện tương ứng và 293fectin™ hoặc fectin (Invitrogen). Đối với bình lắc 2 L (Corning) tế bào HEK293-F được gieo ở mật độ $1,0*10^6$ tế bào/mL trong 600 mL và được ủ ở 120 vòng/phút, 8% CO_2. Vào ngày tiếp theo, tế bào được chuyển nhiễm ở mật độ tế bào khoảng $1,5*10^6$ tế bào/mL với xấp xỉ 42 mL hỗn hợp của A) 20 mL môi trường Opti-MEM (Invitrogen) chứa 600µg tổng cộng ADN plasmit (1 µg/mL) và B) 20ml môi trường Opti-MEM được bổ sung 1,2 mL 293 fectin hoặc fectin (2 µL/mL). Theo mức tiêu thụ glucoza, dung dịch glucoza được bổ sung trong thời gian lên men. Dịch nổi bề mặt chứa kháng thể đã tiết ra được thu hoạch sau 5-10 ngày và kháng thể được tinh chế trực tiếp từ dịch nổi bề mặt hoặc dịch nổi bề mặt được đông lạnh và được lưu giữ.

Xác định protein

Nồng độ protein của các kháng thể được tinh chế và các dẫn xuất được xác định bằng cách xác định mật độ quang (OD) ở 280 nm, bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin theo Pace, et al., Protein Science 4 (1995) 2411-1423.

Xác định nồng độ kháng thể trong dịch nổi bề mặt

Nồng độ của các kháng thể và các dẫn xuất trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được ước lượng bằng kết tủa miễn dịch với các hạt protein A agaroza (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Vì thế, 60 µL hạt protein A Agaroza được rửa ba lần trong TBS-NP40 (50 mM chất đệm Tris, độ pH=7,5, được bổ sung NaCl 150 mM và 1% Nonidet-P40). Sau đó, 1-15 mL dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được đưa lên các hạt protein A Agaroza được cân bằng trước trong TBS-NP40. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các hạt này được rửa trên cột lọc Ultrafree-MC (Amicon) một lần bằng 0,5mL TBS-NP40, hai lần bằng 0,5 mL 2x nước muối được đệm phosphat (2xPBS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) và một cách ngắn gọn bốn lần bằng 0,5mL chất đệm Na-xitrat 100 mM (pH 5,0). Kháng thể đã gắn kết được rửa giải bằng cách thêm 35 µL chất đệm mẫu NuPAGE® LDS (Invitrogen). Một nửa mẫu được kết hợp với chất khử mẫu NuPAGE® hoặc được để yên không khử, một cách tương ứng, và được làm nóng trong 10 phút ở 70°C. Sau đó, 5-30 µL được đưa lên gel 4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (với chất đệm MOPS cho SDS-PAGE không được khử và chất đệm MES với chất phụ trợ đệm chạy mẫu chống oxy hóa NuPAGE® (Invitrogen) cho SDS-PAGE được khử) và được nhuộm bằng Coomassie Blue.

Nồng độ của kháng thể trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được định lượng bằng sắc ký ái lực HPLC. Một cách ngắn gọn, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào chứa kháng thể mà gắn kết vào protein A được đưa lên cột Applied Biosystems Poros A/20 trong 200 mM KH_2PO_4, 100 mM natri xitrat, độ pH=7,4 và được rửa giải bằng 200 mM NaCl, 100 mM axit xitric, độ pH=2,5 trên hệ thống Agilent HPLC 1100. Kháng thể đã rửa giải được định lượng bằng độ hấp thụ UV và hòa nhập các vùng đỉnh. Kháng thể IgG1 tiêu chuẩn đã tinh chế được sử dụng làm chất chuẩn.

