



(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)



1-0032611

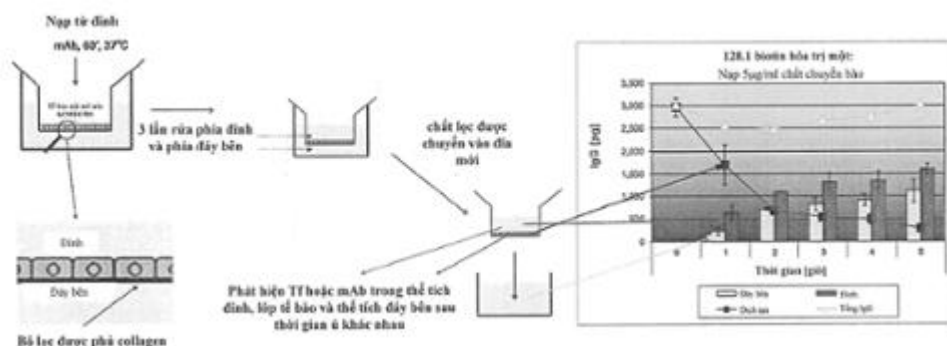
(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

- (21) 1-2017-04671 (22) 22/06/2016
(86) PCT/EP2016/064460 22/06/2016 (87) WO 2016/207240 29/12/2016
(30) 15173508.1 24/06/2015 EP; 15176084.0 09/07/2015 EP
(45) 25/07/2022 412 (43) 25/05/2018 362A
(73) F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
(72) DENGLE, Stefan (DE); GEORGES, Guy (BE); GOEPFERT, Ulrich (DE);
NIEWOEHRER, Jens (DE); SCHLOTHAUER, Tilman (DE).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC LÀM GIỐNG NHƯ CỦA NGƯỜI GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI THỤ THỂ TRANSFERRIN Ở NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó, bao gồm i) miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 01, và ii) miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 26, trong đó kháng thể có tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người bằng hoặc thấp hơn (tức là nhiều nhất) tốc độ phân ly của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó, nhờ đó tốc độ phân ly được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt, và nhờ đó kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 có miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 64 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể của thụ thể kháng transferrin có tốc độ phân ly được thiết kế cho thụ thể transferrin ở người và việc sử dụng chúng làm mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mức thẩm thấu vào não của các thuốc rối loạn thần kinh như ví dụ, các thuốc sinh trị liệu lớn hoặc thuốc phân tử nhỏ có mức độ thẩm thấu vào não thấp, bị hạn chế một cách nghiêm ngặt bởi hàng rào máu-não (BBB) rộng và không lọt được cùng với thành phần tế bào còn lại trong đơn vị mạch thần kinh (NVU). Nhiều chiến lược để khắc phục được trở ngại này đã được thử nghiệm và một chiến lược là sử dụng con đường chuyển bào được điều tiết bởi các thụ thể nội sinh được biểu hiện trên nội mô mao mạch não (thụ thể hàng rào máu não). Các protein tái tổ hợp như kháng thể đơn dòng hoặc peptit đã được thiết kế kháng các thụ thể này để có thể phân bố các chất sinh trị liệu qua trung gian thụ thể vào não. Tuy nhiên, các chiến lược để tối đa hóa mức hấp thụ vào não trong khi tối thiểu hóa sự phân loại sai bên trong tế bào nội mô não (BEC), và phạm vi tích tụ bên trong một số hạt cơ quan (đặc biệt là các hạt cơ quan dẫn đến sự biến chất chất sinh trị liệu) trong BEC, vẫn chưa được nghiên cứu.

Các kháng thể đơn dòng và các chất sinh trị liệu khác có hoạt lực trị liệu lớn để điều trị bệnh lý trong hệ thần kinh trung ương (CNS). Tuy nhiên, đường vào não của chúng bị chặn bởi BBB. Các nghiên cứu trước đó đã minh họa rằng IgG với lượng phần trăm rất nhỏ (khoảng 0,1%) được tiêm trong dòng máu có thể thẩm thấu vào não CNS (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52 (1974) 1158-1164). Điều này chắc chắn hạn chế tác dụng dược lý bất kỳ do nồng độ thấp của kháng thể ở bên trong CNS.

Đã phát hiện ra từ trước là phần trăm kháng thể phân bố vào CNS có thể được cải thiện bằng cách lợi dụng thụ thể BBB (tức là, thụ thể transferrin, thụ thể insulin và thụ thể tương tự) (xem, ví dụ, WO 95/02421).

Do đó, có nhu cầu về hệ phân bố các thuốc rối loạn thần kinh qua BBB để vận chuyển các thuốc này vào não một cách hiệu quả.

Trong WO 2014/033074, việc vận chuyển hàng rào máu-não được báo cáo.

Trong WO 2014/189973, kháng thể của thụ thể kháng transferrin và các phương pháp sử dụng được báo cáo. Cũng được báo cáo thêm trong tài liệu này là việc hướng đích thụ thể BBB bằng kháng thể ái lực cao đặc hiệu truyền thông thường dẫn đến việc gia tăng vận chuyển BBB bị hạn chế. Sau đó phát hiện ra rằng biên độ hấp thụ kháng thể vào và biên độ phân bố trong CNS liên quan theo tỷ lệ nghịch với ái lực gắn kết của nó đối với thụ thể BBB trong số các kháng thể kháng BBB được nghiên cứu. Ví dụ, kháng thể ái lực thấp đối với thụ thể transferrin (TfR) được định liều ở mức liều lượng trị liệu cải thiện đáng kể sự vận chuyển BBB và giữ được CNS của kháng thể kháng TfR so với kháng thể kháng TfR ái lực cao hơn, và khiến cho có thể đạt được nồng độ trị liệu trong CNS một cách dễ dàng hơn (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43). Có được bằng chứng về sự vận chuyển BBB như vậy bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu kép mà gắn kết cả TfR và enzym phân tách protein tiền chất dạng tinh bột (APP), β -secretaza (BACE1). Liều đơn toàn thân của kháng thể đặc hiệu kép kháng TfR/BACE1 được xử lý kỹ thuật bằng cách sử dụng kháng thể ái lực thấp không những dẫn đến việc hấp thụ kháng thể ở mức đáng kể trong não, mà còn làm giảm mạnh nồng độ A β 1-40 trong não so với một mình kháng BACE1 đơn đặc hiệu, gợi ý rằng sự thâm thấu vào BBB ảnh hưởng đến hoạt lực kháng BACE1 (Atwal et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43; Yu et al., Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44).

Ngoài ra, một đánh giá phi lâm sàng và kỹ lưỡng về độ an toàn của kháng thể đơn dòng (mAb) được dự định để áp dụng trị liệu là rất quan trọng do độ phức tạp tăng lên theo các khía cạnh xử lý kỹ thuật kháng thể và độ biến đổi cảm ứng bởi tính đa dạng của hệ tế bào sản sinh tái tổ hợp để tạo ra kháng thể. Ngoài ra, cấu trúc phức tạp của chúng, các chức năng sinh học độc nhất và thời gian bán hủy lâu hơn của mAb so với các thuốc phân tử nhỏ truyền thống bổ sung vào các cân nhắc an toàn ngoài các yếu tố quan tâm do việc sử dụng lâm sàng kéo dài của mAb để điều trị các bệnh mạn tính (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

Mục tiêu tổng quát của các nghiên cứu phi lâm sàng đối với mAb là để xác định các tính chất gây độc của mAb đang quan tâm và cung cấp thông tin về sự phát triển sản

phẩm. Các mục tiêu chính của đánh giá phi lâm sàng này là (1) nhận biết các cơ quan đích về độ độc và xác định xem độ độc này có đảo ngược sau khi điều trị hay không, (2) nhận biết liều ban đầu an toàn cho thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I ở người và kế hoạch gia tăng liều tiếp đó, (3) cung cấp thông tin để theo dõi các thông số an toàn trong các thử nghiệm lâm sàng và (4) cung cấp số liệu về độ an toàn để hỗ trợ bảo hộ nhân sản phẩm. Để đạt được các mục đích này, cả nghiên cứu phi lâm sàng *in vitro* và *in vivo* nhằm mục đích xác định và hiểu các tính chất dược lý của kháng thể đều được tiến hành (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Để đánh giá phi lâm sàng thành công về độ an toàn của mAb, hầu hết các loài động vật thích hợp nên được lựa chọn để thử nghiệm độ độc (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Loài thích hợp là loài trong đó kháng thể có hoạt tính dược lý, kháng nguyên đích nên có mặt hoặc được biểu hiện và protein phản ứng chéo trong mô nên tương tự như ở người (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. and Mertsching, E., trong tài liệu: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., et al., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Sử dụng thử nghiệm hóa miễn dịch hoặc thử nghiệm chức năng, loài động vật thích hợp biểu hiện epitop mong muốn và cho thấy protein phản ứng chéo trong mô tương tự như mô người có thể được nhận biết (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Các nghiên cứu phản ứng chéo trong loài, mà hữu ích trong quy trình này, liên quan đến nghiên cứu hóa mô miễn dịch của các mô từ các loài khác nhau bằng cách sử dụng vi dây mô từ nhiều loài có bán trên thị trường (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Theo một cách khác, việc đánh giá về mức gắn kết kháng thể với các tế bào từ các động vật này bằng cách phân loại tế bào được hoạt hóa dòng (FACS) thường là nhạy hơn so với phân tích hóa mô miễn dịch của các phần mô (Lynch, C.M., et al., mAbs 1

(2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., trong tài liệu: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). Trình tự ADN và trình tự axit amin của kháng nguyên đích nên được so sánh giữa các loài; tính tương đồng giữa các loài nên được xác định (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., trong tài liệu: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Ngoài ra, sự phân bố sinh học, chức năng và cấu trúc của kháng nguyên cần phải tương đương nhau giữa các loài động vật thích hợp và người để cho phép đánh giá độ độc phát sinh do sự gắn kết kháng thể của kháng nguyên đích, được đề cập đến là độ độc mục tiêu (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Ngoài ra, độ tương tự lớn trong phân phối trong mô kháng nguyên đích ở loài động vật này và người khiến cho có khả năng hơn trong việc các cơ quan đích có độ độc được nhận biết ở động vật sẽ dự báo độ độc tiềm ẩn ở người. Sự thiếu độ tương đồng trong sự phân bố trong mô kháng nguyên giữa các loài động vật và người không loại trừ hoàn toàn việc sử dụng loài động vật này cho các nghiên cứu độ độc tính, nhưng chênh lệch này phải được đưa ra cân nhắc để đánh giá nguy cơ ở người. Như đối với mật độ hoặc ái lực kháng nguyên, độ tương đương tuyệt đối giữa mô hình động vật và người không được yêu cầu tương tự. Việc chứng minh về độ thích hợp của loài được chọn để thử nghiệm độ độc nên được bao gồm khi đưa ra xem xét quản lý. Nếu chỉ có một loài được sử dụng để đánh giá độ an toàn, tóm tắt về các thí nghiệm mà chứng minh sự không có loài thích hợp bổ sung được cho phép (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11).

Nếu kháng thể đơn dòng được dự định để sử dụng để điều trị bệnh không có tính phản ứng chéo trong loài thì kháng thể thay thế phải được sử dụng hoặc một loài khác cho mô hình này. Vì vậy, các kháng thể thay thế là giải pháp tiềm năng cho thử nghiệm về độ an toàn hạn chế có thể có với kháng thể đơn dòng được làm giống như của người có tính phản ứng chéo trong loài bị hạn chế. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có chỉ tiêu được xác định mà kháng thể thay thế tiềm năng nên được đánh giá trước khi sử dụng nó để xác định các vấn đề an toàn đối với tác nhân lâm sàng (Regulatory Toxicology and Pharmacology Volume 40, Issue 3, December 2004, trang 219–226).

Vì vậy, để nhận biết mô hình động vật cho mAb cụ thể, các cân nhắc trên đây phải được thực hiện. Nhưng tuy nhiên cần thiết là mAb đang quan tâm có tính phản ứng chéo với kháng nguyên đích của loài thử nghiệm. Nếu không thì thậm chí là loài thử nghiệm thích hợp nhất không thể được sử dụng. Do đó, có nhu cầu đối với mAb là không có tính phản ứng chéo trong loài nhưng có tính phản ứng chéo giữa các loài đối với đích của nó ở người và loài được dự định cho các thử nghiệm phi lâm sàng.

Trong EP 2 708 560, kháng thể nhận diện một cách cụ thể thụ thể transferrin được báo cáo. Trong FR 2 953 841, kháng thể được định hướng kháng thụ thể transferrin và việc sử dụng chúng cho liệu pháp miễn dịch của khối u phụ thuộc vào sắt được báo cáo. Trong US 2009/162359, kháng thể đặc hiệu kép hóa trị hai được báo cáo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đã phát hiện ra rằng kháng thể của thụ thể kháng transferrin như được báo cáo trong bản mô tả có thể được sử dụng làm mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não để phân bố phần tử tác động đến não qua hàng rào máu-não vào não. Theo một số phương án, mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não là phần tử gắn kết hóa trị một mà gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin. Kháng thể của thụ thể kháng transferrin như được báo cáo trong bản mô tả khi được sử dụng làm mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não là hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị các rối loạn thần kinh, như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và bệnh Alzheimer và bệnh Parkinson cùng hoành hành.

Được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó (cyTfR). Theo một số phương án, kháng thể của thụ thể kháng transferrin

- gắn kết với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó (cyTfR);
- có tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người bằng hoặc thấp hơn (tức là nhiều nhất) tốc độ phân ly của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó, nhờ đó tốc độ phân ly được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt, và nhờ đó kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 có miền biến đổi chuỗi

nặng của SEQ ID NO: 64 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65;

- gắn kết với tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người nằm trong khoảng và bao gồm từ 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó, bao gồm

- i) miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 01, và
- ii) miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 26,

trong đó kháng thể nêu trên có tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người bằng hoặc thấp hơn (tức là nhiều nhất) tốc độ phân ly của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó,

nhờ đó tốc độ phân ly được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt, và

nhờ đó kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 có miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 64 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65.

Theo một phương án, tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người là nằm trong khoảng và bao gồm từ 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin prolin (P) (đánh số theo Kabat) ở vị trí 80 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin asparagin (N) (đánh số theo Kabat) ở vị trí 91 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin alanin (A) (đánh số theo Kabat) ở vị trí 93 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin serin (S) (đánh số theo Kabat) ở vị trí 100g trong miền biến đổi chuỗi nặng.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin glutamin (Q) (đánh số theo Kabat) ở vị trí 100g trong miền biến đổi chuỗi nặng.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin serin (S) (đánh số theo Kabat) ở vị trí 65 trong miền biến đổi chuỗi nặng.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin glutamin (Q) (đánh số theo Kabat) ở vị trí 105 trong miền biến đổi chuỗi nặng.

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin prolin (P) ở vị trí 80 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, gốc axit amin asparagin (N) ở vị trí 91 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, gốc axit amin alanin (A) ở vị trí 93 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, gốc axit amin serin (S) ở vị trí 100g trong miền biến đổi chuỗi nặng, gốc axit amin serin (S) ở vị trí 65 trong miền biến đổi chuỗi nặng, và gốc axit amin glutamin (Q) ở vị trí 105 trong miền biến đổi chuỗi nặng (đánh số theo Kabat).

Theo một phương án, kháng thể có gốc axit amin prolin (P) ở vị trí 80 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, gốc axit amin asparagin (N) ở vị trí 91 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, gốc axit amin alanin (A) ở vị trí 93 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ, gốc axit amin glutamin (Q) ở vị trí 100g trong miền biến đổi chuỗi nặng, gốc axit amin serin (S) ở vị trí 65 trong miền biến đổi chuỗi nặng, và gốc axit amin glutamin (Q) ở vị trí 105 trong miền biến đổi chuỗi nặng (đánh số theo Kabat).

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71, 72 hoặc 73; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể của thụ thể kháng transferrin bao gồm (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 72; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người (huTfR) bao gồm

- i) trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự đối với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 ít nhất bằng 90%, và
- ii) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự đối với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 ít nhất bằng 90%,

trong đó kháng thể có khoảng cùng một tốc độ phân ly như kháng thể bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 24 và trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 37.

Theo một phương án, tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người là nằm trong khoảng và bao gồm từ 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây.

Một khía cạnh được ưu tiên như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người (huTfR) bao gồm

- i) trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24, và
- ii) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh, kháng thể là kháng thể đa đặc hiệu có ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết đối với thụ thể transferrin và ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết đối với đích trị liệu. Theo một phương án, kháng thể bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất mà gắn kết thụ thể transferrin và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai mà gắn kết kháng nguyên nào. Theo một phương án khác, kháng nguyên nào được chọn từ nhóm bao gồm Abeta ở người, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (epidermal growth factor receptor-EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô người 2 (HER2), alpha-synuclein người, tau người, được phosphoryl hóa ở gốc tyrosin hoặc serin, CD20 người, protein tiền chất dạng tinh bột (APP), và glucocerebrosidaza người. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả

- i) thụ thể transferrin và Abeta, hoặc
- ii) thụ thể transferrin và CD20, hoặc

- iii) thụ thể transferrin và alpha-synuclein, hoặc
- iv) thụ thể transferrin và phospho-tau, hoặc
- v) thụ thể transferrin và HER2, hoặc
- vi) thụ thể transferrin và glucocerebrosidaza.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 81 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 82 tạo ra vị trí gắn kết cho Abeta người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 80 tạo ra vị trí gắn kết cho CD20 người. Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa thay thế gốc axit amin ở vị trí 11 theo Kabat bằng axit amin bất kỳ ngoài leuxin. Theo một phương án, biến thể thể bao gồm thay thế gốc axit amin ở vị trí 11 theo Kabat bằng axit amin không phân cực. Theo một phương án được ưu tiên, biến thể thể bao gồm thay thế gốc axit amin ở vị trí 11 theo Kabat trong miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79 bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm valin, leuxin, isoleuxin, serin, và phenylalanin.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 83 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 84 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 85 và miền

biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 86 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 87 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 88 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 89 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 90 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 91 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 92 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 93 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 94 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và vị trí gắn kết cho i) glucocerebrosidaza có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 97, hoặc ii) biến thể chức năng của SEQ ID NO: 97 có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, hoặc iii) biến thể chức

năng của SEQ ID NO: 97 có một hoặc nhiều đột biến, làm khuyết hoặc xen axit amin, hoặc iv) biến thể chức năng bị cắt cụt của SEQ ID NO: 97 có ít nhất một gốc axit amin ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C hoặc trong trình tự axit amin được làm khuyết, hoặc v) tổ hợp của iii) và iv).

Theo một phương án của tất cả các khía cạnh, kháng thể bao gồm

- i) vùng Fc homodime của phân lớp IgG1 ở người tùy ý với đột biến P329G, L234A và L235A, hoặc
- ii) vùng Fc homodime của phân lớp IgG4 ở người tùy ý với các đột biến P329G, S228P và L235E, hoặc
- iii) vùng Fc homodime trong đó:
 - a) một polypeptit của vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc
 - b) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc
 - c) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C,
 hoặc
- iv) vùng Fc homodime của phân lớp IgG4 ở người trong đó cả hai polypeptit của vùng Fc đều chứa các đột biến P329G, L234A và L235A và
 - a) một polypeptit của vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc
 - b) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc
 - c) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C,

hoặc

- v) vùng Fc homodime của phân lớp IgG4 ở người trong đó cả hai polypeptit của vùng Fc đều chứa các đột biến P329G, S228P và L235E và
 - a) một polypeptit của vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc
 - b) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc
 - c) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit còn lại của vùng Fc chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh, kháng thể là CrossMab.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin bao gồm

- i) miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57 và 58, và miền biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 60, 61, 62 và 63,

hoặc

- ii) miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 và 25, và miền biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 và 47.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là được phẩm chứa kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả và chất mang được dùng.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là việc sử dụng kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả để bào chế thuốc để điều trị rối loạn thần kinh.

Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn bệnh thần kinh, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh thị giác, rối loạn co giật, rối loạn tích lũy lysosom, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh virus hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, viêm CNS, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh ung thư dương tính với CD20 có di căn đến não, và bệnh ung thư dương tính với Her2 có di căn đến não.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là việc sử dụng kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả để bào chế thuốc để vận chuyển một hoặc nhiều hợp chất qua hàng rào máu-não (BBB).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Sơ đồ về thử nghiệm chuyển bào

Fig.2: Tốc độ phân ly của các kháng thể của thụ thể kháng transferrin khác nhau được xác định ở nhiệt độ 25°C bằng cách sử dụng BIAcore; 1: 128,1; 2: 128,1 được dung hợp với kháng thể kháng pTau mAb86; 3: 567; 4: 932; 5: 567 được dung hợp với kháng thể kháng pTau mAb86; 6: 1026; 7: 1027; hình vuông: gắn kết với thụ thể transferrin ở khi đầu chó; hình tròn: gắn kết với thụ thể transferrin ở người; trục y: tốc độ phân ly [1/giây].

Fig.3: Tốc độ phân ly của các kháng thể của thụ thể kháng transferrin khác nhau được xác định ở nhiệt độ 37°C bằng cách sử dụng BIAcore; 1: 128,1; 2: 932; 3: 1026; 4: 1027; hình vuông: gắn kết với thụ thể transferrin ở khi đầu chó; hình tròn: gắn kết với thụ thể transferrin ở người; trục y: tốc độ phân ly [1/giây]

Mô tả chi tiết sáng chế

Được báo cáo trong bản mô tả là biến thể được làm giống như của người của kháng thể 299 thể hiện sự chuyển bào ở mức độ cao trong thử nghiệm chuyển bào theo Ví dụ 8, có tính phản ứng chéo với thụ thể transferrin ở người và ở khi đầu chó, tức là gắn kết đặc hiệu với cả hai chất tương đồng của thụ thể transferrin, cho thấy khả năng nhuộm màu tế bào tốt và có thời gian bán hủy tương tự (được phản ánh bởi tốc độ phân ly) như kháng thể chuột 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khi đầu chó đối với thụ thể transferrin ở người.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể được làm giống như của người gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người, trong đó kháng thể này bao gồm

HVR của SEQ ID NO: 66, 68 và 72 trong miền biến đổi chuỗi nặng,

và

HVR của SEQ ID NO: 75, 76 và 78 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án, kháng thể được làm giống như của người bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37.

Theo một phương án, kháng thể được làm giống như của người không có chức năng tác động.

Theo một phương án, kháng thể được làm giống như của người gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó.

Theo một phương án, kháng thể được làm giống như của người là:

- a) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người, hoặc
- b) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người, hoặc
- c) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người với các đột biến L234A, L235A và P329G,
- d) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P, L235E và tùy ý P329G,
- e) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người với 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 còn lại tương ứng, hoặc
- f) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P, L235E và tùy ý 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 còn lại tương ứng.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm:

i) vị trí gắn kết thứ nhất chứa miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37,

và

ii) vị trí gắn kết thứ hai được chọn từ:

- a) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 81 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 82, hoặc
- b) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 83 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 84, hoặc
- c) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 85 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 86, hoặc
- d) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 87 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 88, hoặc
- e) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 91 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 92, hoặc
- f) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 89 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 90, hoặc
- g) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 93 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 94, hoặc
- h) miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 80.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là được phẩm chứa kháng thể theo như được báo cáo trong bản mô tả và tùy ý chất mang được dùng.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả để sử dụng để điều trị rối loạn thần kinh.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là việc sử dụng kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả để bào chế thuốc.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là phương pháp điều trị bao gồm bước sử dụng kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả để điều trị rối loạn thần kinh.

I. Định nghĩa

“Khung làm việc thể nhận ở người” với các mục đích trong bản mô tả là khung làm việc bao gồm trình tự axit amin của khung làm việc của miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung làm việc của miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có nguồn gốc từ khung làm việc globulin miễn dịch ở người hoặc khung làm việc liên ứng ở người, như được định nghĩa dưới đây. Khung làm việc thể nhận ở người “có nguồn gốc từ” khung làm việc globulin miễn dịch ở người hoặc khung làm việc liên ứng ở người có thể bao gồm cùng một trình tự axit amin của nó, hoặc có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lượng axit amin thay đổi 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 làm việc thể nhận ở người của VL có trình tự giống như trình tự khung làm việc globulin miễn dịch VL ở người hoặc trình tự khung làm việc liên ứng ở người của VL.

“Ái lực” được dùng để chỉ độ mạnh của tổng thể các tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí liên kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tượng liên kết kèm theo của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả, “ái lực liên kết” được dùng để chỉ ái lực liên kết bên trong mà phản ánh tương tác theo tỷ lệ 1:1 giữa các thành viên của cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X với cặp Y kèm theo của nó có thể thường được đặc trưng bởi 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 được mô tả ở đây. Các phương án minh họa và các phương án lấy làm ví dụ cụ thể để đo ái lực liên kết được mô tả dưới đây.

Kháng thể “trưởng thành ái lực” được dùng để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều cải biến thay đổi ở một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR), so với kháng thể gốc không có các cải biến thay đổi như vậy, các cải biến thay đổi này làm cải thiện ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả 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, kháng thể đa hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và mảnh kháng thể với điều kiện chúng biểu hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn.

"Mảnh kháng thể" được dùng để chỉ phân tử khác với kháng thể nguyên vẹn bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn liên kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn liên kết với. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; kháng thể thể đôi; kháng thể tuyến tính; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); và kháng thể đa hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể này.

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

"Lớp" kháng thể dùng để chỉ kiểu miền hằng định hoặc vùng hằng định mà chuỗi nặng của nó có. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài trong số đó có thể được chia nhỏ thêm thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Miền hằng định của chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của globulin miễn dịch lần lượt được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ .

"Chức năng tác động" dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, thay đổi theo lớp kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động của kháng thể bao gồm: gắn kết C1q và gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC); gắn kết thụ thể Fc; gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC); thực bào; điều hòa giảm thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và hoạt hóa tế bào B.

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

Thuật ngữ "vùng Fc" trong bản mô tả được sử dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc biến thể. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG ở 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 có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trừ khi được nêu khác đi trong bản mô tả, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong 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.

"Khung" hoặc "FR" dùng để chỉ các gốc của miền biến đổi khác với 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, trình tự HVR và FR thường có trong trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ “kháng thể có độ dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn”, và “kháng thể toàn vẹn” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản là tương tự với cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc như được định nghĩa trong bản mô tả.

Thuật ngữ "tế bào vật chủ", "dòng tế bào vật chủ", và "nuôi cấy tế bào vật chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và dùng để chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thể hệ con của các tế bào này. Tế bào vật chủ bao gồm "thể biến nạp" và "tế bào được biến nạp," bao gồm tế bào được biến nạp sơ cấp và thể hệ con có nguồn gốc từ đó bất kể số lần cấy chuyển. Thể hệ con có thể không hoàn toàn giống với tế bào gốc về thành phần axit nucleic, mà có thể chứa các đột biến. Thể hệ con đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm trong bản mô tả.

“Khung liên ứng ở người” là khung tượng trưng cho gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất trong quá trình chọn lọc trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch ở người. Nhìn chung, việc chọn lọc trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch ở người là từ nhóm con của trình tự miền biến đổi. Nhìn chung, nhóm con của trình tự là nhóm con như trong 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, nhóm con là nhóm con kappa I như trong Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, nhóm con là nhóm con III như trong Kabat et al., nêu trên.

Kháng thể “được làm giống như của người” dùng để chỉ kháng thể khảm bao gồm các gốc axit amin từ HVR không phải của người và các gốc axit amin từ FR người. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống như của người bao gồm gần như tất cả ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các HVR (ví dụ, CDR) tương ứng với các HVR của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc gần như tất cả các FR tương ứng với các FR của kháng thể người. Kháng thể được làm giống như của người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể 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 nhân hóa.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “HVR”, như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ mỗi một trong các vùng của miền biến đổi kháng thể mà siêu biến đổi trong trình tự (“vùng quyết định bổ thể” hoặc “CDR”) và tạo ra các vòng được xác định về mặt cấu trúc (“vòng siêu biến”), và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc kháng nguyên (“thể tiếp xúc kháng nguyên”). Nhìn chung, kháng thể bao gồm sáu HVR; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3).

HVR trong bản mô tả bao gồm:

- (a) vòng siêu biến xuất hiện ở gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (Chothia, C. and Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);
- (b) CDR xuất hiện ở 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) thể tiếp xúc kháng nguyên xuất hiện ở 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) tổ hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm các gốc axit amin HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), và 94-102 (H3).

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

“Cá thể” hoặc “đối tượng” là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo một số phương án, cá thể hoặc đối tượng này là người.

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

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

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản là đồng nhất, tức là, từng kháng thể riêng rẽ bao gồm trong quần thể này là giống hệt và/hoặc gắn kết cùng một epitop, ngoại trừ các biến thể kháng thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc xuất hiện trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với số lượng nhỏ. Trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng kháng các thể quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng được định hướng kháng một thể quyết định đơn lẻ trên kháng nguyên. Vì vậy, chất cải biến “đơn dòng” chỉ đặc điểm của kháng thể như thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản là đồng nhất, và không được hiểu là phải sản xuất 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 các kỹ

thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở, phương pháp lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể, và các phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người, các phương pháp như vậy và các phương pháp lấy làm ví dụ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được mô tả ở đây.

"Kháng thể tự nhiên" dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên với các cấu trúc thay đổi. Ví dụ, kháng thể IgG tự nhiên là glycoprotein dạng heterotetrame có khoảng 150000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ giống hệt và hai chuỗi nặng giống hệt được gắn kết bằng disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền hằng định (CH1, CH2, và CH3). Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là miền nhẹ hằng định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được quy định vào một trong hai kiểu, gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền hằng định của nó.

Thuật ngữ "tờ rời kèm theo bao gói" được sử dụng để chỉ các hướng dẫn thường được bao gồm trong các bao gói bán trên thị trường chứa các sản phẩm trị liệu, chứa thông tin về chỉ định, cách dùng, liều lượng, sử dụng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu như vậy.

"Phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin" đối với trình tự polypeptit đối chiếu được xác định dưới dạng phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà giống hệt với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit đối chiếu, sau khi sắp xếp 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 biến thể thể bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp xếp nhằm mục đích xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được theo các cách khác nhau thuộc kỹ năng trong lĩnh vực này, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính bán trên thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định các thông số thích hợp để sắp xếp trình tự, bao gồm giải thuật bất kỳ cần để đạt được mức sắp xếp tối đa trên toàn bộ độ dài của các trình tự được so sánh. Tuy nhiên, nhằm mục đích trong bản mô tả, 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 đồng thời lưu trữ tài liệu để sử dụng tại Cục Bản quyền Mỹ, Washington D.C., 20559, nơi đơn này được đăng ký dưới số đăng ký bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 có thể mua được trên thị trường từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX số V4.0D. Tất cả các thông số so sánh trình tự được cài 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 cho trước đối với, với, hoặc đối lập với trình tự axit amin B cho trước (có thể được nêu theo một cách khác là trình tự axit amin A cho trước có hoặc bao gồm % độ đồng nhất trình tự axit amin nhất định đối với, với, hoặc đối lập với trình tự axit amin B cho trước) được tính như sau:

$$100 \text{ lần phân số } X/Y$$

trong đó X là số lượng gốc axit amin được ghi điểm là cặp giống hệt bởi chương trình sắp xếp trình tự ALIGN-2 trong quá trình sắp xếp A và B của chương trình, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Cần hiểu rằng khi độ dài của trình tự axit amin A không bằng với độ dài của trình tự axit amin B, thì % độ đồng nhất trình tự axit amin của A đối với B sẽ không bằng % độ đồng nhất trình tự axit amin của B đối với A. Trừ khi được nêu khác đi một cách cụ thể, tất cả các giá trị % độ đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả thu được như được mô tả trong đoạn ngay trên bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

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

“Chất mang dược dụng” dùng để chỉ một thành phần trong dược phẩm, khác với thành phần hoạt tính, không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất ổn định, hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả, “điều trị” (và các dạng biến đổi ngữ pháp của nó như “điều trị” hoặc “việc điều trị”) dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng với nỗ lực làm

thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể được điều trị, và có thể được thực hiện để phòng ngừa hoặc trong tiến trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng điều trị mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn chặn sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, làm dịu các triệu chứng, giảm bớt hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn ngừa di căn, làm giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và làm thuyên giảm hoặc cải thiện sự tiên lượng. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn 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 chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể liên quan đến việc gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, một cách tương ứng) của kháng thể tự nhiên thường có cấu trúc tương tự nhau, với mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (FR) được bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). (Xem, ví dụ, 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 đủ để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể gắn kết kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể gắn kết 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). Việc đánh số gốc axit amin trong vùng biến đổi (vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) được thực hiện theo Kabat (Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3).