Theo cách khác, nồng độ của các kháng thể và các dẫn xuất trong dịch nổi bề mặt trường nuôi cấy tế bào được đo bằng IgG-ELISA dạng kẹp. Một cách ngắn gọn, các đĩa vi chuẩn độ lỗ StreptaWell High Bind Streptavidin 96-A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) được phủ bằng 100 µL/lỗ phân tử bắt giữ kháng thể kháng IgG của người được biotinyl hóa F(ab')2<h-Fcγ> BI (Dianova) ở 0,1µg/mL trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc theo cách khác để qua đêm ở 4°C và sau đó rửa ba lần bằng 200µL/lỗ PBS, 0,05% Tween (PBST, Sigma). Sau đó, 100 µL/lỗ chuỗi pha loãng trong PBS (Sigma) của dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào chứa kháng thể tương ứng được thêm vào các lỗ và được ủ trong 1-2 giờ trên máy lắc ở nhiệt độ trong phòng. Các lỗ được rửa ba lần bằng PBST với lượng 200 µL/lỗ và kháng thể đã gắn kết được phát hiện bằng 100 µL F(ab')2<hFcγ>POD (Dianova) ở nồng độ 0,1 µg/mL là kháng thể phát hiện bằng cách ủ trong 1-2 giờ trên máy lắc trên máy lắc ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa ba lần bằng PBST với lượng 200 µL/lỗ. Kháng thể phát hiện không gắn kết được phát hiện bằng cách thêm 100 µL ABTS/lỗ sau đó là ủ. Việc xác định độ hấp thụ được thực hiện trên thiết bị đo phổ Tecan Fluor ở bước sóng đo là 405 nm (bước sóng tham chiếu là 492 nm).

Tinh chế kháng thể điều chế

Các kháng thể được tinh chế từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào được lọc tham chiếu đến quy trình chuẩn. Nói một cách ngắn gọn, các kháng thể được đưa lên cột protein A Sepharose (GE healthcare) và được rửa bằng PBS. Việc rửa giải các kháng thể đạt được ở độ pH=2,8 sau đó là trung hòa ngay lập tức. Protein kết tụ được tách khỏi các kháng thể monome bằng sắc ký phân loại kích thước (Superdex 200, GE Healthcare) trong PBS hoặc trong chất đệm Histidin 20 mM chứa NaCl 150 mM (pH=6,0). Các phân đoạn kháng thể monome được gộp lại, được cô (nếu cần) bằng cách sử dụng ví dụ, thiết bị cô ly tâm MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), được đông lạnh và được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C hoặc -80°C. Một phần mẫu được cung cấp cho quá trình phân tích protein sau đó và xác định đặc điểm phân tích ví dụ bằng SDS-PAGE, sắc ký phân loại kích thước (SEC) hoặc phổ khối.

SDS-PAGE

Hệ thống gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 10% hoặc 4-12% gel NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast

(pH=6,4) và NuPAGE® MES (gel khử, với chất phụ trợ đệm chạy mẫu chống oxy hóa NuPAGE®) hoặc đệm chạy mẫu MOPS (gel không khử) được sử dụng.

CE-SDS

Độ tinh khiết và tính toàn vẹn của kháng thể được phân tích bằng CE-SDS sử dụng công nghệ vi chip có chứa dịch Labchip (PerkinElmer, USA). Vì thế, 5µL dung dịch kháng thể được tạo ra để phân tích bằng CE-SDS bằng cách sử dụng kit chất phản ứng biểu hiện protein HT theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được phân tích trên hệ thống LabChip GXII bằng cách sử dụng chip biểu hiện protein HT. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm LabChip GX.

Sắc ký phân tích phân loại kích thước

Sắc ký phân loại kích thước (SEC) để xác định sự kết tụ và trạng thái oligome của các kháng thể được thực hiện bằng sắc ký HPLC. Một cách ngắn gọn, các kháng thể được tinh chế bằng protein A được đưa lên cột Tosoh TSKgel G3000SW trong NaCl 300 mM, chất đệm KH_2PO_4/K_2HPO_4 50 mM (pH=7,5) trên hệ thống Dionex Ultimate® (Thermo Fischer Scientific), hoặc lên cột Superdex 200 (GE Healthcare) trong 2x PBS trên hệ thống Dionex HPLC. Kháng thể đã rửa giải được định lượng bằng độ hấp thụ UV và kết hợp các vùng đỉnh. Chất chuẩn lọc gel BioRad Gel Filtration Standard 151–1901 được sử dụng làm chất chuẩn.

Phổ khối

Phần này mô tả việc xác định đặc điểm của kháng thể đặc hiệu kép nhấn mạnh vào việc lắp ráp đúng của chúng. Các cấu trúc sơ cấp được mong đợi được phân tích bằng phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của kháng thể nguyên vẹn đã được khử glycosyl hóa và trong các trường hợp cụ thể của kháng thể đã được phân giải được khử glycosyl hóa/LysC hạn chế.

Các kháng thể được khử glycosyl hóa bằng N-Glycosidaza F trong chất đệm phosphat hoặc chất đệm Tris ở nhiệt độ 37°C trong thời gian đến 17 giờ ở nồng độ protein là 1mg/mL. Việc phân giải bằng LysC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) hạn chế được thực hiện với 100 µg kháng thể đã được khử glycosyl hóa trong chất đệm Tris (pH=8) ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ, hoặc ở 37°C trong 40 phút, một cách tương ứng. Trước khi đo phổ khối, các mẫu được khử muối bằng HPLC trên

cột Sephadex G25(GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định qua ESI-MS trên hệ thống maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được lắp nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Thử nghiệm phân hủy hóa học

Mẫu được chia thành ba phần nhỏ và được đệm lại trong 20 mM His/His*HCl, 140 mM NaCl, độ pH=6,0 hoặc trong PBS, một cách tương ứng, và được lưu giữ ở 40°C (His/NaCl) hoặc 37°C (PBS). Mẫu đối chứng được lưu giữ ở -80°C.

Sau khi kết thúc thời gian ủ, mẫu được phân tích về nồng độ hoạt tính tương đối (BIAcore), sự kết tụ (SEC) và sự phân mảnh (điện di mao quản hoặc SDS-PAGE) và được so sánh với đối chứng chưa xử lý.

Độ ổn định nhiệt

Mẫu được tạo ra ở nồng độ là 1 mg/mL trong 20 mM Histidin/Histidin clorua, 140 mM NaCl, độ pH=6,0, được chuyển vào trong đĩa 384 lỗ nhìn qua được bằng cách ly tâm qua đĩa lọc 0,4µm và được phủ bằng dầu parafin. Bán kính thủy động học được đo nhiều lần bằng phương pháp đo tán xạ ánh sáng động học trên thiết bị đọc đĩa DynaPro (Wyatt) trong khi các mẫu được làm nóng với tốc độ 0,05°C/phút từ 25°C đến 80°C.

Theo cách khác, các mẫu được chuyển vào dãy microcuvet 10µL và số liệu tán xạ ánh sáng tĩnh cũng như số liệu phát huỳnh quang khi kích thích bằng laze 266 nm được ghi bằng thiết bị Optim1000 (Avacta Inc.), trong khi chúng được làm nóng ở tốc độ 0,1°C/phút từ 25°C đến 90°C.

Nhiệt độ bắt đầu kết tụ được định nghĩa là nhiệt độ mà tại đó bán kính thủy động học (DLS) hoặc cường độ ánh sáng tán xạ (Optim1000) bắt đầu tăng.

Theo cách khác, mẫu được chuyển vào dãy đa cuvet 9 µL. Dãy đa cuvet này được làm nóng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35°C đến 90°C ở tốc độ không đổi là 0,1°C/phút trong thiết bị Optim1000 (Avacta Analytical Inc.). Thiết bị liên tục ghi cường độ ánh sáng tán xạ của laze 266 nm với điểm số liệu xấp xỉ mỗi 0,5°C. Cường độ tán xạ ánh sáng được vẽ đồ thị theo nhiệt độ. Nhiệt độ bắt đầu kết tụ (T_agg) được định nghĩa là nhiệt độ mà tại đó cường độ ánh sáng tán xạ bắt đầu tăng.

Nhiệt độ nóng chảy được định nghĩa là điểm uốn trong đồ thị cường độ phát huỳnh quang với bước sóng

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Biểu hiện và tinh chế

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra như nêu trên trong phần nguyên liệu và phương pháp chung.

Kháng thể đặc hiệu kép được tinh chế từ dịch nổi bề mặt bằng cách kết hợp sắc ký ái lực protein A và sắc ký phân loại kích thước. Sản phẩm thu được được xác định đặc điểm về độ đồng nhất bằng các đặc điểm phổ khối và phân tích như độ tinh khiết bằng CE-SDS, hàm lượng monome và độ ổn định.

Các cấu trúc sơ cấp được mong đợi được phân tích bằng phổ khối ion hóa tia điện (ESI-MS) của kháng thể nguyên vẹn đã được khử glycosyl hóa và kháng thể đã được khử glycosyl hóa/được phân hủy bằng plasmin hoặc theo cách khác kháng thể được khử glycosyl hóa/được phân hủy bằng LysC giới hạn như được mô tả trong phần các phương pháp chung.