Thuật ngữ "vector", như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng truyền một axit nucleic khác mà nó liên kết với. Thuật ngữ bao gồm vector ở dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được kết hợp vào bộ gen của tế bào vật chủ mà nó được đưa vào. Một số vector có khả năng định hướng sự biểu hiện của axit nucleic mà chúng liên kết điều khiển được với. Các vector này được đề cập đến trong bản mô tả là "vector biểu hiện".

Thuật ngữ "hàng rào máu-não" (BBB) chỉ hàng rào sinh lý giữa hệ tuần hoàn ngoại biên và não và tủy sống mà được tạo ra bởi các liên kết khít bên trong màng huyết tương nội mô mao mạch não, tạo ra hàng rào khít giới hạn sự vận chuyển các phân tử

vào não, thậm chí các phân tử rất nhỏ như ure (60 Dalton). BBB bên trong não, hàng rào máu-tủy sống bên trong tủy sống, và hàng rào máu-võng mạc bên trong võng mạc là các hàng rào mao dẫn liền kề trong CNS, và được đề cập chung trong bản mô tả là hàng rào máu-não hoặc BBB. BBB còn bao gồm hàng rào máu-CSF (dây đám rối màng mạch) trong đó hàng rào này gồm có các tế bào màng não thay thế vì các tế bào nội mô mao dẫn.

Thuật ngữ "hệ thần kinh trung ương" (CNS) chỉ phức hợp của mô thần kinh kiểm soát chức năng cơ thể, và bao gồm não và tủy sống.

Thuật ngữ "thụ thể hàng rào máu não" (BBBR) chỉ protein của thụ thể liên kết với màng ngoại bào được biểu hiện trên tế bào nội mô não mà có khả năng vận chuyển các phân tử qua BBB hoặc được sử dụng để vận chuyển các phân tử được sử dụng ngoại sinh. Các ví dụ về BBBR bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thụ thể transferrin (TfR), thụ thể insulin, thụ thể yếu tố sinh trưởng giống insulin (IGF-R), thụ thể lipoprotein mật độ thấp, bao gồm nhưng không giới hạn ở, protein 1 liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp (LRP1) và protein 8 liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp (LRP8), và yếu tố sinh trưởng giống yếu tố sinh trưởng biểu bì gắn kết heparin (HB-EGF). BBBR lấy làm ví dụ là thụ thể transferrin (TfR).

Thuật ngữ "phân tử tác động đến não" chỉ phân tử cần được vận chuyển đến não qua BBB. Phân tử tác động thường có hoạt tính trị liệu đặc trưng được mong muốn là được phân bố đến não. Các phân tử tác động bao gồm các dược chất rối loạn thần kinh và tác nhân gây độc tế bào như ví dụ polypeptit và kháng thể, đặc biệt là kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh của nó được định hướng đến đích là não.

Thuật ngữ "phân tử gắn kết hóa trị một" chỉ phân tử có thể gắn kết đặc hiệu và theo kiểu gắn kết hóa trị một với BBBR. Mô-đun vận chuyển máu não và/hoặc thể liên hợp như được báo cáo trong bản mô tả được đặc trưng bởi sự có mặt của đơn vị duy nhất của phân tử gắn kết hóa trị một tức là mô-đun vận chuyển máu não và/hoặc thể liên hợp theo sáng chế bao gồm chính xác một đơn vị của phân tử gắn kết hóa trị một. Phân tử gắn kết hóa trị một bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polypeptit, kháng thể có độ dài đầy đủ, mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, Fab', Fv, phân tử kháng thể chuỗi đơn như ví dụ Fab chuỗi đơn, scFv. Phân tử gắn kết hóa trị một có thể là, ví dụ, protein khung được xử lý kỹ thuật bằng cách sử dụng các công nghệ trong tình trạng kỹ thuật như biểu

hiện thực khuẩn thể hoặc gây miễn dịch. Phần tử gắn kết hóa trị một cũng có thể là polypeptit. Theo một số phương án, phần tử gắn kết hóa trị một bao gồm miền Ig của CH2-CH3 và Fab chuỗi đơn (scFab) được định hướng đến thụ thể hàng rào máu não. scFab được ghép cặp với đầu tận C của miền Ig của CH2-CH3 bằng tác nhân liên kết. Theo một số phương án, scFab được định hướng đến thụ thể transferrin.

Thuật ngữ "kiểu gắn kết hóa trị một" chỉ sự gắn kết đặc hiệu với BBBR nơi mà tương tác giữa phần tử gắn kết hóa trị một và BBBR diễn ra thông qua một epitop đơn lẻ. Kiểu gắn kết hóa trị một ngăn chặn sự dime hóa/multimer hóa bất kỳ của BBBR do điểm tương tác epitop đơn lẻ. Kiểu gắn kết hóa trị một ngăn chặn việc phân loại nội bào của BBBR được làm thay đổi.

Thuật ngữ "epitop" chỉ thể quyết định polypeptit bất kỳ có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng thể. Theo một số phương án, thể quyết định epitop bao gồm nhóm bề mặt hoạt hóa hóa học gồm các phân tử như axit amin, chuỗi bên đường, phosphoryl, hoặc sulfonyl, và, theo một số phương án, có thể có đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu, hoặc đặc tính tích điện đặc hiệu. Epitop là vùng của kháng nguyên được gắn kết bởi kháng thể.

"Thụ thể transferrin" (TfR) là glycoprotein xuyên màng (có phân tử lượng là khoảng 180000 Da) gồm có hai cấu trúc siêu phân tử liên kết bằng disulfua (mỗi phân tử lượng biểu kiến là khoảng 90000 Da) và liên quan đến sự hấp thu sắt ở động vật có xương sống. Theo một phương án, TfR trong bản mô tả là TfR ở người bao gồm trình tự axit amin như được báo cáo trong Schneider et al. (Nature 311 (1984) 675 - 678).

Thuật ngữ "chất tạo ảnh" chỉ hợp chất có một hoặc nhiều tính chất cho phép sự có mặt và/hoặc vị trí của nó được phát hiện trực tiếp hoặc gián tiếp. Các ví dụ về chất tạo ảnh này bao gồm protein và hợp chất phân tử nhỏ kết hợp phân tử được đánh dấu mà cho phép phát hiện.

Thuật ngữ "kháng nguyên CNS" và "đích não" chỉ kháng nguyên và/hoặc phân tử được biểu hiện trong CNS, bao gồm não, mà có thể được hướng đích bằng kháng thể hoặc phân tử nhỏ. Các ví dụ về kháng nguyên và/hoặc phân tử này bao gồm, nhưng không giới hạn: beta-secretase 1 (BACE1), beta dạng tinh bột (Abeta), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô người 2 (HER2), Tau, apolipoprotein E4 (ApoE4), alpha-synuclein, CD20, huntingtin, prion protein (PrP),

kinaza lắp giàu leuxin 2 (LRRK2), parkin, presenilin 1, presenilin 2, gama secretaza, thụ thể chết 6 (DR6), protein tiền chất dạng tinh bột (APP), thụ thể p75 neurotrophin (p75NTR), glucocerebrosidaza và caspaza 6.

Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" chỉ kháng thể gắn kết với kháng nguyên theo cách chọn lọc và ưu tiên. Ái lực gắn kết thường được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm tiêu chuẩn, như phân tích Scatchard, hoặc kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt (ví dụ, sử dụng BIAcore®).

Thuật ngữ "phần tử Ig của CH2-CH3" như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ phần tử protein có nguồn gốc từ miền CH2 hoặc CH3 của globulin miễn dịch. "Phần tử Ig của CH2-CH3" bao gồm hai polypeptit "CH2-CH3" tạo ra dime. Globulin miễn dịch có thể là IgG, IgA, IgD, IgE hoặc IgM. Theo một phương án, phần tử Ig của CH2-CH3 có nguồn gốc từ globulin miễn dịch IgG và được đề cập đến trong bản mô tả là "phần tử IgG của CH2-CH3". Thuật ngữ này bao gồm trình tự tự nhiên của miền CH2-CH3 và miền CH2-CH3 biến thể. Theo một phương án, "phần tử Ig của CH2-CH3" có nguồn gốc từ miền IgG của CH2-CH3 của chuỗi nặng 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 có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trừ khi được nêu khác đi trong bản mô tả, việc đánh số gốc axit amin trong vùng miền CH2-CH3 hoặc vùng hằng định CH2-CH3 là theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như 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.

"Thể liên hợp" là protein dung hợp theo sáng chế được liên hợp với một hoặc nhiều (các) phân tử khác loại, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đánh dấu, thuốc rối loạn thần kinh hoặc tác nhân gây độc tế bào.

Thuật ngữ "tác nhân liên kết" chỉ tác nhân liên kết hóa học hoặc tác nhân liên kết peptit chuỗi đơn mà liên kết cộng hóa trị các phân tử khác nhau của mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não và/hoặc polypeptit dung hợp và/hoặc thể liên hợp như được báo cáo trong bản mô tả. Tác nhân liên kết liên kết, ví dụ, phân tử tác động đến não với phân tử gắn kết hóa trị một. Ví dụ, nếu phân tử gắn kết hóa trị một bao gồm phần tử Ig của CH2-CH3 và scFab được định hướng đến thụ thể hàng rào máu não, sau đó tác nhân liên kết liên hợp scFab với đầu tận C của phần tử Ig của CH3-CH2. Tác nhân liên kết liên hợp

phần tử tác động đến não với phần tử gắn kết hóa trị một (tác nhân liên kết tứ nhất) và tác nhân liên kết liên kết scFab với đầu tận C của miền Ig của CH₂-CH₃ (tác nhân liên kết thứ hai) có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Tác nhân liên kết peptit chuỗi đơn, bao gồm từ một đến hai mươi gốc axit amin được nối bằng liên kết peptit, có thể được sử dụng. Theo một số phương án, các axit amin được chọn từ hai mươi axit amin có trong tự nhiên. Theo một số phương án khác, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ glyxin, alanin, prolin, asparagin, glutamin và lysin. Theo các phương án khác, tác nhân liên kết là tác nhân liên kết hóa học. Theo một số phương án, tác nhân liên kết là tác nhân liên kết peptit chuỗi đơn có trình tự axit amin có độ dài là ít nhất 25 gốc axit amin, theo một phương án được ưu tiên, có độ dài nằm trong khoảng từ 32 đến 50 gốc axit amin. Theo một phương án, tác nhân liên kết peptit là tác nhân liên kết (GxS)_n với G = glyxin, S = serin, (x=3, n=8, 9 hoặc 10) hoặc (x = 4 và n= 6, 7 hoặc 8), theo một phương án, với x =4, n=6 hoặc 7, theo một phương án được ưu tiên, với x=4, n=7. Theo một phương án, tác nhân liên kết là (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 95). Theo một phương án, tác nhân liên kết là (G₄S)₆G₂ (SEQ ID NO: 96).

Việc liên hợp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các tác nhân liên kết hóa học khác nhau. Ví dụ, phần tử gắn kết hóa trị một hoặc polypeptit dung hợp và phần tử tác động đến não có thể được liên hợp bằng cách sử dụng các chất ghép cặp protein hai chức khác nhau như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este hoạt tính (như disuccinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl)hexandiamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Tác nhân liên kết có thể là "tác nhân liên kết phân tách được" tạo điều kiện cho việc giải phóng phần tử tác động khi phân bố vào não. Ví dụ, tác nhân liên kết không bền axit, tác nhân liên kết nhạy peptidaza, tác nhân liên kết không bền quang học, tác nhân liên kết dimetyl hoặc tác nhân liên kết chứa disulfua (Chari et al, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5,208,020) có thể được sử dụng.

Việc liên hợp cộng hóa trị có thể là trực tiếp hoặc thông qua tác nhân liên kết. Theo một số phương án, việc liên hợp trực tiếp là bằng cách xây dựng quá trình dung

hợp polypeptit (tức là bằng cách dung hợp di truyền hai gen mã hóa phần tử gắn kết hóa trị một hướng đến BBBR và phần tử tác động và được biểu hiện dưới dạng polypeptit đơn (chuỗi)). Theo một số phương án, việc liên hợp trực tiếp là bằng cách tạo ra liên kết cộng hóa trị giữa nhóm phản ứng trên một trong hai phần của phần tử gắn kết hóa trị một ngược với BBBR và nhóm tương ứng hoặc thụ thể trên phần tử tác động đến não. Theo một số phương án, việc liên hợp trực tiếp là bằng cách cải biến (tức là cải biến di truyền) một trong hai phần tử cần được liên hợp bao gồm nhóm phản ứng (là ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, nhóm sulfhydryl hoặc nhóm carboxyl) mà tạo ra sự gắn cộng hóa trị với phần tử còn lại cần được liên hợp trong các điều kiện thích hợp. Là ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, phần tử (tức là axit amin) với nhóm phản ứng mong muốn (tức là gốc cystein) có thể được đưa vào, ví dụ, phần tử gắn kết hóa trị một hướng đến kháng thể của BBBR và liên kết disulfua được tạo ra với được chất thần kinh. Phương pháp để liên hợp cộng hóa trị các axit nucleic với protein cũng được biết trong lĩnh vực này (tức là, liên kết chéo quang học, xem, ví dụ, Zatsepin et al. Russ. Chem. Rev. 74 (2005) 77-95). Việc liên hợp cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các tác nhân liên kết khác nhau. Ví dụ, phần tử gắn kết hóa trị một và phần tử tác động có thể được liên hợp bằng cách sử dụng các chất ghép cặp protein hai chức khác nhau như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimethyl adipimidat HC1), este hoạt tính (như disuccinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl)hexandiamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Tác nhân liên kết peptit, bao gồm từ một đến hai mươi gốc axit amin được nối bằng liên kết peptit, cũng có thể được sử dụng. Theo một số phương án như vậy, các gốc axit amin được chọn từ hai mươi axit amin có trong tự nhiên. Theo một số phương án khác như vậy, một hoặc nhiều gốc axit amin được chọn từ glyxin, alanin, prolin, asparagin, glutamin và lysin. Tác nhân liên kết có thể là "tác nhân liên kết phân tách được" tạo điều kiện cho việc giải phóng phần tử tác động khi phân bố vào não. Ví dụ, tác nhân liên kết không bền axit, tác nhân liên kết nhạy peptidaza, tác nhân liên kết không bền quang học, tác nhân liên kết dimethyl hoặc tác

nhân liên kết chứa disulfua (Chari et al, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5,208,020) có thể được sử dụng.

II. Chế phẩm và phương pháp

Hằng số phân ly cân bằng (K_D) thường được sử dụng để mô tả tương tác phân tử. Nó được sử dụng làm số đo độ bền tương tác giữa hai phân tử (ví dụ, ái lực) với nhau. Vì vậy, giá trị K_D là số đo độ bền của tương tác giữa hai phân tử.

Tuy nhiên, giá trị K_D như vậy không mô tả động học của tương tác phân tử, tức là từ giá trị K_D này, một mặt không thể suy ra việc hai phân tử gắn kết với nhau nhanh như thế nào (hằng số tốc độ kết hợp hoặc “tốc độ kết hợp”) và mặt khác không thể suy ra các phân tử phân ly nhanh như thế nào (hằng số tốc độ phân ly hoặc “tốc độ phân ly”). Việc đặc trưng tương tác giữa hai phân tử chỉ bằng giá trị K_D bỏ quên thực tế là giá trị K_D có thể được tạo thành bằng tốc độ kết hợp và tốc độ phân ly cực kỳ khác nhau (khác thứ tự biên độ) giống hệt như giá trị K_D nêu trên là tỷ lệ của nó.

Tuy nhiên, tốc độ kết hợp và tốc độ phân ly là quan trọng để đặc trưng cách gắn kết của phân tử. Tốc độ phân ly là đặc biệt quan trọng vì nó đặc trưng cho thời gian gắn kết của, ví dụ, kháng thể với kháng nguyên của nó. Tốc độ phân ly dài tương quan với sự phân ly chậm của phức hợp được tạo ra trong khi đó tốc độ phân ly ngắn tương quan với sự phân ly nhanh.

Để có được tương tác lâu dài (tức là đòi hỏi việc định liều ít thường xuyên hơn) hoặc tương tác hoàn toàn thích hợp (ví dụ, phụ thuộc vào điều kiện xung quanh) thì tốc độ phân ly phải được xác định theo phương pháp thí nghiệm. Điều này thậm chí còn quan trọng hơn do gần như là không thể dự báo tốc độ phân ly. Ngoài ra sự tương quan giữa tốc độ phân ly và ái lực gắn kết là kém như được nêu sơ lược trên đây. Ví dụ, do thực tế là giá trị K_D là tỷ lệ của tốc độ kết hợp và tốc độ phân ly, thậm chí các chất liên kết yếu vẫn có thể gắn kết lâu với đích của chúng trong khi đó các chất liên kết chặt có thể phân ly nhanh.

Sự bế tắc điển hình trong các dự án tạo kháng thể là xếp hạng nhiều ứng viên thu được sau khi sàng lọc dựa trên độ bền gắn kết kháng thể. Lý tưởng là, phương pháp này sẽ hoạt động mà không đánh dấu trước các kháng nguyên và có các dịch tan vi khuẩn thô. Ylera, F., et al. (Anal. Biochem. 441 (2013) 208-213) báo cáo phương pháp sàng

lọc tốc độ phân ly để chọn lọc kháng thể kháng thuốc có ái lực cao của dịch tan *Escherichia coli* thô chứa mảnh Fab hóa trị một. Chúng có tốc độ phân ly được chọn làm thông số xếp hạng do giữa các yếu tố khác thì tốc độ phân ly không phụ thuộc vào nồng độ. Chúng chọn kiểu hóa trị một để tránh các tác động ái lực trong khi xếp hạng tốc độ phân ly và xác định ái lực do chúng sẽ quan sát bằng IgG đầy đủ. Ylera et al. đã phát hiện ra rằng, dòng vô tính có tốc độ phân ly koff tốt nhất được nhận biết bởi bước xếp hạng koff, nhưng không được nhận biết bằng cách chỉ sử dụng độ bền tín hiệu ELISA làm tiêu chuẩn chọn lọc.

Murray, J.B., et al. (J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850) báo cáo quá trình sàng lọc tốc độ phân ly (ORS) bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt là phương pháp hiệu quả để có được mẫu động học thành công để dẫn hướng khoảng trống hóa học khỏi các sản phẩm phản ứng chưa được tinh sạch. Được nêu sơ lược rằng hằng số tốc độ phân ly k_d (tốc độ phân ly) là thành phần của gắn kết phối tử-protein có khả năng đáng kể nhất trong việc tăng cường hoạt lực của hợp chất. Các tác giả nêu sơ lược rằng việc đo ái lực theo động học trong cả chương trình khám phá dược chất là cung cấp nhiều thông tin hơn so với việc xác định cân bằng ái lực trạng thái ổn định. Ví dụ, hợp chất có tốc độ kết hợp và tốc độ phân ly chậm hơn 10 lần sẽ được nhận ra là khác nhau nếu được đánh giá bằng các số đo cân bằng của ái lực. Ngoài ra các tác giả đã phát hiện ra rằng, dữ liệu được xác định bằng công cụ BIAcore T200 cho thấy độ chênh lệch trung bình ở các giá trị k_d giữa mẫu thô và mẫu tinh khiết là bằng 19%, tương tự, dữ liệu được xác định bằng công cụ BIAcore T100 cũ hơn có độ chênh lệch là 15%. Các tác giả quan sát thấy rằng các giá trị k_d thay đổi trung bình chỉ 30% khi so sánh công cụ đi qua và thời gian đi qua. Điều này chứng minh rằng sự nhiễm bẩn ngay từ đầu, thời gian bảo quản lâu dài, và thiết bị khác nhau có tác dụng vừa phải đến các k_d quan sát được. Thực vậy, các chênh lệch nhỏ ở giá trị k_d này phản ánh chặt chẽ độ chênh lệch quan sát được trong các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm đa chính xác mà độ biến đổi quan sát được được báo cáo là nằm trong khoảng từ 14% đến 40% phụ thuộc vào hệ đó (Murray, J.B., et al., J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850; Katsamba, P.S., et al., Anal. Biochem. 352 (2006) 208-221).

Trong WO 2014/189973, kháng thể của thụ thể kháng transferrin và các phương pháp sử dụng được báo cáo. Cũng được báo cáo là việc hướng đích thụ thể BBB với thụ

thể ái lực cao đặc hiệu truyền thống thường dẫn đến sự gia tăng có hạn mức độ vận chuyển BBB. Sau đó phát hiện ra rằng biên độ hấp thụ kháng thể vào và phân bố trong CNS liên quan nghịch đảo với ái lực gắn kết của nó đối với thụ thể BBB trong số các kháng thể kháng BBB được nghiên cứu. Ví dụ, kháng thể ái lực thấp đối với thụ thể transferrin (TfR) được định liều ở mức liều lượng trị liệu làm cải thiện đáng kể mức độ vận chuyển BBB và giữ được CNS của kháng thể kháng TfR so với kháng thể kháng TfR ái lực cao hơn, và khiến cho có thể đạt được nồng độ trị liệu trong CNS một cách dễ dàng hơn (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra43). Bằng chứng về mức độ vận chuyển BBB như vậy đạt được bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu kép gắn kết cả TfR và enzym phân tách protein tiền chất dạng tinh bột, β -secretaza (BACE1). Liều toàn thân đơn lẻ của kháng thể đặc hiệu kép kháng TfR/BACE1 được xử lý kỹ thuật bằng cách sử dụng kháng thể ái lực thấp không những dẫn đến sự hấp thụ kháng thể đáng kể trong não, mà còn làm giảm mạnh nồng độ A β 1-40 trong não so với một mình kháng thể kháng BACE1 đơn đặc hiệu một mình, đề xuất rằng sự thâm thấu vào BBB ảnh hưởng đến hoạt lực của kháng thể kháng BACE1 (Atwal et al., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra43; Yu et al., *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 84ra44).

Dữ liệu và thí nghiệm có sẵn nêu bật một vài cơ chế nguyên nhân đằng sau sự hấp thụ gia tăng của kháng thể vào CNS bằng cách sử dụng phương pháp kháng thể ái lực thấp hơn.

Thứ nhất, kháng thể của thụ thể kháng BBB (BBB-R) ái lực cao (ví dụ, kháng thể kháng TfR từ Atwal et al. và Yu et al., nêu trên) hạn chế sự hấp thụ vào não bằng cách bão hòa nhanh BBB-R trong hệ mạch não, do đó làm giảm tổng lượng kháng thể được hấp thụ vào não và cũng giới hạn sự phân bố của nó vào hệ mạch. Đặc biệt, việc làm giảm ái lực đối với BBB-R làm cải thiện sự hấp thụ và phân bố vào não, với chuyển đổi mạnh được quan sát trong quá trình định vị từ hệ mạch đến neuron thần kinh và mạng thần kinh liên quan được phân bố trong CNS. Đã phát hiện ra rằng ái lực phải thấp hơn cận trên nhất định và cao hơn cận dưới nhất định.

Thứ hai, ái lực thấp hơn của kháng thể đối với BBB-R được đề xuất để làm suy yếu khả năng của kháng thể trong việc trở lại phía mạch của BBB thông qua BBB-R từ phía CNS của màng do ái lực tổng thể của kháng thể đối với BBB-R là thấp và nồng độ

cục bộ của kháng thể ở phía CNS của BBB là không bảo hòa do sự phân tán nhanh kháng thể vào khoang CNS.

Thứ ba, *in vivo*, và như được quan sát đối với hệ TfR, các kháng thể có ái lực thấp hơn đối với BBB-R không được thanh thải khỏi hệ hiệu quả như các kháng thể có ái lực cao hơn đối với BBB-R, và do đó vẫn còn ở nồng độ tuần hoàn cao hơn so với phần đối xứng có ái lực cao hơn của chúng. Đây là ưu điểm do nồng độ kháng thể tuần hoàn vừa kháng thể ái lực thấp hơn được duy trì ở nồng độ trị liệu trong khoảng thời gian lâu hơn so với kháng thể ái lực cao hơn, vì vậy cải thiện mức hấp thụ kháng thể trong não trong khoảng thời gian lâu hơn. Ngoài ra, sự cải thiện này ở cả việc tiếp xúc huyết tương và não có thể làm giảm tần suất định liều trong lâm sàng, mà có lợi ích tiềm năng không những cho việc tuân thủ và thuận tiện của bệnh nhân mà còn làm giảm tác dụng phụ tiềm ẩn hoặc tác dụng sai đích bất kỳ của kháng thể và/hoặc của hợp chất trị liệu được kết hợp vào đó.

Các nghiên cứu từ trước này sử dụng kháng thể chuột nhất mà gắn kết đặc hiệu với TfR chuột nhất, nhưng không nhận diện đặc hiệu TfR động vật linh trưởng hoặc TfR ở người. Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể và các phân chức năng của nó nhận diện đặc hiệu cả TfR động vật linh trưởng, đặc biệt là TfR khi đầu chó, và TfR ở người, để tạo điều kiện cho các nghiên cứu an toàn và hiệu quả ở động vật linh trưởng với kháng thể trước khi sử dụng để trị liệu hoặc chẩn đoán ở người.

Đánh giá độ an toàn phi lâm sàng kỹ lưỡng của kháng thể đơn dòng (mAb) được dự định cho ứng dụng trị liệu là rất quan trọng do độ phức tạp tăng lên theo khía cạnh xử lý kỹ thuật kháng thể và độ biến đổi giảm đi do tính đa dạng của hệ tế bào sản sinh tái tổ hợp để tạo ra kháng thể. Ngoài ra, cấu trúc phức tạp của chúng, chức năng sinh học độc nhất và thời gian bán hủy lâu hơn của mAb so với thuốc phân tử nhỏ truyền thống bổ sung vào các cân nhắc an toàn ngoài môi quan tâm do sử dụng lâm sàng kéo dài mAb để điều trị các bệnh mạn tính (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., et al., Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

Mục đích tổng quát của các nghiên cứu phi lâm sàng đối với mAb là để xác định các tính chất độc tính của mAb đang quan tâm và cung cấp thông tin về sự phát triển sản phẩm. Các mục tiêu chính của đánh giá phi lâm sàng là (1) nhận biết các cơ quan đích đối với độ độc và xác định xem độ độc có thay đổi ngược lại sau điều trị hay không,

(2) nhận biết liều ban đầu an toàn cho thử nghiệm lâm sàng pha I ở người và kế hoạch gia tăng liều tiếp đó, (3) cung cấp thông tin để theo dõi các thông số an toàn trong thử nghiệm lâm sàng và (4) cung cấp số liệu về độ an toàn để hỗ trợ bảo hộ trên nhãn sản phẩm. Để đạt được các mục tiêu này, cả nghiên cứu phi lâm sàng *in vitro* và *in vivo* nhằm xác định và hiểu các tính chất dược lý của kháng thể được tiến hành (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Để đánh giá độ an toàn phi lâm sàng của mAb thành công, loài động vật thích hợp nhất nên được lựa chọn để thử nghiệm độ độc (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Loài thích hợp là loài trong đó kháng thể có hoạt tính dược lý, kháng nguyên đích nên có mặt hoặc được biểu hiện và profin phản ứng chéo trong mô nên tương tự với người (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. and Mertsching, E., trong tài liệu: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., et al., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa miễn dịch hoặc thử nghiệm chức năng, loài động vật thích hợp biểu hiện epitop mong muốn và chứng minh profin phản ứng chéo trong mô tương tự với mô người có thể được nhận biết (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Các nghiên cứu phản ứng chéo trong loài, hữu ích trong quy trình này, bao gồm nghiên cứu hóa mô miễn dịch của các mô từ các loài khác nhau bằng cách sử dụng vi dây mô từ nhiều loài có bán trên thị trường (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., et al., trong tài liệu: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Theo một cách khác, việc đánh giá sự gắn kết kháng thể với tế bào từ các động vật này bằng cách phân loại tế bào được hoạt hóa dòng (FACS) thường là nhạy hơn so với phân tích hóa mô miễn dịch của các phần mô (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., trong tài liệu: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken,

NJ: Wiley 2008; 181-205). Trình tự ADN và trình tự axit amin của kháng nguyên đích nên được so sánh giữa các loài; tính tương đồng giữa các loài nên được xác định (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. and Mertsching, E., trong tài liệu: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Ngoài ra, sự phân bố sinh học, chức năng và cấu trúc của kháng nguyên nên là tương đương giữa loài động vật thích hợp và người để cho phép đánh giá độ độc phát sinh do sự gắn kết kháng thể của kháng nguyên đích, được đề cập đến là độ độc mục tiêu (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Ngoài ra, tính tương tự mạnh về sự phân bố trong mô kháng nguyên đích ở loài động vật này và người khiến cho có khả năng hơn trong việc cơ quan đích có độ độc được nhận biết ở động vật sẽ dự báo độ độc tiềm ẩn ở người. Việc thiếu tính tương tự về phân bố trong mô kháng nguyên giữa loài động vật và người không loại trừ hoàn toàn việc sử dụng loài động vật cho các nghiên cứu độ độc, nhưng các chênh lệch này phải được đưa ra cân nhắc để đánh giá nguy cơ ở người. Như đối với mật độ hoặc ái lực kháng nguyên, độ tương đương tuyệt đối giữa mô hình động vật và người không được yêu cầu tương tự. Việc chứng minh về độ thích hợp của loài được chọn để thử nghiệm độ độc nên được bao gồm khi đưa ra xem xét quản lý. Nếu chỉ có một loài được sử dụng để đánh giá độ an toàn, tóm tắt về các thí nghiệm chứng minh sự vắng mặt của loài thích hợp bổ sung được cho phép (Lynch, C.M., et al., mAbs 1 (2009) 2-11).

Nếu kháng thể đơn dòng được dự định để sử dụng để điều trị bệnh không có tính phản ứng chéo trong loài, kháng thể thay thế phải được sử dụng hoặc một loài khác cho mô hình này. Vì vậy, kháng thể thay thế là giải pháp tiềm năng cho thử nghiệm về độ an toàn hạn chế có thể có với kháng thể đơn dòng được làm giống như của người có tính phản ứng chéo trong loài bị hạn chế. Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có tiêu chí được xác định trong đó kháng thể thay thế tiềm năng nên được đánh giá trước khi sử dụng nó để xác định vấn đề an toàn cho tác nhân lâm sàng (Regulatory Toxicology and Pharmacology Volume 40, Issue 3, December 2004, Pages 219–226).

Vì vậy, để nhận biết mô hình động vật cho mAb cụ thể, các cân nhắc trên đây phải được thực hiện. Nhưng tuy nhiên cần thiết là mAb đang quan tâm có tính phản ứng chéo với kháng nguyên đích của loài thử nghiệm. Nếu không thì thậm chí là loài thử

nghiệm thích hợp nhất không thể được sử dụng. Do đó, có nhu cầu đối với mAb không có tính phản ứng chéo trong loài nhưng có tính phản ứng chéo giữa các loài đối với đích của nó ở người và loài được dự định để thử nghiệm phi lâm sàng.

A. Kháng thể kháng transferrin lấy làm ví dụ

Được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin có tốc độ phân ly để gắn kết với thụ thể transferrin ở người mà nằm trong khoảng nhất định để đảm bảo vận chuyển BBB chính xác. Đã phát hiện ra rằng, khoảng này được xác định ở một đầu bằng tốc độ phân ly của kháng thể của thụ thể kháng transferrin chuột nhất 128,1 (miền biến đổi trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 64 và 65) được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt đối với thụ thể transferrin ở khi đầu chỏ và ở đầu còn lại bằng 5% của tốc độ phân ly này (tức là phân ly thấp hơn 20 lần). Theo một phương án, tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người là nằm trong khoảng và bao gồm từ 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây.