Phương pháp phân tích bổ sung (ví dụ độ ổn định nhiệt, phổ khối và đánh giá chức năng) chỉ được sử dụng sau khi tinh chế bằng protein A và SEC.

Ví dụ 2

Xác định khả năng gắn kết vào các sợi Aβ1-40 in vitro bằng ELISA

Sự gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với Aβ dạng sợi được đo bằng thử nghiệm ELISA. Một cách ngắn gọn, Aβ(1-40) được bọc ở 7 µg/mL trong PBS trên các đĩa Maxisorb trong 3 ngày ở 37°C để tạo ra Abeta dạng sợi, và sau đó được làm khô trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa này được phong bế bằng 1% CroteinC và 0,1% RSA trong PBS (chất đệm phong bế) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được rửa một lần bằng chất đệm rửa. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc đối chứng được bổ sung ở nồng độ lên đến 100 nM trong chất đệm phong bế và được ủ ở 4°C qua đêm. Sau 4 bước rửa, các cấu trúc được phát hiện bằng cách thêm kháng thể kháng IgG người-HRP (Jackson Immunoresearch) ở độ pha loãng 1:10.000 trong chất đệm phong bế (1 RT), sau đó là

rửa 6 lần và ủ trong TMB (Sigma). Độ hấp thụ được đọc ở 450 nm sau khi ngừng quá trình sinh màu bằng HCl 1N.

Ví dụ 3

Xác định khả năng gắn kết vào thụ thể transferin in vitro

Sự gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với thụ thể transferin của chuột được kiểm tra bằng phân tích FACS trên tế bào u tủy X63.AG8-563 của chuột. Nếu kháng thể Aβ thể hiện xu hướng gắn kết không đặc hiệu với tế bào Ag8, gắn kết đặc hiệu có thể được định lượng bằng cách ủ đồng thời với kháng thể kháng TfR của chuột với lượng dư 20 lần. Tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm, được rửa một lần bằng PBS và $5x10^4$ tế bào được ủ với chuỗi pha loãng 1,5 pM đến 10 nM của thể dung hợp polypeptit có hoặc không bổ sung 200 nM kháng thể kháng TfR của chuột trong 100 µL RPMI/10% FCS trong 1,5 giờ trên nước đá. Sau 2 lần rửa bằng RPMI/10% FCS, tế bào được ủ với kháng thể dê kháng IgG của người được bắt cặp với Phycoerythrin (Jackson Immunoresearch) ở độ pha loãng 1:600 trong RPMI/19% FCS trong thời gian 1,5 giờ trên nước đá. Tế bào được rửa lại, được tạo huyền phù lại trong RPMI/10% FCS và mức độ phát huỳnh quang sắc tố tảo đỏ được đo trên thiết bị FACS-Array (Becton-Dickinson).

Ví dụ 4

Thử nghiệm gắn kết dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt đối với sự tương tác kháng thể TfR người

Thử nghiệm gắn kết được thực hiện trên thiết bị BIAcore B 4000 (GE Healthcare) được lắp chip cảm biến C1 (GE Healthcare, số lô BR1005-35) được xử lý trước bằng kháng thể kháng Fab của người (GE Healthcare, số lô 28-9583-25) bằng cách sử dụng quy trình ghép cặp amin chuẩn theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Để đo động học, mẫu kháng thể được giữ cố định được bằng cách sử dụng thời gian tiếp xúc là 60 giây và tốc độ chảy là 10 µL/phút trong nước muối đệm phosphat, độ pH=7,4, 0,05% Tween 20 ở 25°C. Thụ thể transferin của người được gắn His6 tái tổ hợp (hệ thống R&D, số lô 2474-TR-050) được sử dụng để tăng các nồng độ và tín hiệu được kiểm soát qua thời gian. Thời gian trung bình kéo dài 150 giây đối với thời gian liên kết và 600 giây đối với thời gian phân ly ở tốc độ chảy là 30µL/phút được ghi. Số liệu được khớp bằng cách sử dụng mô hình gắn kết tỷ lệ 1:1 (Langmuir isotherm).