Kháng thể được làm giống như của người của dòng vô tính 299 như được báo cáo trong bản mô tả không có sẵn bằng cách áp dụng các kỹ thuật nhân hóa tiêu chuẩn. Được yêu cầu là đưa các đột biến không tiêu chuẩn vào trong trình tự axit amin để thụ thể kháng thể được làm giống như của người với tốc độ phân ly gắn kết thụ thể transferrin nằm trong khoảng được dự định và bao gồm từ 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây. Điều này đặc biệt quan trọng do kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả được nghiên cứu phát triển để đi qua hàng rào máu-não người để vận chuyển lượng tải nạp trị liệu vào não.

Đã phát hiện ra rằng để thu được kháng thể được làm giống như của người thích hợp và phát triển được, hai gốc axit amin cysteine trong chuỗi nhẹ của kháng thể thổ ban đầu phải được thay thế bằng gốc axit amin prolin và gốc axit amin asparagin, một cách tương ứng. Ngoài việc nằm trong khoảng tốc độ phân ly cho trước, gốc serin có mặt ở giữa CDRL3 thổ phải được thay thế bằng gốc alanin.

Cũng phát hiện thêm được rằng, có lợi khi thay đổi ba gốc axit amin trong chuỗi nặng ở vị trí 65, 100g và 105 (đánh số theo Kabat).

Tất cả đánh số như được sử dụng trong bản mô tả là dựa trên sơ đồ đánh số miền biến đổi Kabat.

Dòng vô tính kháng thể kháng transferrin 299 thể hiện các tính chất tương đương với các tính chất của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1. Điều này có thể được thấy trong Bảng sau.

Gốc	nạp chuyển bào[pg]	% chuyển bào đáy bên	Tổng ở đáy bên [pg]	Tổng ở đỉnh [pg]	tổng được vận chuyển [pg]
mAb 128,1	2226	34	757	1229	1986
dòng vô tính-299	2773	36	998	1346	2344
gốc	% nạp mAb 128,1	Tổng % ở đáy bên của mAb 128,1	Tổng % ở đỉnh của mAb 128,1	tổng % được vận chuyển của mAb 128,1	EC50 [ng/mL] FACS hTfR-CHO
mAb 128,1	100	100	100	100	96
dòng vô tính-299	125	132	110	118	275
gốc	hTfR-CHO geo. trung bình lớn nhất	EC50 [ng/mL] FACS cyTfR	Cyno TfR-CHO geo. trung bình lớn nhất	Tỷ lệ EC50 Cyno/người	Tỷ lệ lớn nhất Cyno/người
mAb 128,1	78200	314	52100	3,3	0,6
dòng vô tính-299	55600	241	52000	0,9	1,0
gốc	Tốc độ phân ly theo BIAcore huTfR [1/giây]	BIAcore t1/2 huTfR [phút]	Tốc độ phân ly theo BIAcorecy TfR [1/giây]	BIAcore t1/2 Cyno TfR [phút]	Tỷ lệ t1/2 người/Cyno
mAb 128,1	6,06E-04	19	5,47E-02	0,2	90,2
dòng vô tính-299	6,16E-04	19	2,77E-04	42	0,4

Trong Bảng sau, tốc độ phân ly của biến thể nhân hóa của miền biến đổi chuỗi nhẹ ở thỏ của dòng vô tính 299 kết hợp với biến thể nhân hóa của miền biến đổi chuỗi nặng ở thỏ của dòng vô tính 299 được thể hiện. Phần tử gắn kết kèm theo là thụ thể transferrin ở người (được xác định ở nhiệt độ 25°C).

VH → VL↓	0 (rb)	1	2	5	6	7	8	9	11	12
0 (rb)	4,34 E-04	9,08 E-04	8,06 E-04	7,72 E-04	6,63 E-04	5,15 E-04	4,06 E-04	9,01 E-04	9,05 E-04	9,21E -04
1	5,69 E-03	1,00 E-03	1,00 E-03	1,00 E-03	1,00 E-03	7,52 E-03	3,19 E-03	6,94 E-03	1,00 E-03	1,00E -03
2	1,25 E-03	2,86 E-03	2,75 E-03	2,41 E-03	1,87 E-03	1,31 E-03	1,01 E-03	3,99 E-03	3,85 E-03	6,35E -03
3	1,32 E-03	4,31 E-03	3,84 E-03	3,16 E-03	2,82 E-03	1,45 E-03	1,00 E-03	4,17 E-03	5,65 E-03	5,86E -03
4	1,36 E-03	2,56 E-03	2,63 E-03	2,38 E-03	1,87 E-03	1,25 E-03	7,88 E-04	2,70 E-03	3,88 E-03	3,11E -03
5	1,94 E-03	2,71 E-03	2,62 E-03	2,53 E-03	1,66 E-03	1,35 E-03	1,07 E-03	3,50 E-03	4,56 E-03	5,82E -03
6	1,90 E-03	5,38 E-03	5,55 E-03	4,64 E-03	3,06 E-03	1,97 E-03	1,40 E-03	6,83 E-03	6,71 E-03	7,05E -03
7	4,63 E-03	7,33 E-03	7,50 E-03	6,97 E-03	5,63 E-03	3,66 E-03	2,31 E-03	7,61 E-03	7,81 E-03	7,71E -03
8	1,39 E-03	4,85 E-03	3,94 E-03	3,78 E-03	3,01 E-03	1,72 E-03	1,16 E-03	5,23 E-03	5,52 E-03	5,31E -03
9- NY A	1,41 E-03	2,46 E-03	2,21 E-03	2,03 E-03	1,41 E-03	1,21 E-03	1,01 E-03	2,52 E-03	2,42 E-03	2,19E -03
10	1,88 E-03	6,77 E-03	6,49 E-03	6,53 E-03	4,55 E-03	2,64 E-03	1,73 E-03	7,19 E-03	7,16 E-03	7,79E -03
12	5,41 E-03	7,05 E-03	8,14 E-03	1,00 E-03	7,78 E-03	7,75 E-03	6,72 E-03	1,00 E-03	7,87 E-03	1,00E -03
14	1,78 E-03	2,99 E-03	2,44 E-03	2,33 E-03	2,20 E-03	1,53 E-03	1,04 E-03	3,32 E-03	3,51 E-03	5,46E -03
15	6,63 E-03	6,69 E-03	6,38 E-03	6,37 E-03	4,21 E-03	2,73 E-03	1,81 E-03	7,39 E-03	7,09 E-03	7,76E -03
17	1,49 E-03	7,56 E-03	7,12 E-03	7,45 E-03	7,17 E-03	1,87 E-03	1,12 E-03	4,25 E-03	7,55 E-03	7,27E -03
VH → VL↓	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23- DAN G

0 (rb)	4,82 E-04	7,63E- 04	6,53E- 04	4,13E -04	1,09E -03	1,00E -03	1,11E -03	5,65E -04	5,06E -04	3,38E -04
1	1,00 E-03	7,72E- 03	7,71E- 03	4,33E -03	1,00E -03	1,00E -03	1,00E -03	7,71E -03	5,78E -03	2,80E -03
2	2,46 E-03	2,16E- 03	1,97E- 03	1,05E -03	4,89E -03	7,69E -03	5,25E -03	1,38E -03	1,26E -03	7,15E -04
3	2,77 E-03	2,07E- 03	1,73E- 03	8,43E -04	6,65E -03	1,00E -03	7,15E -03	1,94E -03	1,43E -03	7,83E -04
4	1,30 E-03	1,34E- 03	1,27E- 03	7,23E -04	3,35E -03	1,00E -03	4,36E -03	1,46E -03	1,18E -03	7,61E -04
5	2,18 E-03	2,14E- 03	2,23E- 03	1,23E -03	3,49E -03	1,00E -03	3,52E -03	1,37E -03	1,41E -03	8,80E -04
6	3,65 E-03	3,50E- 03	3,39E- 03	1,71E -03	6,74E -03	1,00E -03	6,06E -03	2,07E -03	2,14E -03	1,16E -03
7	6,68 E-03	5,43E- 03	5,25E- 03	2,33E -03	7,66E -03	1,00E -03	7,14E -03	2,38E -03	3,37E -03	1,55E -03
8	2,47 E-03	2,09E- 03	1,97E- 03	1,11E -03	6,77E -03	6,71E -03	6,58E -03	1,74E -03	1,65E -03	9,41E -04
9- NY A	1,39 E-03	1,42E- 03	1,36E- 03	9,34E -04	2,21E -03	6,17E -03	1,89E -03	1,13E -03	1,26E -03	7,69E -04
10	5,89 E-03	3,99E- 03	4,24E- 03	1,88E -03	7,46E -03	1,00E -03	7,05E -03	2,11E -03	2,09E -03	1,20E -03
12	7,85 E-03	7,64E- 03	7,54E- 03	2,84E -03	1,00E -03	1,00E -03	1,00E -03	7,54E -03	6,44E -03	1,87E -03
14	2,22 E-03	1,94E- 03	1,75E- 03	1,05E -03	3,00E -03	7,96E -03	2,39E -03	1,03E -03	1,12E -03	7,33E -04
15	7,11 E-03	6,03E- 03	4,77E- 03	1,56E -03	7,58E -03	1,00E -03	7,85E -03	1,92E -03	1,79E -03	9,86E -04
17	3,39 E-03	1,69E- 03	1,66E- 03	9,88E -04	5,30E -03	1,00E -03	4,57E -03	9,97E -04	9,38E -04	6,94E -04

Tổ hợp của VH23 với VL9 được chọn làm điểm bắt đầu để xử lý kỹ thuật hơn nữa để phát triển vị trí gắn kết mà phản ánh các tính chất gắn kết của kháng thể 128,1 với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó so với việc gắn kết với thụ thể transferrin ở người là mật thiết hơn.

Trong Bảng sau, tốc độ phân ly của các biến thể lấy làm ví dụ khác nhau của VH23 và VL9 cũng như các biến thể nhân hóa của miền biến đổi khác nhau khác đối với thụ thể transferrin ở người được thể hiện để so sánh (được xác định theo Ví dụ 14, 25°C).

	VK9	VK9	VK9	VK9	VH5	VK1	VK1	VK1	VK2	VK6
	-	-	-	-	67-	2-	7-	5-	-	-
	NYA	SYA	GYS	CYS	P... NYA	HYS	TYS	AYS	SYS	SYS
VH23-DANG	8,83 E-03		3,96 E-03		4,62 E-03	1,53 E-02	2,29 E-03	6,97 E-03	5,22 E-03	1,32 E-02
VH23-DASG	3,95 E-02	4,84 E-04	3,73 E-03	2,33 E-03						
VH23-DAQG	1,49 E-02	7,55 E-04	3,75 E-03	1,51 E-03						
VH9-DANG	1,82 E-03			6,52 E-03					4,02 E-02	
VH9-DAQG	1,25 E-03									
VH7-DANG										3,08 E-02

Tham khảo: 128,1 = 7,78E-02 (được xác định đối với thụ thể transferrin ở khi đầu chó).

Trong Bảng sau, dữ liệu động học của các biến thể lấy làm ví dụ khác nhau của VH23 và VL9 được thể hiện để so sánh (xác định theo Ví dụ 13).

Thử nghiệm BIAcore @ 25°C	TfR	k_d [s^{-1}]	k_a [$s^{-1}M^{-1}$]	KD [M]
mAb 128,1	Khí đầu chó	7,33E-02	5,41E+05	1,36E-07
VH23-DASG/VL09-NYA	Người	3,95E-02	8,83E+04	4,47E-07
VH23-DAQG/VL09-NYA	Người	1,37E-02	1,21E+05	1,13E-07
VH23-DANG/VL09-NYA	Người	8,83E-03	1,55E+05	5,72E-08

Trong Bảng sau, tốc độ phân ly của các biến thể nhân hóa của miền biến đổi chuỗi nhẹ ở chuột của dòng vô tính 494 kết hợp với biến thể nhân hóa của miền biến đổi chuỗi nặng ở chuột của dòng vô tính 494 được thể hiện. Phân tử gắn kết kèm theo là thụ thể transferrin ở người.

VH→ VL↓	0 (mu)	1	2	3	4
0 (mu)	1,36E-04	1,37E-04	1,56E-04	1,48E-04	1,77E-04
1	3,70E-04	4,10E-04	4,54E-04	4,76E-04	4,48E-04
2	3,64E-04	3,99E-04	4,26E-04	4,15E-04	4,38E-04
3	3,39E-04	3,86E-04	4,30E-04	4,34E-04	4,52E-04
4	5,42E-04	6,57E-04	7,03E-04	6,83E-04	7,05E-04
5	5,44E-04	6,84E-04	7,17E-04	7,17E-04	7,28E-04
6	3,81E-04	4,86E-04	5,27E-04	5,50E-04	5,52E-04
7	2,32E-04	2,74E-04	2,99E-04	3,06E-04	3,26E-04

Cụ thể hơn, theo một khía cạnh, sáng chế một phần dựa trên kết quả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin như được báo cáo trong bản mô tả có thể được sử dụng làm mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não để phân bố phân tử tác động đến não qua hàng rào máu-não vào não. Theo một số phương án, mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não là phân tử gắn kết hóa trị một gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin. Kháng thể của thụ thể kháng transferrin như được báo cáo trong bản mô tả khi được sử dụng làm mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não là hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị các rối loạn thần kinh, như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và bệnh Alzheimer và bệnh Parkinson cùng tồn tại.

Đã phát hiện ra rằng kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 phản ánh, đối với thụ thể transferrin ở người, tính chất gắn kết của kháng thể chuột 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khi đầu chó về tốc độ phân ly gắn kết.

Do đó, theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể được phân lập gắn kết với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khi đầu chó (cyTfR), trong đó kháng thể này có tốc độ phân ly được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt đối với thụ thể transferrin ở người nằm trong khoảng từ 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây.

Một khía cạnh khác như được báo cáo trong bản mô tả là việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh kháng thể gắn kết với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khi đầu chó (cyTfR), trong đó kháng thể có tốc độ phân ly được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt đối với thụ thể transferrin ở người nằm trong khoảng từ 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây, để phân bố phân tử trị liệu qua hàng rào máu-não.

Theo một phương án, tốc độ phân ly được xác định ở 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 và 0nM.

Theo một phương án, tốc độ phân ly được xác định bằng cách sử dụng chip cộng hưởng plasmon bề mặt với bề mặt biotin và chất đệm vận hành 1xPBS được bổ sung natri clorua 250mM ở tốc độ dòng chảy bằng 10 μ L/phút.

Theo một phương án, sự kết hợp được theo dõi trong 180 giây và sự phân ly được theo dõi trong 600 giây.

Theo một phương án, tốc độ phân ly được xác định trên BIAcore T200.

Theo một phương án, tốc độ phân ly nằm trong khoảng từ 0,08 1/giây đến 0,008 1/giây.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh, tốc độ phân ly được xác định ở nhiệt độ 25°C.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh, tốc độ phân ly là tốc độ phân ly được xác định ở nhiệt độ 25°C.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó (cyTfR), bao gồm i) miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 01 và ii) miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 26, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có gốc axit amin prolin (P) ở vị trí 80, gốc axit amin asparagin (N) ở vị trí 91 và gốc axit amin alanin (A) ở vị trí 93 (đánh số theo Kabat).

Theo một phương án, kháng thể còn có gốc axit amin serin (S) ở vị trí 100g trong miền biến đổi chuỗi nặng (đánh số theo Kabat).

Theo một phương án, kháng thể còn có gốc axit amin serin (S) ở vị trí 65 trong miền biến đổi chuỗi nặng (đánh số theo Kabat).

Theo một phương án, kháng thể còn có gốc axit amin glutamin (Q) ở vị trí 105 trong miền biến đổi chuỗi nặng (đánh số theo Kabat).

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó (cyTfR), bao gồm i) miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 01 và ii) miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 26, trong đó kháng thể có tốc độ phân ly tính theo đơn vị 1/giây đối với thụ thể transferrin ở người mà bằng hoặc thấp hơn (tức là nhiều nhất) tốc độ phân ly tính theo đơn vị 1/giây của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó, nhờ đó tốc độ phân ly được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt, và nhờ đó kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 có miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 64 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65.

Theo một phương án, kháng thể có tốc độ phân ly tính theo đơn vị 1/giây đối với thụ thể transferrin ở người mà i) bằng hoặc thấp hơn (tức là nhiều nhất) tốc độ phân ly tính theo đơn vị 1/giây của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó và ii) bằng hoặc lớn hơn (tức là ít nhất) 5% tốc độ phân ly tính theo đơn vị 1/giây của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó (cyTfR). Theo một số phương án, kháng thể của thụ thể kháng transferrin

- gắn kết với thụ thể transferrin ở người (huTfR) và thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó (cyTfR);
- có tốc độ phân ly tính theo đơn vị 1/giây đối với thụ thể transferrin ở người bằng hoặc thấp hơn (tức là nhiều nhất) tốc độ phân ly tính theo đơn vị 1/giây của kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 đối với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó, nhờ đó tốc độ phân ly được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt, và nhờ đó kháng thể của thụ thể kháng transferrin 128,1 có miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 64 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 65;

- gắn kết với tốc độ phân ly đối với thụ thể transferrin ở người là nằm trong khoảng từ và bao gồm cả 0,1 1/giây đến 0,005 1/giây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể của thụ thể kháng transferrin chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71, 72 hoặc 73; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của VH được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71 hoặc 72 hoặc 73. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của VH được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 72. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của VH được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 73. Theo một phương án, kháng thể chứa HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71 hoặc 72 hoặc 73. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71 hoặc 72 hoặc 73 và HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 71 hoặc 72 hoặc 73, HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78, và HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68. Theo một phương án khác, kháng thể chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 72.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của VL được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76; và

(c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78. Theo một phương án, kháng thể chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của VH được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68, và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 71 hoặc 72 hoặc 73; và (b) miền VL chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự HVR của VL được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75, (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 72; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 78.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây, kháng thể của thụ thể kháng transferrin được làm giống như của người. Theo một phương án, kháng thể của thụ thể kháng transferrin chứa HVR như theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây, và còn chứa khung thụ thể người, ví dụ, khung globulin miễn dịch người hoặc khung liên ứng ở người.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể của thụ thể kháng transferrin chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và có khoảng tốc độ phân ly giống như kháng thể chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 24. Theo một số phương án, trình tự VH có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các biến thể thể (ví dụ, thể bảo toàn), xen vào, hoặc làm khuyết so với trình tự đối chiếu, nhưng kháng thể của thụ thể kháng transferrin chứa trình tự đó vẫn giữ được khả năng gắn kết với thụ thể transferrin với cùng một tốc độ phân ly. Theo một số phương án, tổng cộng

1 đến 10 axit amin được thế, được xen vào và/hoặc được làm khuyết trong SEQ ID NO: 24. Theo một số phương án, biến thể thế, xen vào, hoặc làm khuyết xuất hiện ở các vùng bên ngoài HVR (tức là, trong FR). Tùy ý, kháng thể của thụ thể kháng transferrin chứa trình tự VH của SEQ ID NO: 24, bao gồm cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo một phương án cụ thể, VH chứa một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 66, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 68, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 72.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể của thụ thể kháng transferrin, trong đó kháng thể này bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% đối với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 37 và có khoảng tốc độ phân ly giống như kháng thể chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, trình tự VL có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các biến thể thế (ví dụ, thế bảo toàn), xen vào, hoặc làm khuyết so với trình tự đối chiếu, nhưng kháng thể của thụ thể kháng transferrin chứa trình tự đó vẫn giữ được khả năng gắn kết với thụ thể transferrin với cùng một tốc độ phân ly. Theo một số phương án, tổng cộng 1 đến 10 axit amin đã được thế, được xen vào và/hoặc được làm khuyết trong SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, các biến thể thế, xen vào, hoặc làm khuyết xuất hiện trong các vùng bên ngoài HVR (tức là, trong FR). Tùy ý, kháng thể của thụ thể kháng transferrin chứa trình tự VL trong SEQ ID NO: 37, bao gồm cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo một phương án cụ thể, VL chứa một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 76; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể của thụ thể kháng transferrin, trong đó kháng thể này chứa VH như theo phương án bất kỳ trong số các phương án được đề cập trên đây, và VL như theo phương án bất kỳ trong số các phương án được đề cập trên đây. Theo một phương án, kháng thể chứa trình tự VH và trình tự VL trong SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 37, một cách tương ứng, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể của thụ thể kháng transferrin theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể người. Theo một phương án, kháng thể của thụ thể kháng transferrin là mảnh kháng thể, ví dụ, Fv, Fab, Fab', scFv, kháng thể thể đôi, hoặc mảnh F(ab')₂. Theo một phương án khác, kháng thể là kháng thể có độ dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgG1 nguyên vẹn hoặc lớp kháng thể hoặc isotyp khác như được định nghĩa trong bản mô tả.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh, kháng thể được kết hợp với hợp chất trị liệu.

Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh, kháng thể được kết hợp với chất tạo ảnh hoặc nhãn dán.

Theo một phương án khác, kháng thể là kháng thể đa đặc hiệu và hợp chất trị liệu tùy ý tạo ra một phần của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án như vậy, kháng thể đa đặc hiệu bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết TfR và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết kháng nguyên nào. Theo một khía cạnh như vậy, kháng nguyên nào được chọn từ nhóm bao gồm: beta-secretaza 1 (BACE1), Abeta; thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô người 2 (HER2), tau, apolipoprotein E (ApoE), alpha-synuclein, CD20, huntingtin, prion protein (PrP), kinaza lập giàu leuxin 2 (LRRK2), parkin, presenilin 1, presenilin 2, gama secretaza, thụ thể chết 6 (DR6), protein tiền chất dạng tinh bột (APP), thụ thể p75 neurotrophin (p75NTR), glucocerebrosidaza, và caspaza 6. Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và BACE1. Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và Abeta. Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và alpha synuclein. Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và CD20. Theo một phương án khác, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả TfR và glucocerebrosidaza. Theo một phương án khác, hợp chất trị liệu là thuốc rối loạn thần kinh.

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

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để bào chế thuốc để điều trị rối loạn thần kinh. Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn bệnh thần kinh, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh thị giác, rối loạn co giật, rối loạn tích lũy lysosom, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh virus hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm CNS.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng để điều trị rối loạn thần kinh. Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn bệnh thần kinh, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh thị giác, rối loạn co giật, rối loạn tích lũy lysosom, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh virus hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm CNS.

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

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

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp vận chuyển hợp chất qua BBB ở đối tượng, bao gồm bước cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ghép cặp với nó qua BBB. Theo một phương án, BBB ở đối tượng là người. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp gia tăng sự tiếp xúc của CNS của đối tượng với hợp chất, bao gồm bước cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ghép cặp với nó qua BBB. Theo một phương án, BBB ở đối tượng là người. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều

trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp gia tăng mức lưu lại trong CNS của hợp chất được dùng cho đối tượng, bao gồm bước cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho mức giữ lại trong CNS của hợp chất được làm tăng. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn thần kinh ở động vật có vú, bao gồm bước điều trị động vật có vú bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn bệnh thần kinh, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh thị giác, rối loạn co giật, rối loạn tích lũy lysosom, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh virus hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm CNS. Theo một phương án, rối loạn thần kinh là ở đối tượng là người. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một phương án, kháng thể được cải biến ở một hoặc nhiều tính chất được chọn từ chức năng tác động của kháng thể vùng Fc, chức năng hoạt hóa bổ thể của kháng thể, và ái lực của kháng thể đối với TfR.

Theo một phương án, tính chất nêu trên là chức năng tác động của kháng thể vùng Fc.

Theo một phương án, tính chất nêu trên là chức năng hoạt hóa bổ thể của kháng thể.

Theo một phương án, tính chất nêu trên là ái lực của kháng thể đối với TfR.

Theo một phương án, chức năng tác động hoặc chức năng hoạt hóa bổ thể đã được làm giảm hoặc loại bỏ so với kháng thể loại đại của cùng một isotyp. Theo một phương án, chức năng tác động được làm giảm hoặc loại bỏ bằng phương pháp được chọn từ chức năng làm giảm mức glycosyl hóa của kháng thể, cải biến isotyp của kháng thể thành isotyp mà về bản chất được làm giảm hoặc loại bỏ chức năng tác động, và cải biến vùng Fc.

Theo một phương án, chức năng tác động được làm giảm hoặc loại bỏ bằng cách làm giảm mức glycosyl hóa của kháng thể. Theo một phương án, mức glycosyl hóa của kháng thể được làm giảm bằng phương pháp được chọn từ: sản xuất kháng thể trong môi trường không cho phép glycosyl hóa loại đại; loại bỏ nhóm hydrat cacbon đã có mặt trên kháng thể; và cải biến kháng thể sao cho không xảy ra sự glycosyl hóa loại đại.

Theo một phương án, mức glycosyl hóa của kháng thể được làm giảm bằng cách sản xuất kháng thể trong môi trường không cho phép việc glycosyl hóa loại đại, như sản xuất trong hệ sản xuất tế bào không phải của động vật có vú hoặc khi kháng thể được sản xuất theo phương pháp tổng hợp. Theo một phương án, kháng thể được sản xuất trong hệ sản xuất tế bào không phải của động vật có vú. Theo một phương án khác, kháng thể được sản xuất theo phương pháp tổng hợp.

Theo một phương án, việc glycosyl hóa của kháng thể được làm giảm bằng cách cải biến kháng thể sao cho không xảy ra sự glycosyl hóa loại đại, như trong đó vùng Fc của kháng thể chứa đột biến ở vị trí 297 sao cho gốc asparagin loại đại ở vị trí đó được thay thế bằng một axit amin khác gây trở ngại cho sự glycosyl hóa ở vị trí đó.

Theo một phương án, chức năng tác động được làm giảm hoặc loại bỏ bằng ít nhất một cải biến của vùng Fc. Theo một phương án, chức năng tác động hoặc chức năng hoạt hóa bổ thể được làm giảm hoặc loại bỏ bằng cách làm khuyết tất cả hoặc một phần của vùng Fc, hoặc bằng cách xử lý kỹ thuật kháng thể sao cho nó không bao gồm vùng Fc hoặc vùng không phải Fc có khả năng về chức năng tác động hoặc chức năng hoạt hóa bổ thể. Theo một phương án, ít nhất một cải biến của vùng Fc được chọn từ: đột biến điểm của vùng Fc để làm suy yếu khả năng gắn kết với một hoặc nhiều thụ thể Fc được chọn từ các vị trí sau: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 30 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, và 439; đột biến

điểm của vùng Fc để làm suy yếu khả năng gắn kết với C1q được chọn từ các vị trí sau: 270, 322, 329, và 321; loại bỏ một số hoặc tất cả vùng Fc, và đột biến điểm ở vị trí 132 của miền CH1. Theo một phương án, cải biến nêu trên là đột biến điểm của vùng Fc để làm suy yếu khả năng gắn kết với C1q được chọn từ các vị trí sau: 270, 322, 329, và 321. Theo một phương án khác, cải biến này là loại bỏ một số hoặc tất cả vùng Fc. Theo một phương án khác, chức năng khởi động bổ thể được làm giảm hoặc loại bỏ bằng cách làm khuyết tất cả hoặc một phần của vùng Fc, hoặc bằng cách xử lý kỹ thuật kháng thể sao cho nó không bao gồm vùng Fc liên hợp con đường bổ sung. Theo một phương án, kháng thể được chọn từ Fab hoặc kháng thể chuỗi đơn. Theo một phương án khác, vùng không phải Fc của kháng thể được cải biến để làm giảm hoặc loại bỏ sự hoạt hóa con đường bổ sung bằng kháng thể. Theo một phương án, cải biến này là đột biến điểm của vùng CH1 để làm suy yếu khả năng gắn kết với C3. Theo một phương án, đột biến điểm là ở vị trí 132 (xem, ví dụ, Vidarte et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 38217-38223).

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, ái lực của kháng thể đối với TfR được làm giảm, như được đo so với kháng thể loại đại của cùng một isotyp không có ái lực được làm giảm đối với TfR. Theo một khía cạnh như vậy, kháng thể có K_D hoặc IC_{50} đối với TfR nằm trong khoảng từ 1pM đến khoảng 100 μ M.

Theo một phương án, kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả cam chức năng tác động. Theo một phương án, kháng thể này không có chức năng tác động. Theo một phương án, kháng thể này thuộc phân lớp IgG1 ở người và có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai chuỗi nặng (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án, kháng thể này là

- a) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người, hoặc
- b) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người, hoặc
- c) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người với các đột biến L234A, L235A và P329G,
- d) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P, L235E và tùy ý P329G,
- e) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người với 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 còn lại tương ứng, hoặc

- f) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P và tùy ý 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 còn lại tương ứng.

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

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để bào chế thuốc để điều trị rối loạn thần kinh. Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn bệnh thần kinh, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh thị giác, rối loạn co giật, rối loạn tích lũy lysosom, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh virus hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm CNS.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên để sử dụng để điều trị rối loạn thần kinh. Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn bệnh thần kinh, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh thị giác, rối loạn co giật, rối loạn tích lũy lysosom, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh virus hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm CNS.

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

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

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế đề xuất phương pháp vận chuyển hợp chất qua BBB ở đối tượng, bao gồm bước cho kháng thể bất kỳ trong số các

kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ghép cặp với nó qua BBB. Theo một phương án, BBB ở đối tượng là người. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một khía cạnh khác của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp gia tăng sự tiếp xúc của CNS của đối tượng với hợp chất, phương pháp này bao gồm bước cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất được ghép cặp với nó qua BBB. Theo một phương án, BBB ở đối tượng là người. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp gia tăng mức giữ lại trong CNS của hợp chất được dùng cho đối tượng, phương pháp này bao gồm bước cho kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên tiếp xúc với BBB sao cho mức giữ lại trong CNS của hợp chất được làm tăng. Theo một phương án, BBB ở đối tượng là người. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một khía cạnh của phương án nêu trên, sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn thần kinh trong động vật có vú, bao gồm bước điều trị động vật có vú bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm rối loạn bệnh thần kinh, bệnh thoái hóa thần kinh, bệnh ung thư, rối loạn bệnh thị giác, rối loạn co giật, rối loạn tích lũy lysosom, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh virus hoặc vi khuẩn, chứng thiếu máu cục bộ, rối loạn hành vi, và viêm CNS. Theo một khía cạnh như vậy khác, rối loạn thần kinh là ở đối tượng là người. Theo một phương án, kháng thể được kết hợp với hợp chất được dùng ở liều trị liệu. Theo một phương án, liều trị liệu là bão hòa TfR. Theo một phương án khác, việc

dùng kháng thể là ở liều và/hoặc tần suất liều được hiệu chuẩn để tối thiểu hóa các triệu chứng lâm sàng cấp tính khi dùng kháng thể.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm mức thanh thải hợp chất được dùng cho đối tượng, trong đó hợp chất được kết hợp với kháng thể mà gắn kết với ái lực thấp với TfR, sao cho mức thanh thải hợp chất được làm giảm.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tối ưu hóa được động học và/hoặc được lực học của hợp chất để hữu hiệu trong CNS ở đối tượng, trong đó hợp chất được kết hợp với kháng thể mà gắn kết với ái lực thấp với TfR, và kháng thể được chọn lọc sao cho ái lực của nó đối với TfR sau khi ghép cặp với hợp chất thu được lượng vận chuyển của kháng thể được liên hợp với hợp chất qua BBB mà tối ưu hóa được động học và/hoặc được lực học của hợp chất trong CNS.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể của thụ thể kháng transferrin theo khía cạnh và phương án bất kỳ trong số các khía cạnh và phương án nêu trên có thể kết hợp đặc điểm bất kỳ trong số các đặc điểm này, riêng lẻ hoặc kết hợp, như được mô tả trong các phần từ 1 đến 5 dưới đây:

1. Ái lực của kháng thể

Theo một phương án, Kd được đo bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ (RIA). Theo một phương án, RIA được tiến hành với phiên bản Fab của kháng thể đang quan tâm và kháng nguyên của nó. Ví dụ, ái lực gắn kết trong dung dịch của Fab đối với kháng nguyên được đo bằng cách cân bằng Fab bằng nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu (^{125}I) trong sự có mặt của dãy chuẩn độ của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó bắt kháng nguyên gắn kết bằng đĩa được phủ kháng thể kháng Fab (xem, ví dụ, Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Để thiết lập các điều kiện cho thử nghiệm này, các đĩa nhiều giếng MICROTITER® (Thermo Scientific) được phủ qua đêm với $5\mu\text{g/mL}$ kháng thể kháng Fab bất (Cappel Labs) trong natri carbonat 50mM (độ pH = 9,6), và sau đó được phong bế bằng albumin huyết thanh bò 2% (trọng lượng/thể tích) trong PBS trong hai đến năm giờ ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 23°C). Trong đĩa không hấp phụ (Nunc #269620), kháng nguyên 100pM hoặc 26pM [^{125}I] được trộn với các phần pha loãng theo dãy của Fab đang quan tâm (ví dụ, phù hợp với việc đánh giá kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta, L.G. et al., Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). Fab đang quan tâm sau đó được ủ qua

đêm; tuy nhiên, có thể tiếp tục ủ trong thời gian lâu hơn (ví dụ, khoảng 65 giờ) để đảm bảo đạt được cân bằng. Sau đó, hỗn hợp được chuyển vào đĩa bắt để ủ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, trong một giờ). Dung dịch sau đó được loại bỏ và đĩa được rửa tám lần bằng polysorbat 20 0,1% (TWEEN-20®) trong PBS. Khi các đĩa đã khô, 150µL/giếng chất nhấp nháy (MICROSCINT-20™; Packard) được bổ sung, và các đĩa được đếm trên thiết bị đếm gamma TOPCOUNT™ (Packard) trong mười phút. Nồng độ của từng Fab mà mang lại mức gắn kết thấp hơn hoặc bằng 20% mức gắn kết tối đa được chọn để sử dụng trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh.

Theo một phương án khác, Kd được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®. Ví dụ, thử nghiệm sử dụng BIACORE®-2000 hoặc BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) được tiến hành ở nhiệt độ 25°C với các chip CM5 kháng nguyên cố định ở ~10 đơn vị đáp ứng (RU). Theo một phương án, chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hóa bằng N-etyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và N-hydroxysuccinimide (NHS) theo các chỉ dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng với natri axetat 10mM, độ pH = 4,8, đến 5µg/mL (~0,2µM) trước khi tiêm ở tốc độ dòng chảy bằng 5µL/phút để đạt được khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU) của protein ghép cặp. Sau khi tiêm kháng nguyên, etanolamin 1M được tiêm để phong bế các nhóm không được phản ứng. Để đo động học, phần pha loãng theo dãy hai lần của Fab (0,78nM đến 500nM) được tiêm trong PBS với chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) ở nhiệt độ 25°C ở tốc độ dòng chảy bằng khoảng 25µL/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mô hình liên kết một với một Langmuir đơn giản (phần mềm đánh giá BIACORE® phiên bản 3.2) bằng cách khớp đồng thời biểu đồ nhiệt kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (KD) được tính là tỷ lệ k_{off}/k_{on} (xem, ví dụ, Chen, Y. et al., J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Nếu tốc độ kết hợp vượt quá $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt nêu trên, sau đó tốc độ kết hợp có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật dùng huỳnh quang mà đo sự tăng hoặc giảm cường độ phát xạ huỳnh quang (kích thích = 295nm; phát xạ = 340nm, băng tần 16nm) ở nhiệt độ 25°C của 20nM kháng thể kháng kháng nguyên (dạng Fab) trong PBS, độ pH = 7,2, trong sự có mặt của các nồng độ gia tăng của kháng nguyên như được đo trong phổ kế, như phổ quang kế được trang bị dòng

chặn (Aviv Instruments) hoặc phổ quang kế 8000-series SLM-AMINCOTM (ThermoSpectronic) với cuvet được khuấy.

2. Mảnh kháng thể

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả là mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, và scFv, và các mảnh khác được mô tả dưới đây. Để có nhận xét về một số mảnh kháng thể nhất định, xem Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Để có nhận xét về mảnh scFv, xem, ví dụ, Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; xem cả trong WO 93/16185; US 5,571,894 và US 5,587,458. Để có thông tin về mảnh Fab và F(ab')₂ chứa các gốc epitop gắn kết thụ thể cứu trợ và có thời gian bán hủy *in vivo* tăng lên, xem US 5,869,046.

Kháng thể thể đôi là mảnh kháng thể có hai vị trí gắn kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; và Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. Kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong Hudson, P.J. et al., Nat. Med. 9 (2003) 129-134).

Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể chứa tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn ở người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, US 6,248,516).

Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kỹ thuật phân hủy protein phân giải của kháng thể nguyên vẹn cũng như sản xuất bằng tế bào vật chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc thực khuẩn thể), như được mô tả trong bản mô tả.

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

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả là kháng thể khảm. Một số kháng thể khảm nhất định 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 khảm bao gồm vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi

có nguồn gốc từ chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người, như khỉ) và vùng hằng định của người. Trong một ví dụ khác, kháng thể khảm là kháng thể “được chuyển đổi lớp” trong đó lớp hoặc phân lớp được thay đổi từ lớp hoặc phân lớp của kháng thể ban đầu. Kháng thể khảm bao gồm các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, kháng 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, trong khi vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể không phải của người ban đầu. Nhìn chung, kháng thể được làm giống như của người bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó HVR, ví dụ, CDR, (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người, và FR (hoặc các phần của nó) có nguồn gốc từ trình tự kháng thể người. Kháng thể được làm giống như của người tùy ý còn bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng 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 có nguồn gốc từ đó), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Kháng thể được làm giống như của người và các phương pháp tạo ra chúng được nhận xét, ví dụ, trong Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, và được mô tả chi tiết hơn, ví dụ, trong 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 quá trình ghép vùng quyết định tính đặc hiệu (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (mô tả quá trình “làm lại bề mặt”); Dall’Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (mô tả quá trình “vận chuyển 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 vận chuyển FR).

Vùng khung của người mà có thể được sử dụng để nhân hóa bao gồm nhưng không giới hạn ở: vùng khung được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp “thích hợp nhất” (xem, ví dụ, Sims, M.J. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; vùng khung có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của các kháng thể người của một nhóm con cụ thể của

vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc nặng (xem, ví dụ, 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 trưởng thành của người (đột biến soma) hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem, ví dụ, Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); và vùng khung có nguồn gốc từ thư viện FR sàng lọc (xem, ví dụ, Baca, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 và Rosok, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Kháng thể đa đặc hiệu

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đơn dòng có các tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo một số phương án, một trong các tính đặc hiệu gắn kết là đối với thụ thể transferrin và tính đặc hiệu gắn kết còn lại là đối với kháng nguyên bất kỳ khác. Kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để định vị tác nhân gây độc tế bào đến các tế bào biểu hiện thụ thể transferrin. Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra dưới dạng kháng thể có độ dài đầy đủ hoặc mảnh kháng thể.

Các kỹ thuật để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau (xem Milstein, C. and Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, và Traunecker, A. et al., *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659), và xử lý kỹ thuật "phân phình-trong-phần lõm" (xem, ví dụ, US 5,731,168). Kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được tạo ra bằng cách thiết kế các tác dụng dẫn hướng tĩnh điện để tạo ra các phân tử Fc-homodimer của kháng thể (WO 2009/089004); liên kết chéo hai hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh (xem, ví dụ, US 4,676,980, và Brennan, M. et al., *Science* 229 (1985) 81-83); sử dụng chất khóa leuxin để sản xuất kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Kostelny, S.A. et al., *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553; sử dụng công nghệ "kháng thể thể đôi" để tạo ra các mảnh kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Holliger, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448); và sử dụng các dime Fv chuỗi đơn (scFv) (xem, ví dụ Gruber, M et al., *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374); và tạo ra các kháng thể ba đặc hiệu như được mô tả, ví dụ, trong Tutt, A. et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69).

Các kháng thể được xử lý kỹ thuật với ba hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng, bao gồm “kháng thể bạch tuộc Octopus”, cũng được bao gồm trong bản mô tả (xem, ví dụ US 2006/0025576).

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể trong bản mô tả còn bao gồm “Fab tác động kép” hoặc “DAF” bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết với thụ thể transferrin cũng như một kháng nguyên khác, khác nhau (xem, US 2008/0069820, ví dụ).

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể trong bản mô tả còn bao gồm kháng thể đa đặc hiệu được mô tả trong WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792, và WO 2010/145793.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể của thụ thể kháng transferrin là kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm:

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Kháng thể theo a) không chứa cải biến như được báo cáo theo b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo a) là chuỗi được phân lập.

Trong kháng thể theo b)

bên trong chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH của kháng thể nêu trên,

và

bên trong chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL của kháng thể nêu trên.

Theo một phương án:

- i) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất theo a) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo Kabat) được thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất theo a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo chỉ số Kabat EU) được thế bằng axit amin tích điện âm,

hoặc

- ii) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ hai theo b) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo Kabat) được thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ hai theo b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo chỉ số Kabat EU) được thế bằng axit amin tích điện âm.

Theo một phương án được ưu tiên

- i) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất theo a) axit amin ở vị trí 124 độc lập được thế bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên, độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất theo a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 độc lập được thế bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

hoặc

- ii) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ hai theo b) axit amin ở vị trí 124 độc lập được thế bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên, độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ hai theo b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 độc lập được thế

bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, trong miền hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 124 và 123 được thế bằng K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, trong miền hằng định CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án được ưu tiên, trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin ở vị trí 124 và 123 được thế bằng K, và trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, trong miền hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 124 và 123 được thế bằng K, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế bằng E, và trong miền biến đổi VL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin ở vị trí 38 được thế bằng K, trong miền biến đổi VH của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin ở vị trí 39 được thế bằng E, trong miền biến đổi VL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 38 được thế bằng K, và trong miền biến đổi VH của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 39 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau, và trong đó miền hằng định CL và CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Kháng thể theo a) không chứa cải biến như được báo cáo theo b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo a) là các chuỗi được phân lập.

Trong kháng thể theo b)

bên trong chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH của kháng thể nêu trên, và miền chuỗi nhẹ hằng định CL được thay thế bằng miền chuỗi nặng hằng định CH1 của kháng thể nêu trên;

và

bên trong chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL của kháng thể nêu trên, và miền chuỗi nặng hằng định CH1 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ hằng định CL của kháng thể nêu trên.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể hóa trị hai, đặc hiệu kép bao gồm

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và
- b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền hằng định CL và CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Kháng thể theo a) không chứa cải biến như được báo cáo theo b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo a) là các chuỗi được phân lập.

Trong kháng thể theo b)

bên trong chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ hằng định CL được thay thế bằng miền chuỗi nặng hằng định CH1 của kháng thể nêu trên;

và bên trong chuỗi nặng

miền chuỗi nặng hàng định CH1 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ hàng định CL của kháng thể nêu trên.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đa đặc hiệu bao gồm:

- a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng kháng thể và hai chuỗi nhẹ kháng thể, và
- b) một, hai, ba hoặc bốn mảnh Fab chuỗi đơn gắn kết đặc hiệu với một đến bốn kháng nguyên khác (tức là kháng nguyên thứ hai và/hoặc thứ ba và/hoặc thứ tư và/hoặc thứ năm, tốt hơn là gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên khác, tức là kháng nguyên thứ hai),

trong đó mảnh Fab chuỗi đơn đã nêu theo b) được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu theo a) thông qua tác nhân liên kết peptit ở đầu tận C hoặc N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc một trong các kháng nguyên khác là thụ thể transferrin ở người.

Theo một phương án, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu thông qua tác nhân liên kết peptit ở đầu tận C của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu.

Theo một phương án, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu thông qua tác nhân liên kết peptit ở đầu tận C của các chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu.

Theo một phương án, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu thông qua tác nhân liên kết peptit ở đầu tận C của các chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu.

Theo một phương án, hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu thông qua tác nhân

liên kết peptit ở đầu tận C của từng chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu.

Theo một phương án, hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu thông qua tác nhân liên kết peptit ở đầu tận C của từng chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu.

Theo một phương án, hai mảnh Fab chuỗi đơn giống hệt gắn kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu thông qua tác nhân liên kết peptit ở đầu tận C của từng chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể hóa trị ba, đặc hiệu kép bao gồm

a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng kháng thể và hai chuỗi nhẹ kháng thể,

b) polypeptit thứ nhất bao gồm

ba) miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH),

hoặc

bb) miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) và miền hằng định của kháng thể 1 (CH1),

trong đó polypeptit thứ nhất nêu trên được dung hợp với đầu tận N của miền VH của nó thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của một trong hai chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu,

c) polypeptit thứ hai bao gồm

ca) miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL),

hoặc

cb) miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và miền hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể (CL),

trong đó polypeptit thứ hai nêu trên được dung hợp với đầu tận N của miền VL thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của chuỗi còn lại trong hai chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ đã nêu,

và

trong đó miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) của polypeptit thứ nhất và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) của polypeptit thứ hai cùng nhau tạo ra vị trí gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai,

và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Theo một phương án, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) của polypeptit theo b) và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) của polypeptit theo c) được liên kết và ổn định thông qua cầu disulfua chuỗi chung bằng cách đưa liên kết disulfua vào giữa các vị trí sau:

- i) miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 44 đến miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 100, hoặc
- ii) miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 105 đến miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 43, hoặc
- iii) miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 101 đến miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 100 (việc đánh số luôn luôn theo chỉ số Kabat EU).

Các kỹ thuật để đưa cầu disulfua không tự nhiên vào để làm ổn định được mô tả trong, ví dụ, WO 94/029350, Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., et al., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; hoặc Schmidt, M., et al., Oncogene (1999) 18 1711-1721. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa các miền biến đổi của polypeptit theo b) và c) là nằm giữa miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 44 và miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 100. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa các miền biến đổi của polypeptit theo b) và c) nằm giữa miền biến đổi chuỗi nặng vị trí 105 và miền biến đổi chuỗi nhẹ vị trí 43 (việc đánh số luôn luôn theo Kabat). Theo một phương án, kháng thể hóa trị ba, đặc hiệu kép không có sự ổn định disulfua tùy ý nêu trên giữa các miền biến đổi VH và VL của mảnh Fab chuỗi đơn được ưu tiên.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu, bao gồm

- a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và
- b) chuỗi nhẹ (được cải biến) thứ hai và chuỗi nặng (được cải biến) thứ hai của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và/hoặc trong đó miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, và
- c) trong đó một đến bốn peptit gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với một hoặc hai kháng nguyên khác (tức là với kháng nguyên thứ ba và/hoặc thứ tư) được dung hợp thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C hoặc N của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của a) và/hoặc b),

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai hoặc một trong các kháng nguyên khác là thụ thể transferrin ở người.

Kháng thể theo a) không chứa cải biến như được báo cáo theo b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo a) là các chuỗi được phân lập.

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo c) một hoặc hai peptit gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với một hoặc hai kháng nguyên khác.

Theo một phương án, peptit gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm mảnh scFv và mảnh scFab.

Theo một phương án, peptit gắn kết kháng nguyên là mảnh scFv.

Theo một phương án, peptit gắn kết kháng nguyên là mảnh scFab.

Theo một phương án, peptit gắn kết kháng nguyên được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng của a) và/hoặc b).

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo c) một hoặc hai peptit gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên khác.

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo c) hai peptit gắn kết kháng nguyên giống hệt gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ ba. Theo một phương án được ưu tiên, cả hai peptit gắn kết kháng nguyên giống hệt này đều được dung hợp thông qua cùng một tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của chuỗi

nặng của a) và b). Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit gắn kết kháng nguyên giống hệt là mảnh scFv hoặc mảnh scFab.

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu bao gồm theo c) hai peptit gắn kết kháng nguyên gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ ba và thứ tư. Theo một phương án, cả hai peptit gắn kết kháng nguyên nêu trên đều được dung hợp thông qua cùng một tác nhân nối peptit với đầu tận C của chuỗi nặng của a) và b). Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit gắn kết kháng nguyên nêu trên là mảnh scFv hoặc mảnh scFab.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép, hóa trị bốn bao gồm

- a) hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng của kháng thể, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (và bao gồm hai mảnh Fab),
- b) hai mảnh Fab bổ sung của kháng thể, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó cả hai mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C hoặc N của chuỗi nặng của a),

và

trong đó trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện

- i) trong cả hai mảnh Fab của a), hoặc trong cả hai mảnh Fab của b), miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và/hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau,

hoặc

- ii) trong cả hai mảnh Fab của a) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau,

và

trong cả hai mảnh Fab của b) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau,

hoặc

iii) trong cả hai mảnh Fab của a) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau,

và

trong cả hai mảnh Fab của b) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau,

hoặc

iv) trong cả hai mảnh Fab của a) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau, và trong cả hai mảnh Fab của b) miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau,

hoặc

v) trong cả hai mảnh Fab của a) miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau, và trong cả hai mảnh Fab của b) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Theo một phương án, cả hai mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của chuỗi nặng của a), hoặc với đầu tận N của chuỗi nặng của a).

Theo một phương án, cả hai mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua tác nhân liên kết peptit với đầu tận C của chuỗi nặng của a).

Theo một phương án, cả hai mảnh Fab bổ sung này đều được dung hợp thông qua tác nhân nối peptit với đầu tận N của chuỗi nặng của a).

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện:

i) trong cả hai mảnh Fab của a), hoặc trong cả hai mảnh Fab của b), miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau,

và/hoặc

miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab của a) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau,
và/hoặc
miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab của a) miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab của b) miền biến đổi VL và VH được thay thế cho nhau,

và/hoặc

miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến sau được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab của b) miền hằng định CL và CH1 được thay thế cho nhau.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép, hóa trị bốn bao gồm:

- chuỗi nặng (được cải biến) của kháng thể thứ nhất, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và chứa cặp miền VH-CH1 thứ nhất, trong đó đầu tận N của cặp miền VH-CH1 thứ hai của kháng thể thứ nhất nêu trên được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit,
- hai chuỗi nhẹ của kháng thể thứ nhất nêu trên của a),
- chuỗi nặng (được cải biến) của kháng thể thứ hai, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai và chứa cặp miền VH-CL thứ nhất, trong đó đầu tận N của cặp miền VH-CL thứ hai của kháng thể thứ hai nêu trên được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng nêu trên thông qua tác nhân liên kết peptit, và
- hai chuỗi nhẹ (được cải biến) của kháng thể thứ hai nêu trên của c), mỗi chuỗi bao gồm cặp miền CL-CH1,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm:

- a) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể độ dài đầy đủ thứ nhất gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và
- b) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ thứ hai gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó đầu tận N của chuỗi nặng được nối với đầu tận C của chuỗi nhẹ thông qua tác nhân liên kết peptit,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Kháng thể theo a) không chứa cải biến như được báo cáo theo b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là các chuỗi được phân lập.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm:

- a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng kháng thể và hai chuỗi nhẹ kháng thể, và
- b) mảnh Fv gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai bao gồm miền VH^2 và miền VL^2 , trong đó cả hai miền được nối với nhau thông qua cầu disulfua,

trong đó chỉ có miền VH^2 hoặc miền VL^2 được dung hợp thông qua tác nhân liên kết peptit với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Trong kháng thể đặc hiệu kép, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo a) là các chuỗi được phân lập.

Theo một phương án, miền còn lại trong số miền VH^2 hoặc miền VL^2 không được dung hợp thông qua tác nhân liên kết peptit với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất.

Theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, chuỗi nhẹ thứ nhất bao gồm miền VL và miền CL và chuỗi nặng thứ nhất bao gồm miền VH, miền CH1, vùng bên lề, miền CH2 và miền CH3.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép hóa trị ba bao gồm

- a) hai mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất,
- b) một mảnh CrossFab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai trong đó miền CH1 và miền CL được trao đổi cho nhau,
- c) một vùng Fc bao gồm chuỗi nặng vùng Fc thứ nhất và chuỗi nặng vùng Fc thứ hai,

trong đó đầu tận C của miền CH1 của hai mảnh Fab được nối với đầu tận N của polypeptit vùng Fc của chuỗi nặng, và

trong đó đầu tận C của miền CL của mảnh CrossFab được nối với đầu tận N của miền VH của một trong các mảnh Fab, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép hóa trị ba bao gồm

- a) hai mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất,
- b) một mảnh CrossFab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai trong đó miền CH1 và miền CL được trao đổi cho nhau,
- c) một vùng Fc bao gồm chuỗi nặng vùng Fc thứ nhất và chuỗi nặng vùng Fc thứ hai,

trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ nhất được nối với đầu tận N của một trong các polypeptit vùng Fc của chuỗi nặng và đầu tận C của miền CL của mảnh CrossFab được nối với đầu tận N của polypeptit vùng Fc của chuỗi nặng còn lại, và

trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ hai được nối với đầu tận N của miền VH của mảnh Fab thứ nhất hoặc với đầu tận N của miền VH của mảnh CrossFab, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng kháng thể và hai chuỗi nhẹ kháng thể, và

b) mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai bao gồm miền VH^2 và miền VL^2 bao gồm mảnh chuỗi nặng và mảnh chuỗi nhẹ, trong đó

bên trong mảnh chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL^2 được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH^2 của kháng thể nêu trên,

và

bên trong mảnh chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH^2 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL^2 của kháng thể nêu trên

trong đó mảnh Fab của chuỗi nặng được xen vào giữa miền CH1 của một trong các chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ và vùng Fc tương ứng của kháng thể có độ dài đầy đủ, và đầu tận N của mảnh Fab của chuỗi nhẹ được liên hợp với đầu tận C của chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ mà được ghép cặp với chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ mà mảnh Fab của chuỗi nặng đã được xen vào, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Theo một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

- a) kháng thể có độ dài đầy đủ gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng kháng thể và hai chuỗi nhẹ kháng thể, và
- b) mảnh Fab gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai bao gồm miền VH^2 và miền VL^2 bao gồm mảnh chuỗi nặng và mảnh chuỗi nhẹ, trong đó bên trong mảnh chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL^2 được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH^2 của kháng thể nêu trên,

và

bên trong mảnh chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH^2 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL^2 của kháng thể nêu trên

trong đó đầu tận C của mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab được liên hợp với đầu tận N của một trong các chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ và đầu tận C của mảnh chuỗi nhẹ của mảnh Fab được liên hợp với đầu tận N của chuỗi nhẹ của kháng thể có độ dài đầy đủ mà ghép cặp với chuỗi nặng của kháng thể có độ dài đầy đủ mà mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab được liên hợp, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin ở người.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh, kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả là kháng thể đa đặc hiệu, đòi hỏi phải homodime hóa ít nhất hai polypeptit chuỗi nặng, và trong đó kháng thể gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người và kháng nguyên thụ thể transferrin không phải của người thứ hai.

Một vài phương pháp để cải biến $CH3$ để hỗ trợ homodime hóa đã được mô tả trong, ví dụ, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291, được bao gồm ở đây bằng cách viện dẫn. Thông thường, trong các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, miền $CH3$ của chuỗi nặng thứ nhất và miền $CH3$ của chuỗi nặng thứ hai đều được xử lý kỹ thuật theo cách bổ sung sao cho chuỗi nặng bao gồm một miền $CH3$ được xử

lý kỹ thuật có thể không bao giờ homodime hóa với một chuỗi nặng khác có cùng cấu trúc nữa (ví dụ, chuỗi nặng thứ nhất được xử lý kỹ thuật ở CH3 có thể không bao giờ homodime hóa với một chuỗi nặng thứ nhất được xử lý kỹ thuật ở CH3 khác nữa; và chuỗi nặng thứ hai được xử lý kỹ thuật ở CH3 có thể không homodime hóa với một chuỗi nặng thứ hai được xử lý kỹ thuật ở CH3 khác). Do đó chuỗi nặng bao gồm một miền CH3 được xử lý kỹ thuật bắt buộc phải homodime hóa với một chuỗi nặng khác bao gồm miền CH3, được xử lý kỹ thuật theo cách bổ sung. Đối với phương án theo sáng chế này, miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH3 của chuỗi nặng thứ hai được xử lý kỹ thuật theo cách bổ sung bằng các biến thể thể axit amin, sao cho chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai bắt buộc phải homodime hóa, trong khi đó chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai có thể không homodime hóa nữa (ví dụ, vì lý do không gian).

Các phương pháp khác nhau để hỗ trợ việc homodime hóa chuỗi nặng đã biết trong lĩnh vực này, được trích dẫn và bao gồm trên đây, được dự định là các thay thế khác nhau được sử dụng trong kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế, bao gồm “vùng Fab không cắt chéo” có nguồn gốc từ kháng thể thứ nhất, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và “vùng Fab cắt chéo” có nguồn gốc từ kháng thể thứ hai, gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, kết hợp với các biến thể thể axit amin cụ thể được mô tả trên đây cho sáng chế.

Miền CH3 của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả có thể được làm thay đổi bằng công nghệ “phân phình thành phần lõm” mà được mô tả chi tiết với một vài ví dụ trong, ví dụ, WO 96/027011, Ridgway, J.B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; và Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. Trong phương pháp này, bề mặt tương tác của hai miền CH3 được làm thay đổi để làm tăng sự homodime hóa của cả hai chuỗi nặng chứa hai miền CH3 này. Mỗi một trong hai miền CH3 (của hai chuỗi nặng) có thể là “phân phình”, trong khi miền còn lại là “phần lõm”. Việc đưa cầu disulfua vào làm ổn định thêm các homodime (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) và làm tăng hiệu suất.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả chứa đột biến T366W trong miền CH3 của “chuỗi phân phình” và đột biến

T366S, L368A, Y407V trong miền CH3 của “chuỗi phần lõm” (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Cầu disulfua chuỗi chung bổ sung giữa các miền CH3 cũng có thể được sử dụng (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681), ví dụ, bằng cách đưa đột biến Y349C vào miền CH3 của “chuỗi phần phình” và đột biến E356C hoặc đột biến S354C vào miền CH3 của “chuỗi phần lõm”. Do đó, theo một phương án được ưu tiên khác, kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả chứa đột biến Y349C và đột biến T366W trong một trong hai miền CH3 và đột biến E356C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong hai miền CH3 hoặc kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả chứa đột biến Y349C và đột biến T366W trong một trong hai miền CH3 và đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong hai miền CH3 (đột biến Y349C bổ sung trong một miền CH3 và đột biến E356C hoặc đột biến S354C bổ sung trong miền CH3 còn lại tạo ra cầu disulfua chuỗi chung) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Hơn nữa, các công nghệ phân phình trong phần lõm khác như được mô tả trong EP 1 870 459A1, có thể được sử dụng theo một cách khác hoặc ngoài ra. Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả chứa đột biến R409D và đột biến K370E trong miền CH3 của “chuỗi phần phình” và đột biến D399K và đột biến E357K trong miền CH3 của “chuỗi phần lõm” (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả chứa đột biến T366W trong miền CH3 của “chuỗi phần phình” và đột biến T366S, L368A và Y407V trong miền CH3 của “chuỗi phần lõm” và ngoài ra là đột biến R409D và đột biến K370E trong miền CH3 của “chuỗi phần phình” và đột biến D399K và đột biến E357K trong miền CH3 của “chuỗi phần lõm” (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả chứa đột biến Y349C và đột biến T366W trong một trong hai miền CH3 và đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong hai miền CH3, hoặc kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả chứa đột biến Y349C và đột biến T366W trong một trong hai miền CH3 và đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong hai miền CH3 và ngoài ra là đột biến R409D và đột biến K370E

trong miền CH₃ của “chuỗi phần phình” và đột biến D399K và đột biến E357K trong miền CH₃ của “chuỗi phần lõm” (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Ngoài “công nghệ phân phình thành phần lõm”, các kỹ thuật khác để cải biến miền CH₃ của chuỗi nặng của kháng thể đa đặc hiệu để bắt buộc phải homodime hóa là đã biết trong lĩnh vực này. Các công nghệ này, đặc biệt là các công nghệ được mô tả trong WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 và WO 2013/096291 được dự định trong bản mô tả là các thay thế cho “công nghệ phân phình thành phần lõm” kết hợp với kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả.

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong EP 1870459 được sử dụng để hỗ trợ sự homodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Phương pháp này là dựa trên việc đưa axit amin tích điện với các điện tích trái dấu ở các vị trí axit amin cụ thể trong bề mặt chung của miền CH₃/CH₃ vào giữa cả hai, chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai.

Do đó, phương án này đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, trong đó trong cấu trúc ba thành phần của kháng thể, miền CH₃ của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH₃ của chuỗi nặng thứ hai tạo ra bề mặt chung mà được định vị giữa các miền CH₃ của kháng thể tương ứng, trong đó mỗi trình tự axit amin tương ứng của miền CH₃ của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH₃ của chuỗi nặng thứ hai chứa tập hợp các axit amin được định vị bên trong bề mặt chung này trong cấu trúc ba thành phần của kháng thể, trong đó từ tập hợp các axit amin được định vị trong bề mặt chung trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin thứ nhất được thế bằng axit amin tích điện dương và từ tập hợp các axit amin được định vị trong bề mặt chung trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại, axit amin thứ hai được thế bằng axit amin tích điện âm. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án này cũng được đề cập đến trong bản mô tả là “kháng thể đa đặc hiệu được xử lý kỹ thuật ở CH₃(+/-)” (trong đó ký tự viết tắt “+/-” là các axit amin tích điện trái dấu được đưa vào trong miền CH₃ tương ứng).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu được xử lý kỹ thuật ở CH3(+/-) nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, axit amin tích điện dương được chọn từ K, R và H, và axit amin tích điện âm được chọn từ E hoặc D.

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu được xử lý kỹ thuật ở CH3(+/-) nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, axit amin tích điện dương được chọn từ K và R, và axit amin tích điện âm được chọn từ E hoặc D.

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu được xử lý kỹ thuật ở CH3(+/-) nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, axit amin tích điện dương là K, và axit amin tích điện âm là E.

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu được xử lý kỹ thuật ở CH3(+/-) nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin R ở vị trí 409 được thế bằng D và axit amin K ở vị trí được thế bằng E, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 399 được thế bằng K và axit amin E ở vị trí 357 được thế bằng K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong WO 2013/157953 được sử dụng để hỗ trợ việc homodime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng K và axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng K và axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Ngoài ra, ít nhất một trong các biến thể thế sau được bao gồm trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại: axit amin Y ở vị trí 349 được thế bằng E, axit amin Y ở vị trí 349 được thế bằng

D và axit amin L ở vị trí 368 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án, axit amin L ở vị trí 368 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong WO 2012/058768 được sử dụng để hỗ trợ việc homodimer hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng Y và axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng A và axit amin K ở vị trí 409 được thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, ngoài các biến thể thể nêu trên, trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, ít nhất một trong các axit amin ở vị trí 411 (ban đầu là T), 399 (ban đầu là D), 400 (ban đầu là S), 405 (ban đầu là F), 390 (ban đầu là N) và 392 (ban đầu là K) được thế (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Các biến thể thể được ưu tiên là:

- thể axit amin T ở vị trí 411 bằng axit amin được chọn từ N, R, Q, K, D, E và W (đánh số theo chỉ số Kabat EU),
- thể axit amin D ở vị trí 399 bằng axit amin được chọn từ R, W, Y, và K (đánh số theo chỉ số Kabat EU),
- thể axit amin S ở vị trí 400 bằng axit amin được chọn từ E, D, R và K (đánh số theo chỉ số Kabat EU),
- thể axit amin F ở vị trí 405 bằng axit amin được chọn từ I, M, T, S, V và W (đánh số theo chỉ số Kabat EU);
- thể axit amin N ở vị trí 390 bằng axit amin được chọn từ R, K và D (đánh số theo chỉ số Kabat EU); và
- thể axit amin K ở vị trí 392 bằng axit amin được chọn từ V, M, R, L, F và E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả (được xử lý kỹ thuật theo WO 2012/058768), trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng Y và axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thế

bằng V và axit amin K ở vị trí 409 được thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng A và axit amin K ở vị trí 409 được thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án vừa nêu trên, trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại này, axit amin K ở vị trí 392 được thế bằng E, axit amin T ở vị trí 411 được thế bằng E, axit amin D ở vị trí 399 được thế bằng R và axit amin S ở vị trí 400 được thế bằng R (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong WO 2011/143545 được sử dụng để hỗ trợ việc homodimer hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, các cải biến axit amin trong miền CH3 của cả hai chuỗi nặng được đưa vào ở vị trí 368 và/hoặc 409 (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong WO 2011/090762 được sử dụng để hỗ trợ việc homodimer hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. WO 2011/090762 đề cập đến các cải biến axit amin theo công nghệ “phân phình thành phần lõm”. Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu được xử lý kỹ thuật ở CH3(KiH) nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng W, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu được xử lý kỹ thuật ở CH3(KiH) nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng Y, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng T (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, thuộc isotyp IgG2, phương pháp được mô tả trong WO 2011/090762 được sử dụng để hỗ trợ việc homodimer hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu.