Ví dụ 5

Nhuộm mảng bám β-amyloit nguyên gốc của người từ các lát cắt mô não của bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer bằng huỳnh quang miễn dịch gián tiếp bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này

Kháng thể đặc hiệu kép có thể được kiểm tra khả năng nhuộm mảng bám β-amyloit nguyên gốc của người bằng cách phân tích hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp. Việc nhuộm đặc hiệu và nhạy mảng bám β-amyloit người chính xác có thể được chứng tỏ. Các phần điều nhiệt của các mô không được cố định từ vỏ não vùng thái dương thu được sau khi chết từ bệnh nhân được chẩn đoán dương tính với bệnh Alzheimer được đánh dấu bằng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp. Quá trình ủ hai bước được sử dụng để phát hiện kháng thể đặc hiệu kép đã gắn kết, mà được phát hiện bởi ái lực-kháng thể dê kháng IgG người (GAH555) (H+L) được tinh chế được liên hợp với thuốc nhuộm Alexa 555 (Molecular Probes). Các đối chứng có thể bao gồm các kháng thể IgG1 của người không liên quan (Sigma) và mình kháng thể thứ cấp, mà tất cả nên có kết quả âm tính.

Ví dụ 6

Phát sinh miễn dịch đối với mảng bám β-amyloit in vivo bằng kháng thể đặc hiệu kép nêu trong bản mô tả này trong mô hình bệnh Alzheimer trên chuột

Kháng thể đặc hiệu kép có thể được thử nghieemk trên chuột chuyển gen kép APP/PS2, mô hình chuột đối với chứng thoái hóa dạng tinh bột liên quan đến AD (Richards, J. Neuroscience, 23 (2003) 8989-9003) về khả năng của chúng trong việc phát sinh miễn dịch đối với mảng bám β-amyloit ở mức độ in vivo. Điều này cho phép đánh giá mức độ xâm nhập vào não và gắn kết vào mảng bám amyloit-β. Polypeptit dung hợp có thể được sử dụng ở các liều khác nhau so với kháng thể đơn dòng kháng Aβ trần và sau 6 ngày các con chuột được truyền nước muối đệm phosphat và não được đông lạnh trên đá khô và được chuẩn bị để tạo lát cắt cryo.

Sự có mặt của các kháng thể được gắn kết vào mảng bám β-amyloit có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phần điều nhiệt không được cố định bằng miễn dịch huỳnh quang gián tiếp được đánh dấu đơn với kháng thể dê kháng IgG của người (H+L) được liên hợp với thuốc nhuộm Alexa555 (GAH555) (Molecular Probes) ở nồng độ là 15 µg /ml trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Nhuộm phản chất nhuộm đối với mảng

bám amyloit có thể được thực hiện bằng cách ủ với BAP-2, kháng thể đơn dòng chuột kháng Aβ được liên hợp với Alexa 488 ở nồng độ là 0,5 µg /ml trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các lát được nhúng vào môi trường gắn huỳnh quang (S3023 Dako) và việc tạo ảnh được thực hiện bằng kính hiển vi laze đồng tiêu.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và bằng các ví dụ nhằm mục đích giúp hiểu rõ sáng chế, nhưng phần mô tả và các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Nội dung bộc lộ của tất cả các patent và tài liệu khoa học được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa toàn bộ vào bản mô tả này một cách rõ ràng bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đặc hiệu kép chứa:

a) kháng thể chứa hai cặp, mà mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể gồm các axit amin của SEQ ID NO: 1 và chuỗi nặng kháng thể gồm các axit amin của SEQ ID NO: 2, trong đó các vị trí gắn kết được tạo ra bằng mỗi cặp của các cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) đoạn Fab chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, trong đó đoạn Fab được dung hợp với đầu tận C của một trong các chuỗi nặng của kháng thể, trong đó điểm gắn kết của đoạn Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là protein A-beta của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin của người.

2. Dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

3. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó đoạn Fab được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit; và

trong đó (a) chuỗi nặng được dung hợp với đoạn Fab có gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C tripeptit LSP trong đó prolin của nó được dung hợp trực tiếp với gốc axit amin thứ nhất của đoạn Fab hoặc của tác nhân liên kết peptit thông qua liên kết peptit, và (b) chuỗi nặng không được dung hợp với đoạn Fab có gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C tripeptit LSP, hoặc SPG, hoặc PGK.

4. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó đoạn Fab được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit.

5. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó:

a) chuỗi nặng được dung hợp với đoạn Fab có gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C tripeptit LSP trong đó prolin của nó được dung hợp trực tiếp với gốc axit amin thứ nhất của đoạn Fab hoặc của tác nhân liên kết peptit thông qua liên kết peptit, và

b) chuỗi nặng mà không được dung hợp với các đoạn Fab bổ sung có gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C tripeptit LSP, hoặc SPG, hoặc PGK.