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong WO 2009/089004 được sử dụng để hỗ trợ việc homodimer hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin K hoặc N ở vị trí 392 được thế bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án được ưu tiên, bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên, bằng D), và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 399, axit amin E hoặc D ở vị trí 356 hoặc axit amin E ở vị trí 357 được thế bằng axit amin tích điện dương (theo một phương án được ưu tiên K hoặc R, theo một phương án được ưu tiên, bằng K, theo một phương án được ưu tiên, axit amin ở vị trí 399 hoặc 356 được thế bằng K) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, ngoài các biến thể thể nêu trên, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin K hoặc R ở vị trí 409 được thế bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án được ưu tiên, bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên, bằng D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác nữa, ngoài hoặc khác với các biến thể thể nêu trên, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin K ở vị trí 439 và/hoặc axit amin K ở vị trí 370 được thế độc lập với nhau bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án được ưu tiên, bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên, bằng D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong WO 2007/147901 được sử dụng để hỗ trợ việc homodimer hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu nêu trên như được báo cáo trong bản mô tả, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin K ở vị trí 253 được thế bằng E, axit amin D ở vị trí 282 được thế bằng K và axit amin K ở vị trí 322 được thế bằng D, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 239 được thế bằng K, axit amin E ở vị trí 240 được thế bằng K và axit amin K ở vị trí 292 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án của kháng thể đa đặc hiệu như được báo cáo trong bản mô tả, phương pháp được mô tả trong WO 2007/110205 được sử dụng để hỗ trợ việc homodimer hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh và phương án như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể ba đặc hiệu. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể là kháng thể hóa trị hai hoặc hóa trị ba. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể hóa trị hai.

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu có cấu trúc miền hằng định của kháng thể typ IgG. Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG1 ở người, hoặc phân lớp IgG1 ở người với các đột biến L234A và L235A. Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG2 người. Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG3 người. Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG4 ở người hoặc, phân lớp IgG4 ở người với đột biến bổ sung S228P. Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG1 ở người hoặc phân lớp IgG4 ở người. Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG1 ở người với các đột biến L234A và L235A (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG1 ở người với các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P và L235E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác theo tất cả các khía cạnh như được

báo cáo trong bản mô tả, kháng thể đa đặc hiệu đặc trưng ở chỗ kháng thể đa đặc hiệu nêu trên là thuộc phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P, L235E và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm miền CH3 như được nêu cụ thể trong bản mô tả, chứa glyxin-lysin dipeptit đầu tận C bổ sung (G446 và K447, đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể bao gồm chuỗi nặng bao gồm miền CH3, như được nêu cụ thể trong bản mô tả, chứa gốc glyxin đầu tận C bổ sung (G446, đánh số theo chỉ số Kabat EU).

5. Biến thể kháng thể

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các biến thể trình tự axit amin của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả. 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 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, làm khuyết từ, và/hoặc xen vào và/hoặc thế các gốc bên trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của biến thể làm khuyết, xen vào, và thế có thể được tạo ra để có được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết kháng nguyên.

a) Biến thể thế, xen vào và làm khuyết

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều thay thế axit amin. Các vị trí đang quan tâm để phát sinh đột biến thể bao gồm HVR và FR. Thế bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1 dưới tiêu đề là "biến thể thế bảo toàn". Các thay đổi cơ bản khác được nêu trong Bảng 1 dưới tiêu đề là "biến thể thế lấy làm ví dụ," và như được mô tả thêm dưới đây có tham khảo các lớp chuỗi bên axit amin. Các biến thể thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể đang quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc hoạt tính mong muốn, ví dụ, duy trì/cải thiện khả năng gắn kết kháng nguyên, làm giảm tính sinh miễn dịch, hoặc cải thiện ADCC hoặc CDC.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Biến thể lấy làm ví dụ	Biến thể bảo toàn
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
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 lại theo các tính chất chuỗi bên chung:

- (1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) trung tính ưa nước: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) axit: Asp, Glu;
- (4) bazơ: His, Lys, Arg;
- (5) các gốc ảnh hưởng đến việc định hướng chuỗi: Gly, Pro;
- (6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các biến thể thể không bảo toàn gây ra sự trao đổi thành viên của một trong các lớp này với một lớp khác.

Một kiểu biến thể thể bao gồm thể một hoặc nhiều gốc của vùng siêu biến của kháng thể ban đầu (ví dụ, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể người). Nhìn chung, (các) biến thể thu được được chọn để nghiên cứu thêm sẽ có các biến đổi (ví dụ, cải thiện) về một số tính chất sinh học nhất định (ví dụ, gia tăng ái lực, làm giảm tính sinh miễn dịch) so với kháng thể ban đầu và/hoặc về cơ bản là giữ được một số tính chất sinh học nhất định của kháng thể ban đầu. Biến thể thể lấy làm ví dụ là kháng thể trưởng thành ái lực, có thể được tạo ra một cách thuận lợi, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật trưởng thành ái lực dựa trên sự biểu hiện thực khuẩn thể như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả. Nói một cách ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và biến thể kháng thể được biểu hiện trên thực khuẩn thể và được sàng lọc hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết).

Các thay đổi (ví dụ, thể) 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 bằng các codon trải qua đột biến ở tần suất cao trong quá trình trưởng thành soma (xem, ví dụ, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), và/hoặc các gốc tiếp xúc kháng nguyên, với VH hoặc VL biến thể thu được, được thử nghiệm về ái lực gắn kết. Sự trưởng thành ái lực bằng cách xây dựng kết cấu và chọn lọc lại từ thư viện thứ cấp đã được mô tả trong, ví dụ, Hoogenboom, H.R. et al. trong tài liệu: *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. Theo một số phương án về trưởng thành ái lực, tính đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được lựa chọn để trưởng thành bằng phương pháp bất kỳ trong các phương pháp khác nhau (ví dụ, PCR dễ sai, vận chuyển chuỗi, hoặc phát sinh đột biến định hướng bằng oligonucleotit). Thư viện thứ cấp sau đó được tạo ra. Thư viện này sau đó được sàng lọc để nhận biết biến thể kháng thể bất kỳ với ái lực mong muốn. Một phương pháp khác là đưa vào tính đa dạng liên quan đến phương pháp định hướng HVR, trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc một lúc) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc HVR liên quan đến khả năng gắn kết kháng nguyên có thể được nhận biết cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật phát sinh đột biến quét alanin hoặc tạo mô hình quét alanin. CDR-H3 và CDR-L3 cụ thể thường được hướng đích.

Theo một số phương án, biến thể thể, xen vào, hoặc làm khuyết có thể xuất hiện bên trong một hoặc nhiều HVR miễn là các thay đổi này về cơ bản không làm giảm khả năng của kháng thể trong việc gắn kết kháng nguyên. Ví dụ, các thay đổi bảo toàn (ví dụ, thể bảo toàn như được đề xuất trong bản mô tả) mà về cơ bản là 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 một số phương án của trình tự VH và trình tự VL biến thể được đề xuất ở đây, mỗi HVR không được thay đổi, hoặc chứa không lớn hơn một, hai hoặc ba biến thể thể axit amin.

Phương pháp hữu ích để nhận biết các gốc hoặc vùng của kháng thể mà có thể được hướng đích để phát sinh đột biến được gọi là "phát sinh đột biến quét alanin" như được mô tả trong Cunningham, B.C. and Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. Trong phương pháp này, gốc hoặc nhóm các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như Arg, Asp, His, Lys, và Glu) được nhận biết và được thay thế bằng axit amin trung tính hoặc axit amin tích điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các biến thể thể khác có thể được đưa vào ở vị trí axit amin thể hiện tính nhạy chức năng đối với biến thể thể ban đầu. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để nhận biết các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được hướng đích hoặc loại bỏ dưới dạng ứng viên để thể. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Biến thể xen vào trình tự axit amin bao gồm các dung hợp đầu tận amino và/hoặc đầu tận carboxyl nằm trong khoảng chiều dài từ một gốc đến polypeptit chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như biến thể xen vào trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về biến thể xen vào đầu tận bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận N. Các biến thể xen vào khác của phân tử kháng thể bao gồm dung hợp với đầu tận N hoặc đầu tận C của kháng thể 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 một số phương án, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả được thay đổi để làm tăng hoặc giảm phạm vi mà kháng thể được glycosyl hóa. Việc thêm hoặc làm

khuyết vị trí glycosyl hóa vào kháng thể có thể được thực hiện một cách thuận lợi 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 bao gồm vùng Fc, hydrat cacbon được gắn vào đó có thể được thay đổi. Kháng thể tự nhiên được sản sinh bởi các tế bào động vật có vú thường chứa oligosacarit hai thành phần phân nhánh thường được gắn bằng liên kết N với Asn297 của miền CH2 của vùng Fc (xem, ví dụ, Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32). Oligosacarit có thể bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, mannoza, N-acetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn vào GlcNAc trong “thân” của cấu trúc oligosacarit hai thành phần. Theo một số phương án, các cải biến của oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện để tạo ra các biến thể kháng thể có một số tính chất nhất định được cải thiện.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất biến thể kháng thể có cấu trúc hydrat cacbon thiếu fucoza được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể nằm trong khoảng 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 tất cả cấu trúc glyco được gắn vào Asn 297 (ví dụ, cấu trúc mannoza phức tạp, lai và bậc cao) như được xác định bằng kỹ thuật đo phổ khối MALDI-TOF, như được mô tả trong WO 2008/077546, chẳng hạn. Asn297 dùng để chỉ gốc asparagin được định vị ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (đánh số EU các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể được định vị khoảng ± 3 axit amin trước hoặc sau vị trí 297, tức là, giữa vị trí 294 và 300, do các biến thể trình tự nhỏ trong kháng thể. Các biến thể fucosyl hóa như vậy có thể có chức năng ADCC cải thiện. Xem, ví dụ, US 2003/0157108; US 2004/0093621. Các ví dụ về các công bố đơn sáng chế liên quan đến biến thể kháng thể “khử fucosyl hóa” hoặc “thiếu hụt fucoza” bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; 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 dòng tế bào có khả

năng sản sinh kháng thể được khử fucosyl hóa bao gồm 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 dòng tế bào bất hoạt, 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 biến thể kháng thể còn được tạo ra có oligosacarit phân đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai thành phần được gắn vào vùng Fc của kháng thể được phân đôi bằng GlcNAc. Biến thể kháng thể này có thể có mức fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC cải thiện. Các ví dụ về các biến thể kháng thể như vậy được mô tả trong, ví dụ, WO 2003/011878; US 6,602,684; và US 2005/0123546. Biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactosa trong oligosacarit được gắn vào vùng Fc cũng được đề cập. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC cải thiện. Các biến thể kháng thể này được mô tả trong, ví dụ, WO 1997/30087; WO 1998/58964; và WO 1999/22764.

c) Biến thể vùng Fc

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

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất biến thể kháng thể có một số nhưng không phải tất cả các chức năng tác động, khiến cho nó là một ứng viên mong muốn cho ứng dụng này trong đó thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là quan trọng nhưng một số chức năng tác động nhất định (như bổ thể và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Các thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được tiến hành để xác nhận sự giảm/hao hụt hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc (FcR) có thể được tiến hành để đảm bảo rằng kháng thể thiếu khả năng gắn kết FcγR (do có thể thiếu hoạt tính ADCC), nhưng vẫn giữ được khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào sơ cấp để điều tiết ADCC, tế bào NK, biểu hiện chỉ FcγRIII, trong khi đó các đơn bào 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 tài liệu Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các thử

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 một cách khác, các phương pháp thử nghiệm không hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTITM để đo tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Các tế bào tác động hữu ích cho các thử nghiệm như vậy bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại biên (PBMC) và tế bào diệt tự nhiên (NK). Theo một 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 được bộc lộ trong Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. Thử nghiệm gắn kết C1q cũng có thể được tiến hành để xác nhận rằng kháng thể không thể gắn kết C1q và do đó 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 sung, 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. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). Việc xác định khả năng gắn kết FcRn và thời gian 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 biến thể thể một hoặc nhiều gốc của vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US 6,737,056). Các đột biến Fc như vậy bao gồm đột biến Fc có biến thể thể ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm đột biến còn gọi là đột biến Fc "DANA" với biến thể thể gốc 265 và 297 thành alanin (US 7,332,581).

Một số biến thể kháng thể nhất định có khả năng gắn kết được cải thiện hoặc giảm bớt với FcR 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 một số phương án, biến thể kháng thể bao gồm vùng Fc với một hoặc nhiều biến thể axit amin cải thiện ADCC, ví dụ, biến thể ở vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (đánh số EU các gốc).

Theo một số phương án, các thay đổi được thực hiện trong vùng Fc dẫn đến khả năng gắn kết C1q và/hoặc gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC) thay đổi (tức là, cải thiện hoặc giảm bớt), 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.

Các kháng thể có thời gian bán hủy tăng và khả năng gắn kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) cải thiện, chịu trách nhiệm vận chuyển các IgG trưởng thành 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. Các kháng thể bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều biến thể trong đó mà cải thiện khả năng gắn kết của vùng Fc với FcRn. Các biến thể Fc như vậy bao gồm các biến thể có biến thể ở một hoặc nhiều gốc của 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, thể gốc của vùng Fc 434 (US 7,371,826).

Xem cả trong Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5,648,260; US 5,624,821; và WO 94/29351 đề cập đến các ví dụ khác về biến thể vùng Fc.

d) Biến thể kháng thể được xử lý xystein

Theo một số phương án, có thể mong muốn là tạo ra kháng thể được xử lý xystein, ví dụ, “thioMAbs,” 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 ở các vị trí dễ tiếp cận của kháng thể. Bằng cách thế các gốc này bằng xystein, từ đó nhóm thiol dễ phản ứng được định vị ở các vị trí dễ tiếp cận của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể với các gốc khác, như gốc được chất hoặc tác nhân liên kết-gốc được chất, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch, như được mô tả thêm trong bản mô tả. Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc sau 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 chuỗi nặng vùng Fc. Kháng thể được xử lý xystein có thể được tạo ra như được mô tả trong, ví dụ, US 7,521,541.

e) Dẫn xuất kháng thể

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả có thể được cải biến thêm để chứa các gốc không chứa protein bổ sung mà đã biết trong lĩnh vực này và dễ có sẵn. Các gốc này thích hợp cho quá trình dẫn xuất của kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các polyme tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymethylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, polyaminoaxit (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, polypropylen oxit/etylen oxit co-polyme, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có ưu điểm trong sản xuất do độ ổn định của nó trong nước. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số lượng polyme được gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu lớn hơn một polyme được gắn, chúng có thể là phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Nhìn chung, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các yếu tố cân nhắc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể có được sử dụng trong liệu pháp trong các điều kiện xác định hay không, v.v..

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp của kháng thể và gốc không chứa protein có thể được gia nhiệt có chọn lọc bằng cách tiếp xúc với bức xạ. Theo một phương án, gốc không chứa 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 không gây hại cho các tế bào bình thường, nhưng gia nhiệt gốc không chứa protein đến nhiệt độ mà tại đó các tế bào gắn với gốc không chứa protein của kháng thể bị tiêu diệt.

B. Mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não

Theo một phương án theo tất cả các khía cạnh, kháng thể là kháng thể đa đặc hiệu có ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết đối với thụ thể transferrin và ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết đối với đích trị liệu. Theo một phương án, kháng thể bao gồm vị trí gắn kết

kháng nguyên thứ nhất gắn kết thụ thể transferrin và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết kháng nguyên não. Theo một phương án khác, kháng nguyên não được chọn từ nhóm bao gồm Abeta, thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR), thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô người 2 (HER2), alpha-synuclein, CD20, glucocerebrosidaza hoặc protein tiền chất dạng tinh bột (APP). Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đa đặc hiệu gắn kết cả:

- i) thụ thể transferrin và Abeta, hoặc
- ii) thụ thể transferrin và CD20, hoặc
- iii) thụ thể transferrin và alpha-synuclein, hoặc
- iv) thụ thể transferrin và phospho-tau, hoặc
- v) thụ thể transferrin và HER2, hoặc
- vi) thụ thể transferrin và glucocerebrosidaza.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 81 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 82 tạo ra vị trí gắn kết cho Abeta.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 80 tạo ra vị trí gắn kết cho CD20 người. Theo một phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa thay thế gốc axit amin ở vị trí 11 theo Kabat bằng axit amin bất kỳ ngoại trừ leuxin. Theo một phương án, biến thể thể bao gồm thay thế gốc axit amin ở vị trí 11 theo Kabat bằng axit amin không phân cực. Theo một phương án được ưu tiên, biến thể thể bao gồm thay thế gốc axit amin ở vị trí 11 theo Kabat trong miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79 bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm valin, leuxin, isoleuxin, serin, và phenylalanin.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 83 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 84 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 85 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 86 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 87 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 88 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 89 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 90 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 91 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 92 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ

ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 93 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 94 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và vị trí gắn kết cho glucocerebrosidase người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 34 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 83 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 84 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 34 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 85 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 86 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 34 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 87 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 88 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 34 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 89 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 90 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 34 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 91 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 92 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 34 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 93 và miền biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 94 tạo ra vị trí gắn kết cho alpha-synuclein người.

Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 7 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 34 tạo ra vị trí gắn kết cho thụ thể transferrin và vị trí gắn kết cho glucocerebrosidaza người.

Phần tử gắn kết hóa trị một gắn kết đặc hiệu với thụ thể hàng rào máu não có thể được đặc trưng về tính chất gắn kết và chuyển bào của chúng:

- gắn kết tế bào hiệu quả của tế bào biểu hiện BBBR dưới dạng phần tử gắn kết hóa trị một,
- chuyển bào *in vitro* hiệu quả dưới dạng phần tử gắn kết hóa trị một,
- tính phản ứng chéo người - khỉ đầu chó (ví dụ, trong thí nghiệm BIAcore và FACS).

Việc sàng lọc chuyển bào có thể được thực hiện trong thử nghiệm dựa trên hCMEC/D3. Thử nghiệm này có thể được thực hiện theo cách gây xung-theo dõi. Các tế bào nội mô não hCMEC/D3 được ủ với phần tử gắn kết hóa trị một trong 1 giờ, được rửa sau đó và các thông số sau được xác định ở 0 giờ và 4 giờ sau khi rửa:

- i) lượng phần tử gắn kết hóa trị một được hấp thụ vào tế bào trong pha nạp,
- ii) lượng phần tử gắn kết hóa trị một ở đáy bên 4 giờ sau nạp và rửa;

- iii) lượng phần tử gắn kết hóa trị một ở đỉnh một 4 giờ sau nạp và rửa;
- iv) lượng phần tử gắn kết hóa trị một trong tế bào (bằng cách làm tan tế bào) 0 giờ và 4 giờ sau khi nạp và rửa;
- v) tổng lượng phần tử gắn kết hóa trị một 0 giờ và 4 giờ sau khi nạp và rửa.

Để thích hợp làm phần tử gắn kết hóa trị một trong mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não như được báo cáo trong bản mô tả, kháng thể của thụ thể kháng transferrin (ví dụ, như phần tử gắn kết hóa trị một) phải i) được hấp thụ bằng tế bào hCMEC/D3 (nhập bào), ii) được vận chuyển bên ngoài tế bào hCMEC/D3 (xuất bào), và iii) ổn định bên trong tế bào hCMEC/D3 (không vận chuyển hoặc vận chuyển ở mức thấp đến endosom dễ biến chất).

Vì vậy, theo một phương án, phần tử gắn kết hóa trị một được đặc trưng trong thử nghiệm dựa trên hCMEC/D3 bằng i) hấp thụ (cơ bản) vào tế bào hCMEC/D3 trong giai đoạn nạp một giờ, ii) giải phóng vào đỉnh và/hoặc khoang đáy bên sau giai đoạn nạp và bước rửa trong 4 giờ sau khi rửa, và iii) tốc độ biến tính (nội bào) thấp.

Theo một phương án, việc nạp là ở nồng độ khoảng 2,67 μ g/mL phần tử gắn kết hóa trị một trong một giờ.

Đã phát hiện ra rằng, phần tử gắn kết hóa trị một để thích hợp làm phần tử gắn kết hóa trị một của mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não như được báo cáo trong bản mô tả phải thể hiện trong thử nghiệm dựa trên hCMEC/D3 được mô tả trên đây các giá trị ngưỡng sau:

- i) lượng phần tử gắn kết hóa trị một được hấp thụ vào tế bào trong pha nạp 400pg hoặc nhiều hơn,
- ii) lượng phần tử gắn kết hóa trị một ở đáy bên 4 giờ sau nạp và rửa 100pg hoặc nhiều hơn, và
- iii) lượng phần tử gắn kết hóa trị một ở đỉnh một 4 giờ sau nạp và rửa 150pg hoặc nhiều hơn.

Kháng thể ở chuột kháng thụ thể transferrin ở người 128,1 (đối với trình tự vùng biến đổi, xem WO 93/10819 và SEQ ID NO: 64 và 65) có thể được chọn để tham khảo. Trong trường hợp này, phần tử gắn kết hóa trị một để thích hợp làm phần tử gắn kết hóa

trị một của mô-đun vận chuyển hàng rào máu-não như được báo cáo trong bản mô tả phải thể hiện trong thử nghiệm dựa trên hCMEC/D3 được mô tả trên đây các giá trị ngưỡng sau:

- i) lượng phần tử gắn kết hóa trị một được hấp thụ vào tế bào trong pha nạp lượng nạp kháng thể 128,1 bằng 60% hoặc nhiều hơn,
- ii) lượng phần tử gắn kết hóa trị một ở đáy bên 4 giờ sau nạp và rửa bằng 60% lượng kháng thể 128,1 ở đáy bên hoặc nhiều hơn; và
- iii) lượng phần tử gắn kết hóa trị một ở đỉnh 4 giờ sau nạp và rửa bằng 60% lượng kháng thể 128,1 ở đỉnh hoặc nhiều hơn.

Thử nghiệm dựa trên hCMEC/D3 có thể được thực hiện như sau (đây là một phương án theo tất cả các khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả):

Môi trường và các thành phần bổ sung cho hCMEC/D3 (xem WO 2006/056879 và Weksler, B.B., et al., FASEB J. 19 (2005) 1872-1874) có thể thu được từ Lonza. Các tế bào hCMEC/D3 (cấy chuyển 26-29) được/có thể được nuôi cấy để hợp dòng trên lá kính đáy (hiên vi) được phủ collagen hoặc bình được phủ collagen trong môi trường EBM2 chứa FBS 2,5%, một phần tư các yếu tố sinh trưởng được cung cấp và được bổ sung đầy đủ được cung cấp hydrocortison, gentamycin và axit ascorbic.

Đối với tất cả các thử nghiệm chuyển bào, thiết bị giải bộ lọc màng PET mật độ lỗ cao (1×10^8 lỗ/cm²) (cỡ lỗ 0,4μm, đường kính 12mm) được/có thể được sử dụng trong đĩa nuôi cấy tế bào có 12 giếng. Thể tích môi trường được tính là 400μL và 1600μL đối với khoang đỉnh và khoang đáy bên, một cách tương ứng. Khoang đỉnh của thiết bị giải bộ lọc được/có thể được phủ bằng collagen đuôi chuột công I (7,5μg/cm²) sau đó là fibronectin (5μg/mL), mỗi lần ủ kéo dài một giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các tế bào hCMEC/D3 được/có thể phát triển thành các lớp đơn hợp dòng ($\sim 2 \times 10^5$ tế bào/cm²) trong thời gian từ 10 đến 12 ngày trong môi trường EBM2. Các bộ lọc rỗng được/có thể được phong bế trong PBS chứa BSA 1% trong 1 giờ hoặc qua đêm (o/n) trước thử nghiệm và sau đó được hiệu chuẩn trong ít nhất 1 giờ trong EBM2 trước thử nghiệm.

Thử nghiệm (đối với sơ đồ thử nghiệm, xem Fig.1) được thực hiện trong môi trường EBM2 không chứa huyết thanh mà được hoàn nguyên như được mô tả trong bản mô tả. Vào ngày thử nghiệm, các tế bào được để thiếu huyết thanh trong 60 phút để làm

tiêu phối tử tự nhiên của thụ thể hàng rào máu não đang quan tâm. Thiết bị gài bộ lọc có hoặc không có các tế bào (nhưng được phong bế qua đêm trong môi trường hoàn thiện) được ủ ở đỉnh với kháng thể đơn dòng đang quan tâm (phần tử gắn kết hóa trị một) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các lớp đơn được rửa ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong môi trường không chứa huyết thanh ở đỉnh (400µL) và đáy bên (1600µL) ba lần trong thời gian từ 3 đến 5 phút mỗi nơi. Môi trường được làm ấm từ trước được bổ sung vào khoang đỉnh và bộ lọc được chuyển đến đĩa 12 giếng mới (được phong bế qua đêm với PBS chứa BSA 1%) chứa 1600µL môi trường được làm ấm từ trước. Tại thời điểm này, bộ lọc có hoặc không có tế bào được dung giải trong 500µL chất đệm RIPA để xác định mức hấp thụ kháng thể (phần tử gắn kết hóa trị một) cụ thể. Bộ lọc còn lại được ủ ở nhiệt độ 37°C hoặc ở nhiệt độ 4°C và các mẫu được gom ở các thời điểm khác nhau để xác định lượng giải phóng của kháng thể (phần tử gắn kết hóa trị một) ở đỉnh và/hoặc đáy bên. Hàm lượng kháng thể trong các mẫu có thể được định lượng bằng cách sử dụng ELISA IgG độ nhạy cao (xem Ví dụ 9). Đối với từng thời điểm, dữ liệu nên được tạo ra từ hai bộ lọc rỗng và ba môi trường nuôi cấy tế bào lọc.

C. Phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm tái tổ hợp

Kháng thể có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong US 4,816,567. Theo một phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic đã phân lập mã hóa kháng thể của thụ thể kháng transferrin được mô tả ở đây. 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 một phương án khác, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vector (ví dụ, vector biểu hiện) chứa axit nucleic này. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ chứa axit nucleic này. Theo một phương án như vậy, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ chứa (ví dụ, đã được biến nạp với): (1) vector 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) vector thứ nhất chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và vector thứ hai chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào vật chủ là nhân chuẩn, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào bạch huyết (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể của thụ thể kháng transferrin,

trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, như được đề xuất trên đây, trong các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện của kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào vật chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào vật chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể của thụ thể kháng transferrin, axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như được mô tả trên đây, được phân lập và được xen vào một hoặc nhiều vector để tách dòng thêm và/hoặc biểu hiện trong tế bào vật chủ. Axit nucleic này có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng đầu dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào vật chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện vector mã hóa kháng thể chứa các tế bào nhân rải rác hoặc nhân chuẩn được mô tả trong bản mô tả. Ví dụ, kháng thể có thể được sản xuất trong vi khuẩn, đặc biệt là khi sự glycosyl hóa và chức năng tác động Fc là không cần thiết. Để biểu hiện mảnh kháng thể và polypeptit trong vi khuẩn, xem, ví dụ, US 5,648,237, US 5,789,199, và US 5,840,523. (xem cả trong Charlton, K.A., trong tài liệu: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, mô tả việc biểu hiện các mảnh kháng thể trong *E. coli*.) Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ hồ nhão chứa tế bào vi khuẩn trong phần dễ hòa tan và có thể được tinh sạch thêm.

Ngoài tế bào nhân rải rác, các vi trùng nhân chuẩn như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho vector mã hóa kháng thể, bao gồm chủng nấm và nấm men có con đường glycosyl hóa đã “được làm giống như của người,” dẫn đến sự sản xuất kháng thể với mô hình glycosyl hóa người một phần hoặc hoàn toàn. Xem Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; và Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Các tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hóa cũng có nguồn gốc từ sinh vật đa bào (động vật không có xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào động vật không có xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirus đã được nhận biết có thể được sử dụng liên hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Môi trường nuôi 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 sản xuất kháng thể trong thực vật chuyển gen).

Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được làm thích nghi để sinh trưởng trong huyền phù có thể hữu ích. Các ví dụ khác nhau về dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng thận phôi người (tế bào 293 hoặc 293 như được mô tả trong, ví dụ, Graham, F.L. et al., J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); tế bào thận chuột lang con (BHK); tế bào sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả trong, ví dụ, Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận chó khỉ lông xanh Châu Phi (VERO-76); tế bào caxinom cổ người (HELA); tế bào thận chó (MDCK); tế bào gan chuột bạch (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 trong, ví dụ, 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 chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (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 có nhận xét về một số dòng tế bào chủ động vật có vú nhất định thích hợp để sản xuất, xem, ví dụ, Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

D. Thử nghiệm

Kháng thể của thụ thể kháng transferrin được đề xuất trong bản mô tả có thể được nhận biết, được sàng lọc, hoặc được đặc trưng về tính chất lý/hóa và/hoặc hoạt tính sinh học của chúng bởi các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực này.

1. Thử nghiệm gắn kết

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính gắn kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, alphaLISA, thẩm tách Western, dãy kháng thể hoặc dãy pha đảo, v.v.

Trong thử nghiệm ELISA hoặc alphaLISA lấy làm ví dụ, thụ thể transferrin trong dung dịch (phân dịch nổi trên bề mặt tế bào, dịch làm tan tế bào hoặc mô, dịch thể v.v.)

được gắn kết bằng kháng thể bất, gắn kết đặc hiệu với epitop thứ nhất trên thụ thể transferrin, hoặc thụ thể transferrin ở cấu dạng nhất định và kháng thể dò được kết hợp với phần tử dò, gắn kết đặc hiệu với epitop thứ hai hoặc cấu dạng của thụ thể transferrin. Kết quả dựa trên phần tử dò (phát quang hóa học, huỳnh quang, phát quang do truyền năng lượng v.v.).

Trong trường hợp dãy kháng thể, các kháng thể được đặt trên chip thủy tinh hoặc nitroxenluloza. Các phim dương bản được phong bế và được ủ với dung dịch chứa thụ thể transferrin, được rửa để loại bỏ các kháng thể không gắn kết và các kháng thể gắn kết được phát hiện ra bằng kháng thể thứ cấp tương ứng được đánh dấu huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang được đo bằng thiết bị quét phim dương bản huỳnh quang. Tương tự đối với dãy pha đảo, thụ thể transferrin tái tổ hợp, phần dịch nổi trên bề mặt tế bào, dịch làm tan tế bào hoặc mô, dịch thể v.v. được đặt trên chip thủy tinh hoặc nitroxenluloza. Phim dương bản được phong bế và các dãy riêng lẻ được ủ với kháng thể kháng epitop đặc hiệu trên thụ thể transferrin. Các kháng thể không gắn kết được rửa sạch và các kháng thể gắn kết được phát hiện ra bằng kháng thể thứ cấp tương ứng được đánh dấu huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang được đo bằng thiết bị quét phim dương bản huỳnh quang (Dernick, G., et al., J. Lipid Res. 52 (2011) 2323-2331).

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

Theo một số phương án, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể của thụ thể kháng transferrin được đề xuất trong bản mô tả là hữu ích để phát hiện sự có mặt của thụ thể transferrin ở người trong mẫu sinh học. Thuật ngữ “phát hiện” như được sử dụng trong bản mô tả bao gồm phát hiện về số lượng hoặc chất lượng. Theo một số phương án, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô, như mô não.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể của thụ thể kháng transferrin để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của thụ thể transferrin trong mẫu sinh học. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể của thụ thể kháng transferrin như được mô tả trong bản mô tả trong các điều kiện cho phép kháng thể của thụ thể kháng transferrin gắn kết với thụ thể transferrin, và phát hiện liệu có tạo ra phức hợp giữa kháng thể của thụ thể kháng transferrin và thụ thể transferrin hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*.