6. Kháng thể đặc hiệu kép theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

7. Dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 6, 7, và 8.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG A-BETA CỦA NGƯỜI/THỤ THỂ TRANSFERIN CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P33106-WO

<150> EP 15188064.8
<151> 2015-10-02

<160> 22

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0015-LC1

<400> 1

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 2
<211> 455
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0015-HC1

<400> 2

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 3
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0015-LC2

<400> 3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215

<210> 4
<211> 229
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0015-Fab

<400> 4

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

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

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro
115 120 125

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
130 135 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
145 150 155 160

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
165 170 175

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
195 200 205

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
210 215 220

Asn Arg Gly Glu Cys
225

<210> 5
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 6
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0012-LC1

<400> 6

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 455
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0012-HC1

<400> 7

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 8
<211> 229
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0012-LC2

<400> 8

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

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

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro
115 120 125

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
130 135 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
145 150 155 160

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
165 170 175

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
195 200 205

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
210 215 220

Asn Arg Gly Glu Cys
225

<210> 9
<211> 688
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> 0012-HC2

<400> 9

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser
465 470 475 480

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
485 490 495

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
500 505 510

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala
515 520 525

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
530 535 540

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr

545 550 555 560

Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly
565 570 575

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
580 585 590

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
595 600 605

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
610 615 620

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
625 630 635 640

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
645 650 655

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
660 665 670

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675 680 685

<210> 10
<211> 702
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0015-HC2

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```
                20                  25                  30

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
        115                 120                 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    130                 135                 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro
145                 150                 155                 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
                165                 170                 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
            180                 185                 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
        195                 200                 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val
    210                 215                 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240
```

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly
465 470 475 480

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
485 490 495

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln His
500 505 510

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser
515 520 525

Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr
530 535 540

Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr
565 570 575

Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
580 585 590

Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
595 600 605

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
610 615 620

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
625 630 635 640

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
645 650 655

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
660 665 670

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
675 680 685

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695 700

<210> 11
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0020-LC1

<400> 11

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 12
<211> 457
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0020-HC1

<400> 12

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

<210> 13
<211> 947
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0020-HC2

<400> 13

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
        115                 120                 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    130                 135                 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro
145                 150                 155                 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
                165                 170                 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
```

180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser
465 470 475 480

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
485 490 495

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
500 505 510

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala
515 520 525

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
530 535 540

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
545 550 555 560

Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly
565 570 575

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
580 585 590

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
595 600 605

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp

610 615 620

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
625 630 635 640

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
645 650 655

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
660 665 670

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
675 680 685

Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
690 695 700

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
705 710 715 720

Gly Gly Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
725 730 735

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
740 745 750

Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
755 760 765

Ile Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala
770 775 780

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys
785 790 795 800

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
805 810 815

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp
820 825 830

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
835 840 845

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
850 855 860

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
865 870 875 880

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
885 890 895

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
900 905 910

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
915 920 925

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
930 935 940

Lys Ser Cys
945

<210> 14
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0024-LC1

<400> 14

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 15
<211> 455
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0024-HC1

<400> 15

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

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

385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 16
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0024-LC2

<400> 16

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn

85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215

<210> 17
<211> 702
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0024-HC2

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

```
                20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
            100                 105                 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
        115                 120                 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    130                 135                 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145                 150                 155                 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
                165                 170                 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
            180                 185                 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
        195                 200                 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
    210                 215                 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240
```

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

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
            260                 265                 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
        275                 280                 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    290                 295                 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305                 310                 315                 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
                325                 330                 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
            340                 345                 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
        355                 360                 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    370                 375                 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385                 390                 395                 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                405                 410                 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
            420                 425                 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
        435                 440                 445
```

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly
465 470 475 480

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
485 490 495

Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln His
500 505 510

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser
515 520 525

Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr
530 535 540

Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
545 550 555 560

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr
565 570 575

Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
580 585 590

Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
595 600 605

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
610 615 620

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
625 630 635 640

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
645 650 655

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

660 665 670

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
675 680 685

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695 700

<210> 18
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

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

Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 19
<211> 108

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-023 biến thể VH được làm giống như của người_DASG

<400> 20

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

Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala

20 25 30

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-009 Biến thể VL được làm giống như của người_NYA

<400> 21

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 22
<211> 760
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp

545 550 555 560

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
755 760