Theo một phương án, kháng thể của thụ thể kháng transferrin được sử dụng để chọn lọc các đối tượng thích hợp cho liệu pháp với kháng thể của thụ thể kháng transferrin, ví dụ, khi thụ thể transferrin là chỉ thị sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Các rối loạn lấy làm ví dụ mà có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế bao gồm thoái hóa thần kinh với hiện tượng tích tụ sắt trong não typ 1 (NBIA1), rối loạn thần kinh tự động đơn thuần, hội chứng Down, bệnh lý phức hợp Guam, và một vài rối loạn thể Lewy, như bệnh thể Lewy lan tỏa (DLBD), biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), một số dạng của bệnh Gaucher, và sa sút trí tuệ do bệnh Parkinson (PDD).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể của thụ thể kháng transferrin được đánh dấu. Chất đánh dấu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đánh dấu hoặc gốc được phát hiện trực tiếp (như chất đánh dấu huỳnh quang, mang màu, dày electron, phát quang hóa học, và hoạt tính phóng xạ), cũng như các gốc, như enzym hoặc phối tử, được phát hiện gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hóa hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng vị phóng xạ ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , và ^{131}I , chất huỳnh quang như chelat đất hiếm hoặc fluorescein và các dẫn xuất của nó, rodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbeliferon, luxiferaza, ví dụ, luxiferaza đom đóm và luxiferaza vi khuẩn (US 4,737,456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza hồi hải mã (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 xanthin oxidaza, được kết hợp với enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất nhuộm như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, chất đánh dấu xoay, chất đánh dấu thực khuẩn thể, gốc tự do ổn định, và dạng tương tự.

F. Dược phẩm

Dược phẩm chứa kháng thể của thụ thể kháng transferrin như được mô tả trong bản mô tả được bào chế bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn như vậy với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)), dưới dạng chế phẩm được làm khô lạnh hoặc dung dịch nước. Chất mang dược dụng thường không độc đối với đối tượng nhận ở các 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 dimethylbenzyl amoni clorua; hexameton clorua; benzalkoni clorua; benzetoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catecol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như poly(vinylpyrrolidon); axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất chelat hóa như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion trái dấu 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 được dùng lấy làm ví dụ trong bản mô tả còn bao gồm chất phân tán được chất trong kẽ như hyaluronidaza glycoprotein hoạt tính trung hòa dễ tan (sHASEGP), ví dụ, hyaluronidaza glycoprotein dễ tan của người có độ PH = 20, như rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Một số sHASEGP 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.

Chế phẩm kháng thể được làm khô lạnh ví dụ được mô tả trong US 6,267,958. Chế phẩm kháng thể chứa nước bao gồm các chế phẩm được mô tả trong US 6,171,586 và WO 2006/044908, chế phẩm nêu trong WO 2006/044908 còn bao gồm chất đệm histidin-axetat.

Chế phẩm trong bản mô tả cũng có thể chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính nếu cần đối với chỉ định được điều trị cụ thể, tốt hơn là các thành phần có hoạt tính bổ sung mà không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Các thành phần hoạt tính này có mặt một cách thích hợp trong tổ hợp với lượng hữu hiệu đối với mục đích được dự định.

Các thành phần hoạt tính có thể được bày trong vi nang được điều chế, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, hydroxymethylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metyl metacrylat), một cách tương ứng, trong hệ phân bố được chất dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin,

vi nhũ tương, hạt nano và nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980).

Chế phẩm giải phóng duy trì có thể được điều chế. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm hỗn hợp bán thấm của polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, hỗn hợp này có dạng các vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc vi nang.

Chế phẩm được sử dụng để dùng *in vivo* thường vô trùng. Tính vô trùng có thể có được một cách dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua bộ lọc màng vô trùng.

G. Phương pháp trị liệu và chế phẩm điều trị

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng Tfr được đề xuất trong bản mô tả có thể được sử dụng trong phương pháp trị liệu. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Tfr để sử dụng làm thuốc. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp vận chuyển hợp chất trị liệu qua hàng rào máu-não bao gồm bước cho kháng thể kháng Tfr được kết hợp với hợp chất trị liệu (ví dụ, kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết cả Tfr và kháng nguyên não) tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển hợp chất trị liệu được ghép cặp với nó qua BBB. Trong một ví dụ khác, sáng chế đề xuất phương pháp vận chuyển thuốc rối loạn thần kinh qua hàng rào máu-não bao gồm bước cho kháng thể kháng Tfr theo sáng chế được kết hợp với thuốc điều trị rối loạn ở não (ví dụ, kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết cả Tfr và kháng nguyên não) tiếp xúc với BBB sao cho kháng thể này vận chuyển thuốc rối loạn thần kinh được ghép cặp với nó qua BBB. Theo một phương án, BBB là ở động vật có vú (ví dụ, người), ví dụ, đối tượng có rối loạn thần kinh, bao gồm, nhưng không giới hạn: bệnh Alzheimer (AD), đột quỵ, sa sút trí tuệ, bệnh teo cơ (MD), bệnh xơ cứng rải rác (MS), bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh xơ nang, hội chứng Angelman, hội chứng Liddle, bệnh Parkinson, bệnh Pick, bệnh Paget, bệnh ung thư, tổn thương não do chấn thương, v.v. Theo một phương án, rối loạn thần kinh được chọn từ: bệnh thần kinh, chứng thoái hóa dạng tinh bột, bệnh ung thư (ví dụ, liên quan đến CNS hoặc não), bệnh mắt hoặc rối loạn ở mắt, bệnh nhiễm virus hoặc vi trùng, bệnh viêm (ví dụ, của CNS hoặc não), chứng thiếu máu cục bộ, bệnh thoái hóa thần kinh, co giật, rối loạn hành vi, rối loạn tích lũy lysosom, v.v. Kháng thể theo sáng chế đặc biệt thích hợp để điều trị các rối loạn thần kinh như vậy do khả năng của chúng trong việc vận chuyển một hoặc nhiều thành phần hoạt tính kết hợp/hợp chất trị liệu ghép cặp qua BBB và vào CNS/não nơi mà các rối loạn đó tìm thấy cơ sở phân tử, tế

bào, hoặc virus/vi khuẩn của chúng. Rối loạn bệnh thần kinh là các bệnh hoặc bất thường của hệ thần kinh được đặc trưng bởi sự truyền tín hiệu thần kinh không thích hợp hoặc mất kiểm soát hoặc thiếu các tín hiệu, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cơn đau mạn tính (bao gồm cảm thụ đau), đau do tổn thương các mô cơ thể gây ra, bao gồm đau do ung thư, đau do bệnh thần kinh (đau do các bất thường trong dây thần kinh, tủy sống, hoặc não gây ra), và đau do tâm lý (liên quan hoàn toàn hoặc gần như hoàn toàn với rối loạn tâm lý), đau đầu, đau nửa đầu, bệnh thần kinh, và các triệu chứng và hội chứng thường đi kèm các rối loạn bệnh thần kinh này như chóng mặt hoặc buồn nôn.

Đối với rối loạn bệnh thần kinh, dược chất thần kinh có thể được chọn lọc là thuốc giảm đau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc giảm đau dạng gây mê/thuốc phiện (tức là, morphin, fentanyl, hydrocodon, meperidin, metadon, oxymorphon, pentazoxin, propoxyphen, tramadol, codein và oxycodon), thuốc kháng viêm không steroid (NSAID) (tức là, ibuprofen, naproxen, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, flurbiprofen, indometaxin, ketorolac, axit mefenamic, meloxicam, nabumeton, oxaprozin, piroxicam, sulindac, và tolmetin), corticosteroid (tức là, cortison, prednison, prednisolon, dexametason, methylprednisolon và triamxinolon), chất chống đau nửa đầu (tức là, sumatriptan, almotriptan, frovatriptan, sumatriptan, rizatriptan, eletriptan, zolmitriptan, dihydroergotamin, eletriptan và ergotamin), axetaminophen, salixylat (tức là, aspirin, cholin salixylat, magie salixylat, diflunisal, và salsalat), chất chống co giật (tức là, carbamazepin, clonazepam, gabapentin, lamotrigin, pregabalin, tiagabin, và topiramet), chất gây mê (tức là, isofluran, tricloetylen, halotan, sevofluran, benzocain, cloprocain, cocain, xylometycain, dimetocain, propoxycain, procain, novocain, proparacain, tetracain, articain, bupivacain, carticain, xinchocain, etidocain, levobupivacain, lidocain, mepivacain, piperocain, prilocain, ropivacain, trimecain, saxitoxin và tetrodotoxin), và chất ức chế cox-2 (tức là, celecoxib, rofecoxib, và valdecoxib). Đối với rối loạn bệnh thần kinh bao gồm cả chứng chóng mặt, dược chất thần kinh có thể được chọn lọc là chất chống chóng mặt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, meclizin, diphenhydramin, prometazin và diazepam. Đối với rối loạn bệnh thần kinh bao gồm cả chứng buồn nôn, dược chất thần kinh có thể được chọn lọc là chất chống buồn nôn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, promethazin, clorpromazin, prochlorperazin, trimetobenzamit, và metoclopramit.

Bệnh thoái hóa dòng tủy là nhóm các bệnh và rối loạn liên quan đến sự tích tụ protein ngoại bào trong CNS, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chứng thoái hóa dạng tinh bột thứ phát, chứng thoái hóa dạng tinh bột do tuổi tác, bệnh Alzheimer (AD), chứng suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, xuất huyết não di truyền với chứng thoái hóa dạng tinh bột (kiểu Dutch); sa sút trí tuệ Guam Parkinson phức hợp, bệnh động mạch não dạng tinh bột, bệnh Huntington, bệnh liệt trên nhân tiền triền, chứng bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, bệnh tích nhũn não truyền nhiễm, chứng sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (ALS), bệnh viêm cơ thể vùi (IBM), và các bệnh mắt liên quan đến tích tụ beta-tinh bột (tức là, thoái hóa điểm vàng, bệnh thần kinh thị giác liên quan đến mảng kết tụ màu vàng drusen, và đục thủy tinh thể).

Đối với chứng thoái hóa dạng tinh bột, được chất thần kinh có thể được chọn lọc mà bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể hoặc phân tử gắn kết khác (bao gồm, nhưng không giới hạn ở phân tử nhỏ, peptit, aptame, hoặc chất gắn kết protein khác) mà gắn kết đặc hiệu với đích được chọn từ: beta secretaza, tau, presenilin, protein tiền chất dạng tinh bột hoặc các phần của nó, peptit beta dạng tinh bột hoặc oligome hoặc các sợi của nó, thụ thể chết 6 (DR6), thụ thể dùng cho thành phẩm glycat hóa bền vững (RAGE), parkin, và huntingtin; chất ức chế cholinesteraza (tức là, galantamin, donepezil, rivastigmin và tacrin); chất đối kháng của thụ thể NMDA (tức là, memantin), chất làm tiêu monoamin (tức là, tetrabenazin); ergoloit mesylat; chất chống parkinson kháng tiết cholin (tức là, proxycyclidin, diphenhydramin, trihexylphenidyl, benztropin, biperiden và trihexyphenidyl); chất chống parkinson tiết dopamin (tức là, entacapon, selegilin, pramipexol, bromocriptin, rotigotin, selegilin, ropinirol, rasagilin, apomorphin, carbidopa, levodopa, pergolit, tolcapon và amantadin); tetrabenazin; chất kháng viêm (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuốc kháng viêm không steroid (tức là, indomethixin và các hợp chất khác được liệt kê trên đây); hormon (tức là, estrogen, progesteron và leuprolit); vitamin (tức là, folat và nicotinamit); dimebolin; homotaurin (tức là, axit 3-aminopropansulfonic; 3APS); chất điều biến hoạt tính của thụ thể serotonin (tức là, xaliproden); interferon, và glucocorticoid.

Bệnh ung thư ở CNS được đặc trưng bởi sự tăng sinh bất thường của một hoặc nhiều tế bào CNS (tức là, tế bào thần kinh) và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, u thần

kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm đa dạng, u màng não, u bào hình sao, u dây thần kinh thính giác, bướu sụn, u thần kinh đệm ít nhánh, u nguyên bào tủy, u hạch thần kinh đệm, u thần kinh tiền đình, u xơ thần kinh, u nguyên bào thần kinh, và u ngoài màng ừng, trong tủy sống, trong màng cứng hoặc di căn CNS của các u ngoài biên như bệnh ung thư dương tính với CD20 hoặc HER2.

Đối với bệnh ung thư, dược chất thần kinh có thể được chọn lọc là chất hóa trị.

Các ví dụ về chất hóa trị bao gồm chất alkyl hóa như thiotepa và CYTOXAN® xyclophosphamid; alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, triethiylentiophosphoramit và trimetylolomelamin; axetogenin (đặc biệt là bulataxin và bulataxinon); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachon; lapachol; colchixin; axit betulinic; camptotexin (bao gồm chất tương tự tổng hợp topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), axetylcamptothecin, scoplectin, và 9-aminocamptothecin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (bao gồm chất tương tự tổng hợp adozelesin, carzelesin và bizelesin của nó); podophyllotoxin; axit podophylinic; teniposit; cryptophyxin (đặc biệt là cryptophyxin 1 và cryptophyxin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; hơi cay nitơ như clorambuxil, clornaphazin, cholophosphamid, estramustin, ifosfamid, mecloretamin, mecloretamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, hơi cay uraxil; nitrosure như carmustin, clozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranimnustin; chất kháng sinh như kháng sinh enediyn (ví dụ, calicheamixin, đặc biệt là calicheamixin gamaII và calicheamixin omegaII (xem, ví dụ, Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33 (1994) 183-186); dynemixin, bao gồm dynemixin A; esperamixin; cũng như chất mang màu neocarzinostatin và các chất mang màu kháng sinh enediyn protein nhiễm sắc liên quan), aclacinomysin, actinomycin, authramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, carabixin, carminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, ADRIAMYXIN® doxorubixin (bao gồm morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrolino-doxorubixin và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marxelomycin,

mitomycin như mitomycin C, axit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tubexidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; chất chống chuyển hóa như metotrexat và 5-flouraxil (5-FU); chất tương tự axit folic như denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; chất tương tự pyrimidin như anxitabin, azaxitidin, 6-25 azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; chất kháng thượng thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất vận chuyển axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziqun; elfornithin; eliptinium axetat; epothilon; etogluxit; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidainin; maytansinoit như maytansin và ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; 2-etylhydrazit; procarbazin; phức hợp PSK® polysacarit (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziqun; 2,2',2''-trichlorotrietylamin; trichothexen (đặc biệt là T-2 toxin, veracurin A, roridin A và anguidin); uretan; vindesin (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; 5 pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); thiotepa; taxoit, ví dụ, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers-Squibb Oncology, Princeton, N.J.), chế phẩm hạt nano được xử lý bằng albumin, không chứa Cremophor ABRAXANETM của paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), và TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); cloranbuxil; gemcitabin (GEMZAR®); 6-thioguanin; mercaptopurin; metotrexat; chất tương tự bạch kim như xisplatin và carboplatin; vinblastin (VELBAN®); bạch kim; etoposit (VP-16); ifosfamid; mitoxantron; vincristin (ONCOVIN®); oxaliplatin; leucovorin; vinorelbin (NAVELBINE®); novantron; edatrexat; daunomycin; aminopterin; ibandronat; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); retinoit như axit retinoic; capecitabin (XELODA®); muối, axit được dùng hoặc dẫn xuất của hợp chất bất kỳ trên đây; cũng như hỗn hợp của hai hoặc nhiều hợp chất trên đây như CHOP, viết tắt cho liệu pháp kết hợp giữa cyclophosphamid, doxorubixin, vincristin, và prednisolon, và

FOLFOX, viết tắt cho chế độ điều trị với oxaliplatin (ELOXATIN™) kết hợp với 5-FU và leucovorin.

Cũng được bao gồm trong định nghĩa về chất hóa trị này là chất kháng hormon tác động để điều hòa, làm giảm, phong bế, hoặc ức chế các tác dụng của hormon mà có thể thúc đẩy sự phát triển bệnh ung thư, và thường là dưới dạng điều trị toàn thân hoặc điều trị toàn cơ thể. Bản thân chúng có thể là hormon. Các ví dụ bao gồm kháng estrogen và chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (SERM), bao gồm, ví dụ, tamoxifen (bao gồm NOLVADEX® tamoxifen), EVISTA® raloxifen, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và FARESTON® toremifen; kháng progesteron; chất điều hòa giảm thụ thể estrogen (ERDs); chất có chức năng ức chế hoặc đóng buồng trứng, ví dụ, chất chủ vận hormon giải phóng hormon leutinizing (LHRH) như LUPRON® và ELIGARD® leuprolit axetat, goserelin axetat, buserelin axetat và triptorelin; các kháng androgen khác như flutamil, nilutamit và bicalutamit; và chất ức chế aromataza mà ức chế enzym aromataza, điều hòa sự sản sinh estrogen trong tuyến thượng thận, như, ví dụ, 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, MEGASE® megestrol axetat, AROMASIN® exemestan, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, và ARIMITX® anastrozol. Ngoài ra, định nghĩa về chất hóa trị này còn bao gồm bisphosphonat như clodronat (ví dụ, BONEFOS® hoặc OSTAC®), DIDROCAL® etidronat, NE-58095, ZOMETA® axit zoledronic/zoledronat, FOSAMAX® alendronat, AREDIA® pamidronat, 5 SKELID® tiludronat, hoặc ACTONL® risedronat; cũng như troxacitabin (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); oligonucleotit đối nghĩa, đặc biệt là các chất ức chế sự biểu hiện của gen trong con đường truyền tín hiệu liên quan đến sự tăng sinh tế bào bất thường, như, ví dụ, PKC-alpha, Raf, H-Ras, và thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGF-R); vắc xin như vắc xin THERATOPE® và vắc xin liệu pháp trong gen, ví dụ, vắc xin ALLOVECTIN®, vắc xin LEUVECTIN®, và vắc xin VAXID®; chất ức chế LURTOTECAN® topoisomeraza 1; ABARELIX® rmRH; lapatinib ditosylat (chất ức chế phân tử nhỏ ErbB-2 và EGFR kép tyrosin kinaza còn được biết đến là GW572016); và muối được dụng, axit được dụng hoặc dẫn xuất của hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất trên đây.

Một nhóm hợp chất khác mà có thể được chọn lọc làm được chất thần kinh để điều trị hoặc ngăn ngừa ung thư là các globulin miễn dịch chống ung thư (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab, alemtuzumab, cetuximab, gemtuzumab ozogamixin, ibritumomab tiuxetan, panitumumab và rituximab). Trong một số trường hợp, kháng thể liên hợp với chất đánh dấu hoặc thể liên hợp độc có thể được sử dụng để hướng đích và tiêu diệt các tế bào mong muốn (tức là, tế bào ung thư), bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tositumomab với chất đánh dấu phóng xạ ^{131}I , hoặc trastuzumab emtansin.

Bệnh mắt hoặc rối loạn ở mắt là các bệnh hoặc rối loạn của mắt, nhằm các mục đích trong bản mô tả, được coi là cơ quan CNS được cô lập bởi BBB. Bệnh mắt hoặc rối loạn ở mắt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, rối loạn màng cứng, giác mạc, mống mắt và nếp mi (tức là, viêm màng cứng, viêm giác mạc, loét giác mạc, chột giác mạc, chói tuyết, cung mắt, viêm giác mạc có lỗ cận Thygeson, hình thành mạch máu giác mạc, bệnh loạn dưỡng Fuchs, loạn dưỡng giác mạc hình chớp, viêm kết-giác mạc khô, viêm mống mắt và viêm màng bồ đào), rối loạn thị kính (tức là, đục thủy tinh thể), rối loạn màng trạch và võng mạc (tức là, bong võng mạc, tách võng mạc bẩm sinh, bệnh võng mạc do cao huyết áp, bệnh võng mạc do tiểu đường, bệnh võng mạc, bệnh võng mạc ở trẻ sinh non, thoái hóa điểm vàng do tuổi tác, thoái hóa điểm vàng (ướt hoặc khô), màng trên võng mạc, viêm võng mạc sắc tố và phù điểm vàng võng mạc), glôcôm, chứng ruồi bay, rối loạn dây thần kinh thị giác và đường nhìn (tức là, bệnh thần kinh thị giác di truyền Leber và bất thường ở đầu thần kinh thị giác), rối loạn điều tiết/khúc xạ của cơ mắt/dịch chuyển hai mắt (tức là, tật lác ngoài, liệt cơ mắt, liệt mắt cơ ngoài tiến triển, tật lác trong, tật lé mắt, viễn thị, cận thị, loạn thị, tật chiết quang mắt không đều, lão thị và liệt cơ mắt), rối loạn thị lực và mù (tức là, nhược thị, mù bẩm sinh Lever, ám điểm, mù màu, mù màu sắc, quáng gà, mù, mù sông (river blindness) và viêm mắt/khuyết tật nhỏ), mắt đỏ, đồng tử Argyll Robertson, nấm giác mạc, khô mắt và tật không mống mắt.

Đối với bệnh mắt hoặc rối loạn ở mắt, được chất thần kinh có thể được chọn lọc là chất điều trị chống hình thành mạch ở mắt (tức là, bevacizumab, ranibizumab và pegaptanib), chất điều trị glôcôm ở mắt (tức là, carbachol, epinphrin, demecarium bromua, apraclonidin, brimonidin, brinzolamit, levobunolol, timolol, betaxolol, dorzolamit, bimatoprost, carteolol, metipranolol, dipivefrin, travoprost và latanoprost),

chất ức chế carbonic anhydrase (tức là, methazolamit và acetazolamit), thuốc chống histamin chữa mắt (tức là, naphazolin, phenylephrin và tetrahydrozolin), chất bôi trơn mắt, steroid chữa mắt (tức là, flometholon, prednisolon, loteprednol, dexametason, difluprednat, rimexolon, fluoxinolon, medrysone và triamcinolon), chất chữa đau mắt (tức là, lidocain, proparacain và tetracain), chất chống nhiễm trùng mắt (tức là, levofloxacin, gatifloxacin, ciprofloxacin, moxifloxacin, chloramphenicol, bacitracin/polymyxin B, sulfacetamid, tobramycin, azithromycin, besifloxacin, norfloxacin, sulfisoxazol, gentamycin, idoxuridin, erythromycin, natamycin, gramixidin, neomycin, ofloxacin, trifluridin, ganciclovir, vidarabin), chất chống viêm mắt (tức là, nepafenac, ketorolac, flurbiprofen, suprofen, cyclosporin, triamcinolon, diclofenac và bromfenac), và chất kháng histamin hoặc chống sung huyết mắt (tức là, ketotifen, olopatadin, epinastin, naphazolin, cromolyn, tetrahydrozolin, pemirolast, bepotastin, naphazolin, phenylephrin, nedocromil, lodoxamid, phenylephrin, emedastin và azelastin).

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

Đối với bệnh virus hoặc vi khuẩn, dược chất thần kinh có thể được chọn lọc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hợp chất kháng virus (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, adamantan kháng viruta (tức là, rimantadin và amantadin), interferon kháng virus (tức là, peg-interferon alfa-2b), chất đối kháng của thụ thể chemokin (tức là, maraviroc), chất ức chế vận chuyển chuỗi integrase (tức là, raltegravir), chất ức chế neuraminidase (tức là, oseltamivir và zanamivir), chất ức chế transcriptase đảo không nucleosit (tức là, efavirenz, etravirin, delavirdin và nevirapin), chất ức chế transcriptase đảo nucleosit (tenofovir, abacavir, lamivudin, zidovudin, stavudin, entecavir, emtricitabin, adefovir, zalcitabin, telbivudin và didanosin), chất ức chế protease (tức là, darunavir, atazanavir,

fosamprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir và saquinavir), purin nucleosit (tức là, valacyclovir, famciclovir, axyclovir, ribavirin, ganciclovir, valganciclovir và cidofovir), và hỗn hợp kháng virus (tức là, enfuvirtit, foscarnet, palivizumab và fomivirsen)), kháng sinh (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, aminopenicilin (tức là, amoxicilin, ampicilin, oxacilin, nafcilin, cloxacilin, dicloxacilin, flucoxacin, temoxilin, azloxilin, carbenicilin, ticarcilin, mezlocilin, piperacilin và bacampicilin), cephalosporin (tức là, cefazolin, cephalexin, cephalothin, cefamandol, ceftriaxon, cefotaxim, cefpodoxim, ceftazidim, cefadroxil, cephadrin, loracarbef, cefotetan, cefuroxim, cefprozil, cefaclor, và cefoxitin), carbapenem/penem (tức là, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem và doripenem), monobactam (tức là, aztreonam, tigemonam, norcardixin A và tabtoxinin-beta-lactam, chất ức chế betalactamaza (tức là, axit clavulanic, tazobactam và sulbactam) liên hợp với một kháng sinh beta-lactam khác, aminoglycosit (tức là, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, netilmicin, streptomycin, tobramycin, và paromomycin), ansamycin (tức là, geldanamycin và herbimycin), carbacephem (tức là, loracarbef), glycopeptit (tức là, teicoplanin và vancomycin), macrolit (tức là, azithromycin, clarithromycin, dirithromycin, erythromycin, roxithromycin, troleandomycin, telithromycin và spectinomycin), monobactam (tức là, aztreonam), quinolon (tức là, ciprofloxacin, enoxacin, gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, trovafloxacin, grepafloxacin, sparfloxacin và temafloxacin), sulfonamid (tức là, mafenit, sulfonamidochrysoidin, sulfacetamid, sulfadiazin, sulfamethizol, sulfanilamid, sulfasalazin, sulfisoxazol, trimethoprim, trimethoprim và sulfametoxazol), tetracyclin (tức là, tetracyclin, demeclocyclin, doxycyclin, minocyclin và oxytetracyclin), kháng sinh chống ung thư hoặc gây độc tế bào (tức là, doxorubicin, mitoxantron, bleomycin, daunorubicin, dactinomycin, epirubicin, idarubicin, plicamycin, mitomycin, pentostatin và valrubicin) và hợp chất kháng khuẩn pha tạp (tức là, bacitracin, colistin và polymyxin B)), chống nấm (tức là, metronidazol, nitazoxanil, tinidazol, cloquin, iodoquinol và paromomycin), và chống ký sinh trùng (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, quinin, cloquin, amodiaquin, pyrimetamin, sulphadoxin, proguanil, mefloquin, atovaquon, primaquin, artesinin, halofantrin, doxycyclin, clindamycin, mebendazol, pyrantel pamoat, thiabendazol, diethylcarbamazin, ivermectin, rifampin, amphotericin B, melarsoprol, efornithin và albendazol).

Bệnh viêm trong CNS bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh viêm do tổn thương CNS gây ra, mà có thể là tổn thương thể chất (tức là, do tai nạn, phẫu thuật, sang chấn não, tổn thương tủy sống, chấn động) và tổn thương do hoặc liên quan đến một hoặc nhiều bệnh hoặc rối loạn trong CNS khác (tức là, áp xe, bệnh ung thư, bệnh nhiễm virus hoặc vi trùng).

Đối với bệnh viêm CNS, được chất thần kinh có thể được chọn lọc mà tự điều trị được bệnh viêm (tức là, chất kháng viêm không steroid như ibuprofen hoặc naproxen), hoặc được chất điều trị các nguyên nhân cơ bản của bệnh viêm (tức là, chất kháng virus hoặc chống ung thư).

Chứng thiếu máu cục bộ của CNS, như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ nhóm rối loạn liên quan đến dòng máu bất thường hoặc hành vi mạch bất thường trong não hoặc các nguyên nhân gây ra hiện tượng đó, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chứng thiếu máu cục bộ khu trú não, chứng thiếu máu cục bộ toàn bộ não, đột quỵ (tức là, xuất huyết dưới màng não và xuất huyết trong não), và phình mạch.

Đối với chứng thiếu máu cục bộ, được chất thần kinh có thể được chọn lọc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất tan huyết (tức là, urokinaza, alteplaza, reteplaza và tenecteplaza), chất ức chế kết tụ tiểu cầu (tức là, aspirin, xilostazol, clopidogrel, prasugrel và dipyridamol), statin (tức là, lovastatin, pravastatin, fluvastatin, rosuvastatin, atorvastatin, simvastatin, xerivastatin và pitavastatin), và hợp chất để cải thiện tính linh hoạt của dòng máu hoặc mạch, bao gồm, ví dụ, các thuốc huyết áp.

Bệnh thoái hóa thần kinh là nhóm bệnh và rối loạn liên quan đến hiện tượng tế bào thần kinh mất chức năng hoặc chết trong CNS, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: loạn dưỡng não chất trắng thượng thận, bệnh Alexander, bệnh Alper, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, chứng mất điều hòa-giãn mạch, bệnh Batten, hội chứng cockayne, thoái hóa hạch nền-vỏ não, thoái hóa gây ra bởi hoặc liên quan đến chứng thoái hóa dạng tinh bột, chứng mất điều hòa Friedreich, thoái hóa thùy thái dương, bệnh Kennedy, bệnh teo đa hệ thống, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh teo cơ bên nguyên phát, bệnh liệt trên nhân tiền triển, bệnh teo cơ tủy sống, bệnh viêm tủy ngang, bệnh Refsum, và mất điều hòa tủy sống-tiểu não.

Đối với bệnh thoái hóa thần kinh, được chất thần kinh có thể được chọn lọc là hormon sinh trưởng hoặc yếu tố dinh dưỡng thần kinh; các ví dụ bao gồm, nhưng không

giới hạn ở, yếu tố dinh dưỡng thần kinh từ não (BDNF), yếu tố sinh trưởng dây thần kinh (NGF), neurotrophin-4/5, yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF)-2 và các FGF khác, neurotrophin (NT)-3, erythropoietin (EPO), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng biến nạp (TGF)-alpha, TGF-beta, yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (VEGF), chất đối kháng của thụ thể interleukin-1 (IL-1ra), yếu tố dinh dưỡng thần kinh mao mạch (CNTF), yếu tố dinh dưỡng thần kinh từ dây thần kinh đệm (GDNF), neurturin, yếu tố sinh trưởng từ tiểu cầu (PDGF), heregulin, neuregulin, artemin, persephin, interleukin, yếu tố dinh dưỡng thần kinh từ dòng tế bào thần kinh đệm (GFR), yếu tố kích thích cụm bạch cầu hạt (CSF), đại thực bào bạch cầu hạt-CSF, netrin, cardiotrophin-1, hedgehog, yếu tố ức chế bệnh bạch cầu (LIF), midkin, pleiotrophin, protein tạo hình xương (BMP), netrin, saposin, semaphorin, và yếu tố tế bào thân (SCF).

Bệnh co giật và các rối loạn của CNS bao gồm sự dẫn điện không thích hợp và/hoặc bất thường trong CNS, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở chứng động kinh (tức là, co giật vắng ý thức, co giật nhược cơ, động kinh Rolandic lành tính, vắng ý thức ở trẻ nhỏ, co giật gồng, co giật cục bộ phức tạp, động kinh thùy thái dương, sốt co giật, co giật ở trẻ bú mẹ, động kinh rung giật tuổi thiếu niên, động kinh vắng ý thức tuổi thiếu niên, hội chứng Lennox-Gastaut, hội chứng Landau-Kleffner, hội chứng Dravet, hội chứng Otahara, hội chứng West, động kinh múa giật, rối loạn ty thể, động kinh múa giật tiến triển, động kinh do tâm thần, động kinh phản xạ, hội chứng Rasmussen, co giật cục bộ đơn giản, co giật tổng thể hóa dạng thứ phát, động kinh thùy thái dương, co giật cơn lớn toàn thân, co giật co cứng, co giật tâm thần vận động, động kinh vùng rìa, co giật khởi phát cục bộ, động kinh khởi phát toàn bộ, động kinh liên tục, động kinh bùng, co giật mất vận động, co giật tự trị, rung giật hai bên nghiêm trọng, động kinh trong kỳ kinh nguyệt, co giật ngắt quãng, co giật do cảm xúc, co giật một ổ, co giật thể cười, Jacksonian March, bệnh Lafora, co giật vận động, co giật nhiều ổ, co giật về đêm, co giật nhạy quang, co giật giả, co giật giác quan, co giật khó phát hiện, co giật sylvan, co giật cai nghiện, và co giật phản xạ nhìn). Đối với rối loạn co giật, được chất thần kinh có thể được chọn lọc mà là chất chống co giật hoặc chống động kinh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống co giật barbiturat (tức là, primidon, metarbitol, mephobarbital, allobarbital, amobarbital, aprobarbital, alphenal, barbital, brallobarbital và phenobarbital), chất chống co giật benzodiazepin (tức là, diazepam, clonazepam, và

lorazepam), chất chống co giật carbamat (tức là felbamat), chất chống co giật ức chế carbonic anhydrase (tức là, acetazolamid, topiramat và zonisamid), chất chống co giật dibenzazepin (tức là, rufinamid, carbamazepin, và oxcarbazepin), chất chống co giật thu được từ axit béo (tức là, divalproex và axit valproic), chất tương tự axit gamma-aminobutyric (tức là, pregabalin, gabapentin và vigabatrin), chất ức chế tái hấp thụ axit gamma-aminobutyric (tức là, tiagabin), chất ức chế axit nobutyric transaminaza (tức là, vigabatrin), chất chống co giật hydantoin (tức là phenytoin, etoin, fosphenytoin và mephenytoin), chất chống co giật pha tạp (tức là, lacosamid và magie sulfat), progestin (tức là, progesteron), chất chống co giật oxazolidindion (tức là, parametadion và trimetadion), chất chống co giật pyrolidin (tức là, levetiracetam), chất chống co giật succinimit (tức là, ethosuximit và methsuximit), chất chống co giật triazin (tức là, lamotrigin), và chất chống co giật ure (tức là, phenaxemit và pheneturit).

Rối loạn hành vi là rối loạn của CNS được đặc trưng bởi hành vi bất thường ở phần đối tượng bị đau và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: rối loạn giấc ngủ (tức là, chứng mất ngủ, chứng mất ngủ giả, chứng kinh sợ ban đêm, rối loạn giấc ngủ theo nhịp độ hằng ngày, và chứng ngủ rũ), rối loạn tâm trạng (tức là, trầm cảm, trầm cảm tự sát, lo âu, rối loạn cảm xúc mạn tính, chứng ám ảnh sợ hãi, cơn hoảng loạn, rối loạn ám ảnh cưỡng chế, rối loạn tăng động giảm chú ý (ADHD), rối loạn giảm chú ý (ADD), hội chứng mệt mỏi mạn tính, chứng sợ khoảng trống, rối loạn tâm lý sau sang chấn, rối loạn lưỡng cực), rối loạn ăn uống (tức là, chán ăn hoặc ăn ói), rối loạn tâm thần, rối loạn hành vi phát triển (tức là, tự kỷ, hội chứng Rett, hội chứng Asperger), rối loạn nhân cách và rối loạn tâm thần (tức là, bệnh tâm thần phân liệt, rối loạn hoang tưởng, và dạng tương tự).

Đối với rối loạn hành vi, được chất thần kinh có thể được chọn từ hợp chất biến đổi hành vi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất chống loạn thần kinh không điển hình (tức là, risperidon, olanzapin, aripiprazol, quetiapin, paliperidon, asenapin, clozapin, iloperidon và ziprasidon), chất chống loạn thần kinh phenothiazin (tức là, prochlorperazin, clorpromazin, fluphenazin, perphenazin, trifluoperazin, thioridazin và mesoridazin), thioxanten (tức là, thiothixen), chất chống loạn thần kinh pha tạp (tức là, pimozit, lithi, molindon, haloperidol và loxapin), chất ức chế tái hấp thụ serotonin chọn lọc (tức là, xitalopram, escitalopram, paroxetin, fluoxetin và sertraline), chất ức chế tái

hấp thụ serotonin-norepinphrin (tức là, duloxetine, venlafaxin, desvenlafaxin, chất chống trầm cảm ba vòng (tức là, doxepin, clomipramin, amoxapin, nortriptylin, amitriptylin, trimipramin, imipramin, protriptylin và desipramin), chất chống trầm cảm bốn vòng (tức là, mirtazapin và maprotilin), chất chống trầm cảm phenylpiperazin (tức là, trazodon và nefazodon), chất ức chế monoamin oxidaza (tức là, isocarboxazid, phenelzin, selegilin và tranlyxypromin), benzodiazepin (tức là, alprazolam, estazolam, flurazepam, clonazepam, lorazepam và diazepam), chất ức chế tái hấp thụ norepinphrin-dopamin (tức là, bupropion), chất kích thích CNS (tức là, phentermin, diethylpropion, metamphetamin, dextroamphetamin, amphetamin, methylphenidat, dexmethylphenidat, lisdexamfetamin, modafinil, pemolin, phendimetrazin, benzphetamin, phendimetrazin, armodafinil, diethylpropion, cafein, atomoxetine, doxapram, và mazindol), chất chống lo âu/chất an thần/thuốc ngủ (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, barbiturat (tức là, secobarbital, phenobarbital và mephobarbital), benzodiazepin (như được mô tả ở trên), và hỗn hợp chất chống lo âu/chất an thần/thuốc ngủ (tức là diphenhydramin, natri oxybat, zaleplon, hydroxyzin, cloral hydrat, alpidem, buspiron, doxepin, eszopiclon, ramelteon, meprobamat và ethchlorvynol)), secretin (xem, ví dụ, Ratliff-Schaub et al. Autism 9 (2005) 256-265), opioit peptit (xem, ví dụ, Cowen et al., J. Neurochem. 89 (2004) 273-285), và neuropeptit (xem, ví dụ, Hethwa et al. Am. J. Physiol. 289 (2005) E301-305).

Rối loạn tích lũy lysosom là rối loạn chuyển hóa mà trong một số trường hợp liên quan đến CNS hoặc có các triệu chứng đặc hiệu CNS; các rối loạn như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở: bệnh Tay-Sachs, bệnh Gaucher, bệnh Fabry, rối loạn chuyển hóa thể tiêu bào (typ I, II, III, IV, V, VI và VII), bệnh tích lũy glycogen, bệnh phá vỡ chất béo GM1-gangliosit, loạn dưỡng chất trắng nhược sắc, bệnh Farber, loạn dưỡng não chất trắng Canavan, và bệnh tiểu thể lắng đọng sắc tố mỡ ở hệ thần kinh typ 1 và 2, bệnh Niemann-Pick, bệnh Pompe, và bệnh Krabbe.

Đối với rối loạn tích lũy lysosom, được chất thần kinh có thể được chọn lọc mà bản thân nó hoặc nếu không thì sao chép hoạt tính của enzym được làm suy yếu trong bệnh. Các enzym tái tổ hợp lấy làm ví dụ để điều trị rối loạn tích lũy lysosom bao gồm, nhưng không giới hạn ở các enzym được nêu trong, ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2005/0142141 (tức là, alpha-L20 iduronidaza, iduronat-

2-sulphataza, N-sulfataza, alpha-N-acetylglucosaminidaza, N-acetylgalactosamin-6-sulfataza, beta-galactosidaza, arylsulphataza B, beta-glucuronidaza, alpha glucosidaza axit, glucocerebrosidaza, alpha-galactosidaza A, hexosaminidaza A, sphingomyelinaza axit, beta-galactocerebrosidaza, beta-galactosidaza, arylsulfataza A, ceramidaza axit, aspartoaxylaza, palmitoyl-protein thioesteaza 1 và tripeptidyl amino peptidaza 1).

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để phát hiện ra rối loạn thần kinh trước khi xuất hiện các triệu chứng và/hoặc để đánh giá độ nghiêm trọng hoặc thời gian tồn tại bệnh hoặc rối loạn. Theo một khía cạnh, kháng thể cho phép phát hiện và/hoặc chụp ảnh rối loạn thần kinh, bao gồm chụp ảnh bằng kỹ thuật chụp X quang, chụp cắt lớp, hoặc chụp cộng hưởng từ (MRI).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp theo sáng chế để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp để sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn thần kinh (ví dụ, bệnh Alzheimer) mà không làm tiêu tế bào hồng cầu (tức là, tế bào lưới). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp được cải biến để sử dụng trong phương pháp điều trị như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR ái lực thấp được cải biến để cải thiện độ an toàn của nó để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể có bệnh hoặc rối loạn thần kinh bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng TfR (tùy ý được kết hợp với thuốc rối loạn thần kinh). Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng TfR được cải biến để cải thiện độ an toàn của nó để sử dụng để làm giảm hoặc ức chế sự hình thành mảng tinh bột ở bệnh nhân có nguy cơ hoặc mắc bệnh hoặc rối loạn thần kinh (ví dụ, bệnh Alzheimer). “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây tùy ý là người. Theo một số khía cạnh nhất định, kháng thể kháng TfR theo sáng chế để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế làm cải thiện sự hấp thu thuốc rối loạn thần kinh mà nó được kết hợp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng TfR ái lực thấp theo sáng chế để sản xuất hoặc bào chế được phẩm. Theo một phương án, được phẩm này là để điều trị bệnh hoặc rối loạn thần kinh. Theo một phương án khác, được

phẩm này là để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh hoặc rối loạn thần kinh bao gồm bước cho cá thể có bệnh hoặc rối loạn thần kinh dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh Alzheimer. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh Alzheimer dùng lượng hữu hiệu của kháng thể đa đặc hiệu theo sáng chế mà gắn kết cả BACE1 và Tfr hoặc cả Abeta và Tfr. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể là người.

Kháng thể kháng Tfr theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất khác trong liệu pháp. Ví dụ, kháng thể kháng Tfr theo sáng chế có thể được cùng sử dụng với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo một số phương án, chất trị liệu bổ sung là chất trị liệu hữu hiệu để điều trị rối loạn thần kinh giống hoặc khác như kháng thể kháng Tfr đang được sử dụng để điều trị. Các chất trị liệu bổ sung lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở: các dược chất thần kinh khác nhau được mô tả ở trên, chất ức chế cholinesteraza (như donepezil, galantamin, rovastigmin, và tacrin), chất đối kháng của thụ thể NMDA (như memantin), chất ức chế tích tụ peptit beta dạng tinh bột, chất chống oxy hóa, chất điều biến γ -secretaza, chất sao chép yếu tố sinh trưởng thần kinh (NGF) hoặc liệu pháp gen NGF, chất chủ vận PPAR γ , chất ức chế HMS-CoA reductaza (statin), ampakin, chất phong bế kênh canxi, chất đối kháng của thụ thể GABA, chất ức chế glycogen synthaza kinaza, globulin miễn dịch trong tĩnh mạch, chất chủ vận của thụ thể muscarin, chất điều biến thụ thể nicotin, miễn dịch hóa peptit beta dạng tinh bột chủ động hoặc thụ động, chất ức chế phosphodiesteraza, chất đối kháng của thụ thể serotonin và kháng thể kháng peptit beta dạng tinh bột. Theo một số phương án, ít nhất một chất trị liệu bổ sung được chọn lọc về khả năng của nó trong việc giảm nhẹ một hoặc nhiều tác dụng phụ của dược chất thần kinh.

Theo một số phương án khác như vậy, ít nhất một chất trị liệu khác được chọn lọc về khả năng của nó trong việc ức chế hoặc ngăn chặn sự hoạt hóa của con đường bổ sung khi dùng kháng thể kháng Tfr. Các ví dụ về chất trị liệu như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất cản trở khả năng của kháng thể kháng Tfr trong việc gắn kết

hoặc hoạt hóa con đường bổ sung và các chất ức chế một hoặc nhiều tương tác phân tử bên trong con đường bổ sung, và thường được mô tả trong Mollnes and Kirschfink (Molec. Immunol. 43 (2006) 107-121), nội dung của tài liệu này được kết hợp một cách rõ ràng trong bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Các liệu pháp kết hợp được nêu trên đây và trong bản mô tả bao gồm việc dùng kết hợp (khi hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong các chế phẩm giống nhau hoặc riêng rẽ), và dùng riêng rẽ, trong trường hợp đó, việc dùng kháng thể theo sáng chế có thể diễn ra trước khi, đồng thời, và/hoặc sau khi dùng chất trị liệu bổ sung và/hoặc chất bổ trợ. Theo một phương án, việc dùng kháng thể kháng Tfr và việc dùng chất trị liệu bổ sung diễn ra trong vòng khoảng một tháng, hoặc trong vòng khoảng một, hai hoặc ba tuần, hoặc trong vòng khoảng một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu ngày, với nhau. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với các liệu pháp can thiệp khác như, nhưng không giới hạn ở, liệu pháp phóng xạ, liệu pháp nhận thức, hoặc các liệu pháp khác đã biết trong lĩnh vực này và thích hợp để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn thần kinh.

Kháng thể kháng Tfr theo sáng chế (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được dùng bằng đường thích hợp bất kỳ, bao gồm dùng ngoài đường tiêu hóa, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn, để điều trị cục bộ, dùng trong thương tổn. Việc truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm dùng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong bụng, hoặc dưới da. Việc dùng liệu có thể là bằng đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm, như tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da, tùy thuộc một phần vào việc liệu việc dùng là trong thời gian ngắn hoặc thường xuyên. Các chế độ dùng liệu khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dùng một lần duy nhất hoặc dùng nhiều lần trong các thời điểm khác nhau, dùng liệu tiêm lớn, và truyền qua mạch được bao gồm trong bản mô tả.

Kháng thể theo sáng chế được phối trộn, định liều, và được dùng theo cách phù hợp với thực tiễn y học tốt. Các yếu tố cần cân nhắc trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân bố chất, phương pháp dùng, chế độ dùng, và các yếu tố khác đã biết đối với các bác sĩ.

Kháng thể không cần thiết, mà tùy ý được phối trộn với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đang quan tâm hoặc ngăn ngừa, làm

giảm hoặc cải thiện một hoặc nhiều tác dụng phụ khi dùng kháng thể. Lượng hữu hiệu của các chất khác này phụ thuộc vào lượng kháng thể có trong chế phẩm, kiểu rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Các chất này thường được sử dụng với các liều lượng giống nhau và đường dùng như được mô tả trong bản mô tả, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả, hoặc với liều lượng bất kỳ và bằng đường bất kỳ được xác định theo kinh nghiệm/theo lâm sàng là thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) phụ thuộc vào loại bệnh được điều trị, loại kháng thể, độ nghiêm trọng và tiến trình của bệnh, kháng thể được dùng nhằm mục đích ngăn ngừa hay trị liệu, liệu pháp trước đó, tiền sử của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể, và sự thận trọng của bác sĩ theo dõi. Kháng thể được dùng một cách thích hợp cho bệnh nhân tại một thời điểm hoặc trong nhiều lần điều trị. Phụ thuộc vào loại và độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng từ 1 μ g/kg đến 15mg/kg (ví dụ, từ 0,1mg/kg đến 10mg/kg) kháng thể có thể là liều ứng viên ban đầu để dùng cho bệnh nhân, liệu, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hay bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 μ g/kg đến 100mg/kg hoặc cao hơn, phụ thuộc vào các yếu tố được đề cập ở trên. Để dùng lặp lại trong một vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh lý, việc điều trị thường được duy trì cho đến khi ngăn chặn theo ý muốn sự xuất hiện các triệu chứng của bệnh. Một liều lượng lấy làm ví dụ của kháng thể là nằm trong khoảng từ khoảng 0,05mg/kg đến khoảng 40mg/kg. Vì vậy, một hoặc nhiều liều bằng khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg, 5,0mg/kg, 7,5mg/kg, 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, 25mg/kg, 30mg/kg, 35mg/kg hoặc 40mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được dùng cho bệnh nhân. Liều này có thể được dùng ngắt quãng, ví dụ, mỗi tuần hoặc mỗi ba tuần (ví dụ, sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Liều nạp cao hơn ban đầu; sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được dùng. Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác có thể hữu ích. Cần hiểu rằng một phương pháp để làm giảm tác động đến quần thể tế bào lưới bằng cách dùng kháng thể kháng TfR là để cải biến lượng hoặc thời điểm của liều sao cho tổng lượng thấp hơn của kháng thể tuần hoàn có mặt trong dòng máu để tương tác với tế bào lưới. Trong một ví dụ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế, liều thấp hơn của kháng thể kháng TfR có thể được dùng với tần suất lớn hơn so với tần suất mà liều

cao hơn được dùng. Liều lượng được sử dụng có thể được cân bằng giữa lượng kháng thể cần được phân bố vào CNS (bản thân nó liên quan đến ái lực của phần đặc hiệu kháng nguyên trong CNS của kháng thể), ái lực của kháng thể đó đối với Tfr, và liệu (các) hợp chất bảo vệ tế bào hồng cầu (tức là, tế bào lưới), kích thích sự sinh trưởng và phát triển, hoặc ức chế con đường bổ sung được dùng đồng thời hoặc lần lượt với kháng thể. Tiến trình của liệu pháp này dễ dàng theo dõi được bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường như được mô tả trong bản mô tả và như đã biết trong lĩnh vực này.

Cần 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 tiến hành bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế ở vị trí của kháng thể kháng Tfr hoặc ngoài kháng thể kháng Tfr.

III. Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất vật phẩm chứa các vật liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả ở trên. Vật phẩm bao gồm vật chứa và nhãn dán hoặc tờ rời kèm theo bao gói trên hoặc kết hợp với vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, xi lanh, túi dung dịch IV, v.v.. Vật chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa giữ chế phẩm mà tự chế phẩm đó hoặc kết hợp với chế phẩm khác hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút chặn dễ xuyên qua bởi kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể theo sáng chế. Nhãn dán hoặc tờ rời kèm theo bao gói chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý được chọn. Hơn nữa, vật phẩm có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có chế phẩm chứa trong đó, trong đó chế phẩm này chứa kháng thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm chứa trong đó, trong đó chế phẩm này chứa chất gây độc tế bào khác hoặc chất trị liệu. Vật phẩm theo phương án này của sáng chế còn có thể bao gồm tờ rời kèm theo bao gói chỉ ra rằng chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý cụ thể. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm còn có thể bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm chất đệm được dùng, như nước kim khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó còn có thể bao gồm các vật liệu khác được mong muốn theo quan

điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, bộ lọc, kim, và xi lanh.

Cần hiểu rằng vật phẩm bất kỳ trong số các vật phẩm trên đây có thể bao gồm thể liên hợp miễn dịch theo sáng chế ở vị trí kháng thể của thụ thể kháng transferrin hoặc ngoài kháng thể này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Cần hiểu rằng các phương án khác nhau khác có thể được thực hiện, có được phần mô tả tổng quát được đề xuất trên đây.

Vật liệu và phương pháp

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng để xử lý thủ công 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. Các chất phản ứng sinh học phân tử được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen và oligonucleotit

Các đoạn gen mong muốn được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học ở Genearth GmbH (Regensburg, Đức). Các đoạn gen đã tổng hợp được tách dòng vào plasmit E. coli để lan truyền/khuếch đại. Trình tự ADN của các đoạn gen đã được tách dòng thuần được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Theo một cách khác, đoạn ADN tổng hợp ngắn được lắp ráp bằng cách gắn các oligonucleotit tổng hợp theo phương pháp hóa học hoặc thông qua PCR. Các oligonucleotit tương ứng được tạo ra bằng metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Đức).

Chất phản ứng

Tất cả hóa chất, kháng thể và bộ kit bán trên thị trường được sử dụng như được cung cấp theo phương pháp của nhà sản xuất nếu không được quy định khác đi.

Ví dụ 1

Miễn dịch hóa thỏ và chuột nhắt

Miễn dịch hóa chuột nhắt

Chuột nhắt NMRI được miễn dịch hóa di truyền, sử dụng vector biểu hiện plasmit mã hóa TfR ở người hoặc khi đầu chó độ dài đầy đủ bằng cách áp dụng trong da 100 μ g ADN vector, sau đó điện di (2 xung vuông bằng 1000V/cm, thời gian 0,1 mgiây, khoảng cách 0,125 giây; sau đó 4 xung vuông bằng 287,5V/cm, thời gian 10 mgiây, khoảng cách 0,125 giây). Chuột nhắt nhận 6 hoặc 7 lần miễn dịch hóa liên tiếp vào ngày 0, 14, 28, 42, 56, 70, và 84. Lần miễn dịch hóa thứ tư và thứ sáu được thực hiện bằng vector mã hóa TfR khi đầu chó; vector mã hóa TfR ở người được sử dụng cho tất cả các lần miễn dịch hóa khác. Máu được lấy vào ngày 36, 78 và 92 và huyết thanh được chuẩn bị, được sử dụng để xác định độ chuẩn bằng ELISA (xem dưới đây). Các con chuột có độ chuẩn cao nhất được chọn để tăng cường vào ngày 96, bằng cách tiêm trong tĩnh mạch 10⁶ tế bào TF-1 người hoặc 50 μ g TfR tái tổ hợp dễ tan của người thiếu miễn xoắn (miễn ngoại bào của TfR ở người bắt đầu ở Leu122, kết thúc ở Asn608, được biểu hiện trong tế bào HEK293F dưới dạng đầu tận N dung hợp với vùng Fc người và được tinh sạch bằng sắc ký ái lực protein A và sắc ký loại trừ kích cỡ, và các kháng thể đơn dòng được phân lập bằng công nghệ lai, dựa trên khả năng của chúng trong việc gắn kết thụ thể transferrin ở người và ở khi đầu chó biểu hiện trên bề mặt tế bào CHO-K1 được chuyển nhiễm ổn định (xem Ví dụ 3).

Miễn dịch hóa thỏ

Thỏ trắng New Zealand hoặc thỏ chuyển gen biểu hiện danh mục kháng thể được làm giống như của người được miễn dịch hóa di truyền, sử dụng vector biểu hiện plasmit mã hóa TfR ở người hoặc khi đầu chó độ dài đầy đủ, bằng cách áp dụng trong da 400 μ g ADN vector, sau đó điện di (5 xung vuông bằng 750V/cm, thời gian 10 mgiây, khoảng cách 1 giây). Thỏ nhận 6 lần miễn dịch hóa liên tiếp vào ngày 0, 14, 28, 56, 84 và 112. Lần miễn dịch hóa thứ tư và thứ sáu được thực hiện bằng vector mã hóa TfR ở khi đầu chó; vector mã hóa TfR ở người được sử dụng cho tất cả các lần miễn dịch hóa khác. Máu (10% tổng thể tích máu ước tính) được lấy vào ngày 35, 63, 91 và 119. Huyết thanh được chuẩn bị, được sử dụng để xác định độ chuẩn bằng ELISA (xem dưới đây), và tế

bào đơn nhân ngoại biên được phân lập, được sử dụng làm nguồn tế bào B đặc hiệu kháng nguyên trong quá trình tách dòng tế bào B (xem Ví dụ 2).

Xác định độ chuẩn huyết thanh (ELISA)

TfR tái tổ hợp dễ tan của người (R&D Systems Cat. No. 2474-TR) được giữ cố định trên đĩa có 96 giếng NUNC Maxisorb ở 3µg/mL, 100µL/giếng, trong PBS, sau đó: cố định đĩa bằng CroteinC 2% trong PBS, 200µL/giếng; áp dụng các phân pha loãng theo dãy của kháng huyết thanh, hai lần, trong CroteinC 0,5% trong PBS, 100µL/giếng; phát hiện ra bằng (1) kháng thể dê kháng chuột nhất được liên hợp HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16000) đối với tất cả huyết thanh chuột nhất, (2) kháng thể lừa kháng IgG thỏ được liên hợp HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 711-036-152; 1/16 000) đối với tất cả huyết thanh thỏ, (3) kháng thể thỏ kháng IgG người (Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000) chỉ đối với huyết thanh từ thỏ chuyển gen, (4) kháng thể dê kháng kappa người được biotinyl hóa (Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5000) và streptavidin-HRP chỉ đối với huyết thanh từ thỏ chuyển gen; được pha loãng trong CroteinC 0,5% trong PBS, 100µL/giếng. Đối với tất cả các bước, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Giữa tất cả các bước, các đĩa được rửa 3 lần bằng Tween 20 0,05% trong PBS. Tín hiệu được phát triển bằng cách bổ sung cơ chất BM Blue POD dễ tan (Roche), 100µL/giếng; và ngừng bằng cách bổ sung HCl 1M, 100µL/giếng. Mức hấp thụ được đọc ở 450nm, dựa trên 690nm làm đối chiếu. Độ chuẩn được xác định dưới dạng phân pha loãng của kháng huyết thanh dẫn đến tín hiệu nửa tối đa.

Ví dụ 2

Tách dòng tế bào B từ thỏ

Phân lập tế bào đơn nhân máu ngoại biên của thỏ (PBMC)

Các mẫu máu được lấy trong 6 con thỏ (2 con thỏ loại đại (wt) và 4 con thỏ chuyển gen (tg)). Các con thỏ này có nguồn gốc từ 2 chiến dịch miễn dịch hóa khác nhau: chiến dịch thứ nhất có 2 con thỏ wt và 2 con thỏ tg và chiến dịch thứ hai có 2 con thỏ tg (xem cả trong đoạn, ví dụ, “Miễn dịch hóa thỏ”). EDTA chứa máu tổng thể được pha loãng gấp hai lần với 1x PBS (PAA, Pasching, Austria) trước khi ly tâm mật độ bằng cách sử dụng tế bào bạch huyết động vật có vú (Cedarlane Laboratories,

Burlington, Ontario, Canada) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. PBMC được rửa hai lần bằng 1x PBS.

Môi trường EL-4 B5

RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Đức) được bổ sung FCS 10% (Hyclone, Logan, UT, USA), glutamin 2mM, penixilin 1%/dung dịch streptomycin (PAA, Pasching, Austria), natri pyruvat 2mM, HEPES 10mM (PAN Biotech, Aidenbach, Đức) và β -mercaptoetanol 0,05mM (Gibco, Paisley, Scotland)

Làm tiêu tế bào

Chiến dịch miễn dịch hóa thứ nhất: đĩa 6 giếng vô trùng (cấp nuôi cấy tế bào) được phủ lớp đơn hợp dòng chứa tế bào CHO được sử dụng để làm tiêu đại thực bào/bạch cầu đơn nhân nhờ bám dính không đặc hiệu cũng như tế bào lympho gắn kết không đặc hiệu.

Chiến dịch miễn dịch hóa thứ hai: bước làm tiêu sử dụng các giếng được phủ tế bào CHO được bỏ qua do các tác giả sáng chế có thể không loại trừ các kháng thể sản sinh tế bào B mà phản ứng chéo với kháng thể của thụ thể transferrin của chuột lang được làm tiêu. Do đó, các đĩa 6 giếng vô trùng trống (cấp nuôi cấy tế bào) được sử dụng để làm tiêu đại thực bào và bạch cầu đơn nhân nhờ bám dính không đặc hiệu khiến cho các tế bào lympho B tiềm ẩn sản sinh các kháng thể bề mặt phản ứng chéo ở chuột lang (và có thể phản ứng chéo ở chuột nhắt) để tiến đến bước tiếp theo trong quy trình.

Đối với mỗi chiến dịch miễn dịch hóa: mỗi giếng được làm đầy tối đa với 4mL môi trường và lên đến 6×10^6 PBMC từ thỏ được miễn dịch và cho phép gắn kết trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ. Tế bào trong phần dịch nổi trên bề mặt (tế bào lympho máu ngoại biên (PBL)) được sử dụng cho bước sàng lọc kháng nguyên.

Làm giàu tế bào B trên thụ thể transferrin ở người

Đĩa nuôi cấy mô có 6 giếng được phủ lớp đơn chứa tế bào CHO dương tính với thụ thể transferrin ở người được gieo lên đến 6×10^6 PBL trong mỗi 4mL môi trường và cho phép gắn kết trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ. Tế bào không bám dính được loại bỏ bằng cách rửa kỹ các giếng 1-2 lần bằng 1x PBS. Các tế bào dính còn lại được tách ra bằng trypsin trong 10 phút ở nhiệt độ 37°C trong tủ ủ. Quá trình trypsin hóa được

ngừng lại bằng môi trường EL-4 B5. Các tế bào được giữ trên đá cho đến khi nhuộm miễn dịch huỳnh quang.

Nhuộm miễn dịch huỳnh quang và đo tế bào theo dòng chảy

FITC kháng IgG (AbD Serotec, Düsseldorf, Đức) được sử dụng để phân loại tế bào đơn lẻ. Để nhuộm bề mặt, các tế bào từ bước làm tiêu và làm giàu được ủ với kháng thể kháng IgG FITC trong PBS và được ủ trong 45 phút trong bóng tối ở nhiệt độ 4°C. Sau khi nhuộm, các PBMC được rửa hai lần bằng PBS đá lạnh. Cuối cùng, PBMC được tạo huyền phù lại trong PBS đá lạnh và đưa ngay vào phân tích FACS. Propidi iodua ở nồng độ 5 µg/mL (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) được bổ sung vào trước khi phân tích FACS để phân biệt giữa tế bào chết và tế bào sống.

Becton Dickinson FACS Aria được trang bị máy tính và phần mềm FACSDiva (BD Biosciences, USA) được sử dụng để phân loại tế bào đơn lẻ.

Nuôi cấy tế bào B

Môi trường nuôi cấy tế bào B của thỏ được chuẩn bị bằng phương pháp tương tự với phương pháp được mô tả bởi Zubler et al. (1985). Nói một cách ngắn gọn, các tế bào B của thỏ được phân loại đơn lẻ được ủ trong đĩa 96 giếng với 200 µL/giếng môi trường EL-4 B5 chứa tế bào Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland), 5% phần dịch nổi trên bề mặt tế bào tuyến ức của thỏ (charge TSN-M13 (10242), MicroCoat, Bernried, Đức) và tế bào tuyến ức EL-4-B5 của chuột được chiếu xạ tia gama ($2,5 \times 10^4$ /giếng) trong 7 ngày ở nhiệt độ 37°C ở môi trường 5% CO₂ trong tủ ủ. Phần dịch nổi trên bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào B được loại bỏ để sàng lọc và các tế bào còn lại được thu hoạch ngay và được làm đông ở nhiệt độ -80°C trong 100 µL chất đệm RLT (Qiagen, Hilden, Đức).

Ví dụ 3

Nhận biết kháng thể gắn kết TfR ở người và ở khỉ đầu chó bằng ELISA tế bào

Để sàng lọc phần dịch nổi trên bề mặt tế bào B của thỏ hoặc tế bào lai của chuột nhất đối với các kháng thể nhận diện TfR ở người và ở khỉ đầu chó, ELISA tế bào sử dụng con đường tế bào CHO-K1 được chuyển nhiễm ổn định được sử dụng. Các thể chuyển nhiễm ổn định thu được bằng cách chuyển nhiễm các tế bào CHO-K1 với plasmit biểu hiện chứa cát-xét biểu hiện cho TfR ở người hoặc khỉ đầu chó cũng như neomycin-

phosphotransferaza. Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được pha loãng trong môi trường sinh trưởng chứa 500 μ g/mL G418 (Life Technologies). Sau khi xuất hiện dòng vô tính sinh trưởng, các tế bào được tách ra, nhuộm bằng MEM-75 (Abcam) hoặc 13E4 (Life Technologies) và kháng thể thứ cấp được đánh dấu bằng PE cho TfR ở người hoặc khi đầu chó, và tế bào huỳnh quang ở mức cao được phân loại dưới dạng các tế bào đơn lẻ vào đĩa 96 giếng (FACS Aria). Sau 7 ngày sinh trưởng, dòng vô tính được kiểm tra một lần nữa về sự biểu hiện TfR và dòng vô tính biểu hiện tốt nhất được chọn cho thí nghiệm ELISA tế bào.

Nói một cách ngắn gọn, 15000 tế bào được gieo trong mỗi giếng của đĩa 384 giếng và được ủ trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C, 5% CO₂. Phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ bằng cách sử dụng máy rửa tự động (BIOTEK), và 30 μ L phần dịch nổi trên bề mặt chứa kháng thể được bổ sung vào mỗi giếng, sau đó là 24 μ L môi trường sinh trưởng. Sau 2 giờ ủ, các giếng được trút hết đi và bổ sung 30 μ L glutaraldehyt 0,05% trong PBS trong 45 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 lần rửa bằng PBS/Tween20 0,025% (PBST), 30 μ L kháng HRP thô hoặc kháng HRP chuột nhắt (Southern Biotech) được pha loãng ở tỷ lệ 1:5000 trong chất đệm phong bế được bổ sung và các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng được rửa 6 lần bằng PBST và tín hiệu được tạo ra bằng cách sử dụng 30 μ L TMB trong mỗi giếng và mức hấp thụ được đo ở 450 nm.

Ví dụ 4

Tách dòng và biểu hiện kháng thể kháng TfR

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp tiêu chuẩn được sử dụng để xử lý thủ công 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. Các chất phản ứng sinh phân tử được sử dụng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen và oligonucleotit

Các đoạn gen mong muốn được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học ở Genart GmbH (Regensburg, Đức). Đoạn gen đã tổng hợp được tách dòng vào plasmit E. coli để lan truyền/khuếch đại. Trình tự ADN của các đoạn gen đã được tách dòng thuần được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Theo một cách khác, đoạn ADN tổng hợp ngắn

được lắp ráp bằng cách gắn oligonucleotit tổng hợp theo phương pháp hóa học hoặc thông qua PCR. Các oligonucleotit tương ứng được tạo ra bằng metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Đức).

Khuếch đại PCR của miền V

ARN tổng thể được tạo ra từ dịch làm tan tế bào B (được tạo lại huyền phù trong chất đệm RLT - Qiagen - Cat. N° 79216) sử dụng bộ kit NucleoSpin 8/96 RNA (Macherey&Nagel; 740709,4, 740698) theo phương pháp của nhà sản xuất. ARN được rửa giải bằng 60µL nước không chứa RNAza. 6µL ARN được sử dụng để tạo ra ADN bổ sung bằng phản ứng transcriptaza đảo sử dụng Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) và đoạn mồi oligo-dT theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Tất cả các bước được thực hiện trên hệ thống Hamilton ML Star. 4µL ADN bổ sung được sử dụng để khuếch đại vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL) của globulin miễn dịch với AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) ở thể tích cuối cùng là 50µL bằng cách sử dụng đoạn mồi rbHC.up và rbHC.do cho chuỗi nặng, rbLC.up và rbLC.do cho chuỗi nhẹ của tế bào B loại đại của thỏ và BcPCR_FHLC_leader.fw và BcPCR_huCkappa.rev cho chuỗi nhẹ của tế bào B thỏ chuyển gen (xem Bảng dưới đây). Tất cả các đoạn mồi xuôi đặc hiệu đối với peptit tín hiệu (lần lượt của VH và VL) trong khi đó các đoạn mồi ngược đặc hiệu đối với vùng hằng định (lần lượt của VH và VL). Các điều kiện PCR đối với RbVH+RbVL là như sau: Khởi động nóng ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ 20 giây ở nhiệt độ 94°C, 20 giây ở nhiệt độ 70°C, 45 giây ở nhiệt độ 68°C, và mở rộng lần cuối ở nhiệt độ 68°C trong 7 phút. Các điều kiện PCR đối với HuVL là như sau: Khởi động nóng ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; 40 chu kỳ 20 giây ở nhiệt độ 94°C, 20 giây ở nhiệt độ 52°C, 45 giây ở nhiệt độ 68°C, và mở rộng lần cuối ở nhiệt độ 68°C trong 7 phút.

rbHC.up (SEQ ID NO: 103)	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGC TTC
rbHCf.do (SEQ ID NO: 104)	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLC.up (SEQ ID NO: 105)	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC
rbLC.do (SEQ ID NO: 106)	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

BcPCR_FHLC_leader.f w (SEQ ID NO: 107)	ATGGACATGAGGGTCCCCGC
BcPCR_huCkappa.rev (SEQ ID NO: 108)	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

8µL của 50µL dung dịch PCR được nạp trên 48 E-Gel 2% (Invitrogen G8008-02). Phản ứng PCR dương được làm sạch bằng cách sử dụng bộ kit NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) theo phương pháp của nhà sản xuất và được rửa giải trong 50µL chất đệm rửa giải. Tất cả các bước làm sạch được thực hiện trên hệ Hamilton ML Starlet.

Biểu hiện tái tổ hợp kháng thể đơn dòng tổ hợp hóa trị hai

Để biểu hiện tái tổ hợp kháng thể đơn dòng tổ hợp hóa trị hai, sản phẩm PCR mã hóa VH hoặc VL được tách dòng dưới dạng ADN bổ sung vào các vectơ biểu hiện bằng phương pháp tách dòng phần nhô (RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Vectơ biểu hiện chứa cắt-xét biểu hiện bao gồm gen khởi đầu 5' CMV bao gồm intron A, và trình tự 3' BGH polyadenyl hóa. Ngoài cắt-xét biểu hiện, các plasmit chứa gốc sao chép thu được từ pUC18 và gen beta-lactamaza mang lại tính kháng ampicillin để khuếch đại plasmit trong E. coli. Ba biến thể của plasmit cơ bản được sử dụng: một plasmit chứa vùng hằng định IgG tổ hợp được thiết kế để nhận vùng VH trong khi hai plasmit bổ sung chứa vùng hằng định kappa LC tổ hợp hoặc ngược lại để nhận vùng VL.

Plasmit biểu hiện mạch thẳng mã hóa vùng hằng định kappa hoặc gamma và các biến thể xen vào ở VL/VH được khuếch đại bằng PCR sử dụng các đoạn mồi chồng lắp.

Các sản phẩm PCR đã tinh sạch được ủ với T4 ADN-polymeraza mà tạo ra các phần nhô chuỗi đơn. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dCTP.

Trong bước tiếp theo, plasmit và biến thể xen vào được kết hợp và được ủ với recA mà cảm ứng sự tái tổ hợp đặc hiệu điểm. Các plasmit đã được tái tổ hợp được biến nạp vào E. coli. Ngày tiếp theo, các cụm sinh trưởng được lấy và thử nghiệm đối với plasmit tái tổ hợp chính xác bằng cách tạo ra plasmit, phân tích hạn chế và giải trình tự ADN.

Để biểu hiện kháng thể, plasmit HC và LC được phân lập được đồng chuyển nhiễm thoả qua vào tế bào HEK293 và phân dịch nổi trên bề mặt được thu hoạch sau 1 tuần.

Tạo ra vector để biểu hiện kháng thể đơn dòng tổ hợp hóa trị một

Để biểu hiện tái tổ hợp các ứng viên được chọn làm kháng thể đơn dòng hóa trị một, vùng hằng định của thỏ của tất cả chuỗi VH được chuyển hóa thành vùng hằng định của người đột biến phân phình trong đoạn CH3. Đối với chuỗi VL có nguồn gốc từ tế bào B loại đại của thỏ, vùng hằng định C kappa của thỏ được chuyển hóa thành vùng của người. 4 μ L ADN bổ sung của các ứng viên được chọn được sử dụng để khuếch đại vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch với AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) ở thể tích cuối cùng là 50 μ L với các đoạn mồi xuôi đặc hiệu đối với peptit tín hiệu và các đoạn mồi ngược đặc hiệu đối với vùng CDR3-J có trình tự chồng lấp (ở đầu 3') (20 bp) đồng nhất với vùng hằng định của người (lần lượt của VH và VL). Các điều kiện PCR để khuếch đại chuỗi VH và chuỗi VL là như sau: Khởi động nóng ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ 20 giây ở nhiệt độ 94°C, 20 giây ở nhiệt độ 68°C, 45 giây ở nhiệt độ 68°C, và mở rộng lần cuối ở nhiệt độ 68°C trong 7 phút.

Các sản phẩm PCR mã hóa VH hoặc VL được tách dòng dưới dạng ADN bổ sung vào vector biểu hiện bằng phương pháp tách dòng phân nhô (RS Haun et al., BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Các vector biểu hiện chứa cắt-xét biểu hiện bao gồm gen khởi đầu 5' CMV bao gồm intron A, và trình tự 3' BGH poly adenyl hóa. Ngoài cắt-xét biểu hiện, các plasmit chứa gốc sao chép thu được từ pUC18 và gen beta-lactamaza mang lại tính kháng ampicillin cho plasmit khuếch đại trong E. coli. Hai biến thể của plasmit cơ bản được sử dụng: một plasmit chứa vùng hằng định IgG người được thiết kế để nhận chuỗi VH được khuếch đại mới và plasmit thứ hai chứa vùng hằng định kappa LC người để nhận chuỗi VL.

Plasmit biểu hiện mạch thẳng mã hóa vùng hằng định kappa hoặc gama và biến thể xen vào ở VL/VH được khuếch đại bằng PCR sử dụng đoạn mồi chồng lấp.

Các sản phẩm PCR đã tinh sạch được ủ với T4 ADN-polymeraza mà tạo ra phân nhô chuỗi đơn. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung dCTP.

Trong bước tiếp theo, plasmit và biến thể xen vào được kết hợp và được ủ với *recA* mà cảm ứng sự tái tổ hợp đặc hiệu điểm. Các plasmit đã được tái tổ hợp được biến nạp vào *E. coli*. Ngày tiếp theo, các cụm sinh trưởng được lấy và được thử nghiệm đối với plasmit tái tổ hợp chính xác bằng cách tạo ra plasmit, phân tích hạn chế và giải trình tự ADN.

Ví dụ 5

Biểu hiện thoáng qua của kháng thể kháng TfR hóa trị một

Kháng thể được tạo ra *in vivo* trong tế bào HEK293 được chuyển nhiễm thoáng qua (có nguồn gốc từ dòng tế bào 293 thận phôi người) được canh trường trong môi trường F17 (Invitrogen Corp.). Để chuyển nhiễm, chất phản ứng chuyển nhiễm "không chứa 293" (Novagen) được sử dụng. Kháng thể và phân tử được cải biến dựa trên kháng thể như được mô tả ở trên được biểu hiện từ các plasmit biểu hiện riêng lẻ. Bước chuyển nhiễm được thực hiện như được nêu cụ thể trong chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào chứa protein tái tổ hợp được thu hoạch ba đến bảy ngày sau chuyển nhiễm. Phần dịch nổi trên bề mặt được bảo quản ở nhiệt độ giảm (ví dụ -80°C) cho đến khi tinh sạch.

Thông tin tổng quát về sự biểu hiện tái tổ hợp của globulin miễn dịch người trong, ví dụ, tế bào HEK293 được nêu trong: Meissner, P. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203.

Ví dụ 6

Tinh sạch kháng thể của thụ thể transferrin một nhánh ở công suất cao

50mL phần dịch nổi trên bề mặt được làm sạch chứa kháng thể một nhánh trong đĩa có 96 giếng sâu được nạp trên 200µL cột MabSelectSuRe. Sau bước rửa bằng PBS ở độ pH = 7,4, protein được rửa giải bằng HCl 2,5mM bằng cách sử dụng hệ thống Tecan/Atoll thu được 0,5mL chất rửa giải. Chất rửa giải được trung hòa bằng Tris 2M độ pH = 8. Các protein đã tinh sạch được định lượng bằng cách sử dụng máy đo phổ khối Nanodrop và được xử lý bằng CE-SDS trong điều kiện biến tính và khử và SEC phân tích. Để thu được protein có độ tinh khiết cao (>95%), một tỷ lệ lớn kháng thể phải được tinh sạch thêm trên sắc ký loại trừ kích cỡ để tách ra khỏi nửa kháng thể, kháng thể phân mảnh-phân mảnh và các thể kết tụ cao hơn. Sau đó 500µL mẫu được phun trên

Superdex200 10/300GL trong histidin 20mM chứa NaCl 140mM độ pH = 6,0 bằng cách sử dụng Dionex UltiMate 3000. Phương pháp này cho phép cất phân đoạn 25-30 mẫu/ngày và do đó cho phép đánh bóng một lượng lớn các kết quả sàng lọc trong mô hình một nhánh. Các đoạn được gộp và phân tích một lần nữa như được mô tả ở trên.

Ví dụ 7

Nuôi cấy tế bào hCMEC/D3 dùng cho thử nghiệm chuyển bào

Môi trường và thành phần bổ sung dùng cho hCMEC/D3 (Weksler, B. B. et al., FASEB J. 19 (2005), 1872-1874) thu được từ Lonza. Các tế bào hCMEC/D3 (cấy chuyển 26-29) được nuôi cấy để hợp dòng trên lá kính đáy (hiển vi) hoặc bình được phủ collagen trong môi trường EBM2 chứa FBS 2,5%, một phần tư các yếu tố sinh trưởng được cung cấp và được bổ sung đầy đủ được cung cấp hydrocortison, gentamycin và axit ascorbic.

Đối với tất cả thử nghiệm chuyển bào, thiết bị gài bộ lọc màng PET mật độ lỗ cao (1×10^8 lỗ/cm²) (0,4μM, đường kính 12mm) được sử dụng trong đĩa nuôi cấy tế bào có 12 giếng. Thể tích môi trường tối ưu được tính là 400μL và 1600μL đối với khoang đỉnh và khoang đáy bên, một cách tương ứng. Khoang đỉnh của thiết bị gài bộ lọc được phủ bằng collagen đuôi chuột cổng I (7,5μg/cm²) sau đó là fibronectin (5μg/mL), mỗi lần ủ kéo dài 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các tế bào hCMEC/D3 được sinh trưởng thành lớp đơn hợp dòng (khoảng 2×10^5 tế bào/cm²) trong thời gian từ 10 đến 12 ngày trong môi trường EMB2.

Ví dụ 8

Thử nghiệm chuyển bào các kháng thể hóa trị một

Toàn bộ thử nghiệm được thực hiện trong môi trường EBM2 không chứa huyết thanh mà theo một cách khác có thể được hoàn nguyên như được mô tả trong Ví dụ 1. Thiết bị gài bộ lọc có các tế bào được ủ trên đỉnh với kháng thể hóa trị một (nồng độ: 2,67μg/mL) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó toàn bộ môi trường đỉnh và đáy bên được gom. Từ các giá trị này, thông lượng gian bào được tính. Các lớp đơn được rửa ở nhiệt độ trong phòng trong môi trường không chứa huyết thanh trên đỉnh (400μL) và đáy bên (1600μL) 3 x 3-5 phút. mỗi. Tất cả các chất rửa được gom để theo dõi hiệu quả loại bỏ kháng thể không gắn kết. Môi trường được làm ấm từ trước được bổ sung vào

khoang đỉnh và bộ lọc được chuyển đến đĩa 12 giếng mới (được phong bế qua đêm bằng PBS chứa BSA 1%) chứa 1600 μ L môi trường được làm ấm từ trước. Tại thời điểm này, các tế bào trên bộ lọc được làm tan trong 500 μ L chất đệm RIPA để xác định mức hấp thụ kháng thể cụ thể. Các bộ lọc còn lại được ủ ở nhiệt độ 37°C và các mẫu được gom ở các thời điểm khác nhau để xác định sự giải phóng ở đỉnh và/hoặc đáy bên của kháng thể. Hàm lượng kháng thể trong các mẫu được định lượng bằng cách sử dụng ELISA IgG độ nhạy cao (xem Ví dụ 3). Đối với từng thời điểm, dữ liệu được tạo ra từ ba môi trường nuôi cấy tế bào lọc.

Ví dụ 9

ELISA IgG nhạy sau thử nghiệm chuyển bào

Toàn bộ quy trình được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng máy rửa tự động cho bước rửa. Đĩa 384 giếng được phủ bằng 1 μ g/mL kháng thể kháng IgG ở người/chuột nhất, đặc hiệu Fc γ trong PBS ở nồng độ 30 μ L/giếng trong 2 giờ sau đó là 1 giờ ủ trong PBS đệm phong bế chứa BSA 1% hoặc CroteinC 1% cho thử nghiệm IgG người và chuột nhất, một cách tương ứng). Các mẫu được pha loãng theo dãy từ thử nghiệm chuyển bào và các nồng độ chuẩn của kháng thể được sử dụng trong thử nghiệm chuyển bào được bổ sung vào đĩa và được ủ trong 2 giờ. Sau bốn lần rửa, 50ng/mL kháng thể kháng F(ab)2-Biotin ở người/chuột nhất trong chất đệm phong bế ở nồng độ 30 μ L/giếng được bổ sung và được ủ trong 2 giờ nữa. Sau 6 lần rửa, 50ng/mL (thử nghiệm huIgG) hoặc 100ng/mL (thử nghiệm mIgG) Poly-HRP40-Streptavidin (Fitzgerald; trong PBS chứa BSA 1% và Tween-20 0,05%) ở 30 μ L/giếng được bổ sung và được ủ trong 30 phút. Sau 4 lần rửa, phức miễn dịch được phát hiện ra bằng cách bổ sung cơ chất phát quang hóa học BM (Roche) ở 30 μ L/giếng. Tín hiệu phát quang được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa phát quang và nồng độ được tính bằng cách sử dụng đường cong tiêu chuẩn được biến đổi thích hợp. Độ nhạy của thử nghiệm nằm trong khoảng từ 10pg/mL đến 10ng/mL.

Ví dụ 10

Xây dựng bản đồ epitop bằng ELISA tế bào của các tế bào CHO được chuyển nhiễm bằng thể đột biến hTfR

Để có thể xác định vùng epitop trên thụ thể transferrin ở người (hTfR), các đột biến được đưa vào trình tự hTfR ở các vị trí, khi nhóm axit amin tiếp xúc bề mặt có các axit amin khác nhau trong trình tự TfR của chuột nhất đã được sắp xếp (xem Bảng dưới đây), theo nguyên nhân căn bản mà bất chấp tính tương đồng ý nghĩa giữa TfR ở người và chuột nhất (độ đồng nhất 77%), không kháng thể được định hướng đến phần ngoại bào nào đã được biết mà cho thấy tính phản ứng chéo tốt giữa cả hai chất tương đồng. Việc tách dòng plasmit với đột biến tương ứng được mô tả ở trên. Để xây dựng bản đồ sự gắn kết của chất gắn kết TfR ở người với các epitop, tế bào CHO-K1 được chuyển nhiễm thoáng qua với plasmit được mô tả và mức gắn kết kháng thể được đo trong ELISA tế bào. Nói một cách ngắn gọn, 10^4 tế bào được dàn trên đĩa trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng vào ngày trước ngày thí nghiệm trong môi trường sinh trưởng bình thường (RPMI/FCS 10%). Một ngày khác, môi trường được thay đổi thành môi trường đã khử huyết thanh OPTI-MEM (Gibco), và $10\mu\text{L}$ hỗn hợp của $1200\mu\text{L}$ OPTI-MEM, $12\mu\text{g}$ plasmit ADN và $12\mu\text{L}$ chất phản ứng chuyển nhiễm XtremeGENE (Roche) được bổ sung vào các giếng sau 30 phút ủ sơ bộ. Các tế bào được ủ trong 2 ngày ở nhiệt độ $37^\circ\text{C}/7,5\% \text{CO}_2$, sau đó môi trường được loại bỏ và kháng thể TfR được bổ sung ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 1nM đến 100nM trong môi trường sinh trưởng, sau đó ủ 2 giờ ở nhiệt độ 4°C . Sau đó, dung dịch kháng thể được thay thế bằng glutaraldehyt 0,05% trong PBS và các tế bào được cố định trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, sau đó được rửa hai lần bằng PBS và được ủ bằng kháng thể thứ cấp kháng Fc người liên hợp với HRP (BioRad; 1:2000 trong chất phản ứng phong bế ELISA (Roche)) trong 1,5 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Tín hiệu được tạo ra sau 3 lần rửa bằng PBS sử dụng $50\mu\text{L}$ TMB trong mỗi giếng và mức hấp thụ được đo ở 450nm .

Plasmit #	Đột biến trong hTfR
10188	-
18909	Thr518Asp/Gln520Lys/Phe521Ser/Gln524Arg
18910	Arg325Gln
18911	Ser355Ala/Asp356Arg/Lys358Asn/Thr359Ile
18912	Asp204Gln/Lys205Ser/Arg208Asn
18913	Lys574Gly/Glu575Ala/Ile577Thr/Glu578Gln
18914	Ala196Ile/Gln197Gly/Asn198Gln/Ser199Asn/Val200Met/Ile201Val/Ile202Thr/Val203Ile/Asp204Val/Lys205Gln/Asn206Ser/Gly207Asn/Arg208Gly/Leu209Asn/Val210Leu/Tyr211Asp/Leu212Pro
18974	Asp245Glu/Tyr247Ser/Thr248Tyr/Pro249Ser

Ví dụ 11

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

Thí nghiệm gắn kết được tiến hành trên BIAcore B 4000 (GE Healthcare) được trang bị chip cảm biến C1 (GE Healthcare, cat.no. BR1005-35) được xử lý sơ bộ với kháng thể kháng Fab người (GE Healthcare, cat.no 28-9583-25) sử dụng quy trình hóa kết hợp amin tiêu chuẩn theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Đối với các phép đo động học, kháng thể mẫu được giữ cố định áp dụng thời gian tiếp xúc là 60 giây và tốc độ dòng chảy là 10 μ L/phút trong nước muối đệm phosphat có độ pH = 7,4, Tween 20 0,05% ở nhiệt độ 25°C. Thụ thể transferrin ở người có đuôi His6 tái tổ hợp (R&D systems, cat.no 2474-TR-050) được áp dụng ở nồng độ gia tăng và tín hiệu được theo dõi theo thời gian. Biên độ thời gian trung bình giữa 150 giây thời gian kết hợp và 600 giây thời gian phân ly ở tốc độ dòng chảy 30 μ L/phút được ghi lại. Dữ liệu được biến đổi thích hợp bằng cách sử dụng mô hình liên kết 1:1 (đẳng nhiệt Langmuir).

Ví dụ 12

Nhân hóa miền VH và miền VL của kháng thể của thụ thể kháng transferrin chuột và thỏ

Kháng thể của thụ thể kháng transferrin không phải của người được làm giống như của người như sau: Dựa trên đặc tính của trình tự mã hóa và trình tự axit amin bao

gồm miền VH và miền VL của kháng thể của thụ thể kháng transferrin không phải của người thuộc lớp IgG1 với chuỗi nhẹ kappa, kháng thể của thụ thể kháng transferrin được làm giống như của người tương ứng được tạo ra bằng CDR ghép đột biến nghịch/thuận dựa trên tổ hợp VH4_3 và VK1_10 của khung dòng mầm người đối với dòng vô tính 299.

Ví dụ 13

Phương pháp xác định ái lực của thụ thể TfR ở người/khi đầu chó

Trong ví dụ này, phương pháp xác định ái lực của thụ thể transferrin ở người để so sánh hoạt động phân ly được nêu sơ lược.

Đối với toàn bộ phân tích, bộ kit Biotin CAPture từ GE Healthcare (Instruction 28-9242-34 AB) được sử dụng. Trước tiên, chip được hydrat hóa lại bằng cách nối nó trong công cụ BIAcore T200. Sau đó, chip được để yên với chất đệm vận hành qua đêm. Để xây dựng bề mặt, chất phản ứng Biotin CAPture được pha loãng với tỷ lệ 1:100 trong chất đệm vận hành (1xPBS, được bổ sung NaCl 0,25M). Dung dịch này được phun trên tế bào dòng chảy 1 đến 4 trong 360 giây với tốc độ dòng chảy là 2 μ L/phút. Tiếp đó, bề mặt cảm biến được điều hòa với ba lần phun dung dịch tái tạo mỗi lần một phút được cung cấp trong bộ kit Biotin CAPture. Bước này phải được thực hiện đối với quy trình nối hoặc đối với lần đầu tiên hoặc sau bảo quản. Dung dịch thụ thể transferrin được mono-biotinyl hóa 100nM lần lượt của người hoặc khi đầu chó nên được phun trên tế bào dòng chảy 2 trong 30 giây ở tốc độ dòng chảy là 10 μ L/phút. Để xác định ái lực, áp dụng phun với sáu nồng độ (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 và 0 nM). Chúng được phun trên “tế bào dòng chảy hu-TfR” (ví dụ, tế bào dòng chảy 2 như được chuẩn bị như được nêu sơ lược trên đây) với thời gian phun là 180 giây (kết hợp) và tốc độ dòng chảy là 10 μ L/phút. Sau pha phân ly 600 giây, bề mặt được tái tạo theo chỉ dẫn của nhà sản xuất với dung dịch tái tạo được cung cấp trong bộ kit Biotin CAPture và chu kỳ tiếp theo được tiến hành.

Dữ liệu động học được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá BIAcore T200. Đặc biệt là hằng số tốc độ phân ly của các chất gắn kết thụ thể transferrin ở người khác nhau được xem xét sau khi áp dụng mô hình liên kết Langmuir 1:1.

Ví dụ 14

Xếp hạng tương đối B4000 sự phân ly của thụ thể transferrin ở người/ khi đầu chó

Chíp cảm biến CAP (được cung cấp trong bộ kit Biotin CAPture, series S #28-9202-34 GE) được lắp vào hệ thống BIAcore B4000, được chuẩn hóa và xử lý theo cách thủy động học, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trong chu kỳ thứ nhất, chất phản ứng CAP (như được cung cấp trong bộ Kit) được chuyển đến điểm 1, 2, 4 và 5 với tốc độ dòng chảy là 10 μ L/phút trong 300 giây. Việc bắt thụ thể transferrin ở người diễn ra ở điểm 1 (thụ thể transferrin ở người-được biotinyl hóa) và điểm 5 (thụ thể transferrin ở khi đầu chó-được biotinyl hóa) với tốc độ dòng chảy là 10 μ L/phút và thời gian tiếp xúc là 30 giây. Các thụ thể được pha loãng đến nồng độ bằng 50nM với chất đệm vận hành (1xPBS #28995084, GE Healthcare, được bổ sung NaCl 0,25M). Kháng thể được phun vào tất cả các tế bào dòng chảy ở dãy nồng độ là 100nM, 50nM, 25nM và 0nM trong 180 giây ở tốc độ dòng chảy là 30 μ L/phút. Thời gian phân ly được thiết lập là 300 giây. Việc tái tạo toàn bộ phức hợp từ chíp CAP được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch tái tạo được cung cấp trong bộ kit Biotin CAPture (120 giây với tốc độ dòng chảy là 10 μ L/phút). Để kiểm soát nồng độ protein hoạt tính, chu kỳ thứ hai được thực hiện ở điểm 5 bằng cách sử dụng protein A được biotinyl hóa (#P2165-2MG, Sigma) với tốc độ dòng chảy là 10 μ L/phút và thời gian tiếp xúc là 30 giây. Điểm 1 được để trống trong chu kỳ kiểm soát này. Kháng thể và việc tái tạo được xử lý như trong chu kỳ 1. Dữ liệu động học tương đối được tính bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá BIAcore B4000. Mức phân ly từ thụ thể transferrin ở người được xác định áp dụng kỹ thuật khớp phân ly 1:1.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được làm giống như của người gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người, trong đó kháng thể này chứa
các HVR của SEQ ID NO: 66, 68 và 72 trong miền biến đổi chuỗi nặng,
và
các HVR của SEQ ID NO: 75, 76 và 78 trong miền biến đổi chuỗi nhẹ.
2. Kháng thể được làm giống như của người theo điểm 1, bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37.
3. Kháng thể được làm giống như của người theo điểm 1, trong đó kháng thể được làm giống như của người gắn kết đặc hiệu với thụ thể transferrin ở người và với thụ thể transferrin ở khỉ đầu chó.
4. Kháng thể được làm giống như của người theo điểm 1, trong đó kháng thể được làm giống như của người là kháng thể đa đặc hiệu có ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết đối với thụ thể transferrin ở người và ít nhất một tính đặc hiệu gắn kết đối với đích trị liệu.
5. Kháng thể được làm giống như của người theo điểm 4, trong đó kháng thể được làm giống như của người bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên thứ nhất gắn kết thụ thể transferrin ở người và vị trí gắn kết kháng nguyên thứ hai gắn kết kháng nguyên nào.
6. Kháng thể được làm giống như của người theo điểm 5, trong đó kháng thể được làm giống như của người là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm:
 - i) vị trí gắn kết thứ nhất gắn kết với thụ thể transferrin ở người và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 24 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 37,
và
 - ii) vị trí gắn kết thứ hai
 - a) gắn kết với Abeta và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 81 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 82, hoặc
 - b) gắn kết với alpha-synuclein và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 83 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 84, hoặc

- c) gắn kết với alpha-synuclein và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 85 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 86, hoặc
- d) gắn kết với alpha-synuclein và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 87 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 88, hoặc
- e) gắn kết với alpha-synuclein và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 91 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 92, hoặc
- f) gắn kết với alpha-synuclein và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 89 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 90, hoặc
- g) gắn kết với alpha-synuclein và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 93 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 94, hoặc
- h) gắn kết với CD20 và bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 79 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 80.

7. Kháng thể được làm giống như của người theo điểm 1, trong đó kháng thể được làm giống như của người là

- a) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người, hoặc
- b) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người, hoặc
- c) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người với các đột biến L234A, L235A và P329G,
- d) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P, L235E và tùy ý là P329G,
- e) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG1 ở người với 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 còn lại tương ứng, hoặc
- f) kháng thể có độ dài đầy đủ của phân lớp IgG4 ở người với các đột biến S228P, L235E và tùy ý là 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 còn lại tương ứng.

8. Kháng thể được làm giống như của người theo điểm 1, trong đó kháng thể được làm giống như của người bao gồm:

i) vùng Fc homodime của phân lớp IgG1 ở người tùy ý là với các đột biến P329G, L234A và L235A, hoặc

ii) vùng Fc homodime của phân lớp IgG4 ở người tùy ý là với các đột biến P329G, S228P và L235E, hoặc

iii) vùng Fc homodime trong đó:

a) một polypeptit của vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc

b) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc

c) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C,

hoặc

iv) vùng Fc heterodime của phân lớp IgG4 ở người trong đó cả hai polypeptit của vùng Fc đều chứa các đột biến P329G, L234A và L235A và

a) một polypeptit của vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc

b) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc

c) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C,

hoặc

v) vùng Fc heterodime của phân lớp IgG4 ở người trong đó cả hai polypeptit của vùng Fc đều chứa các đột biến P329G, S228P và L235E và

a) một polypeptit của vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc

b) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc

c) một polypeptit của vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit của vùng Fc còn lại chứa các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C.

9. Dược phẩm chứa kháng thể được làm giống như của người theo điểm 1 và chất mang được dùng.

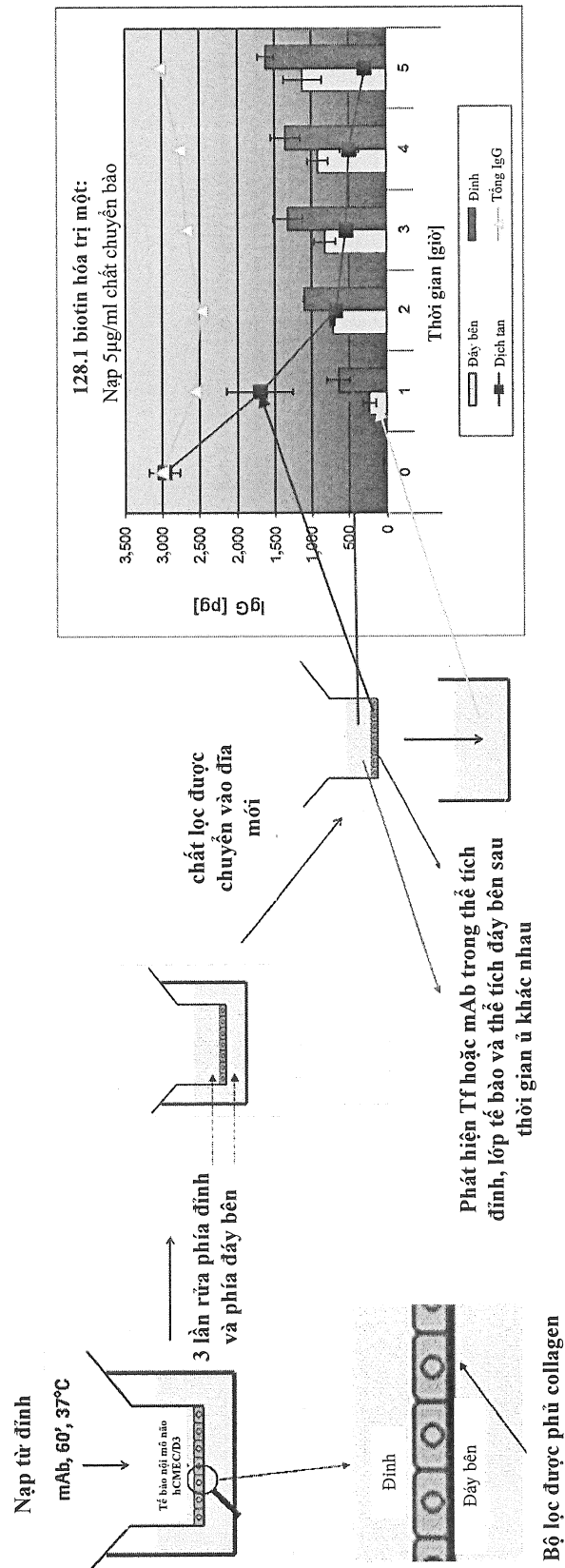
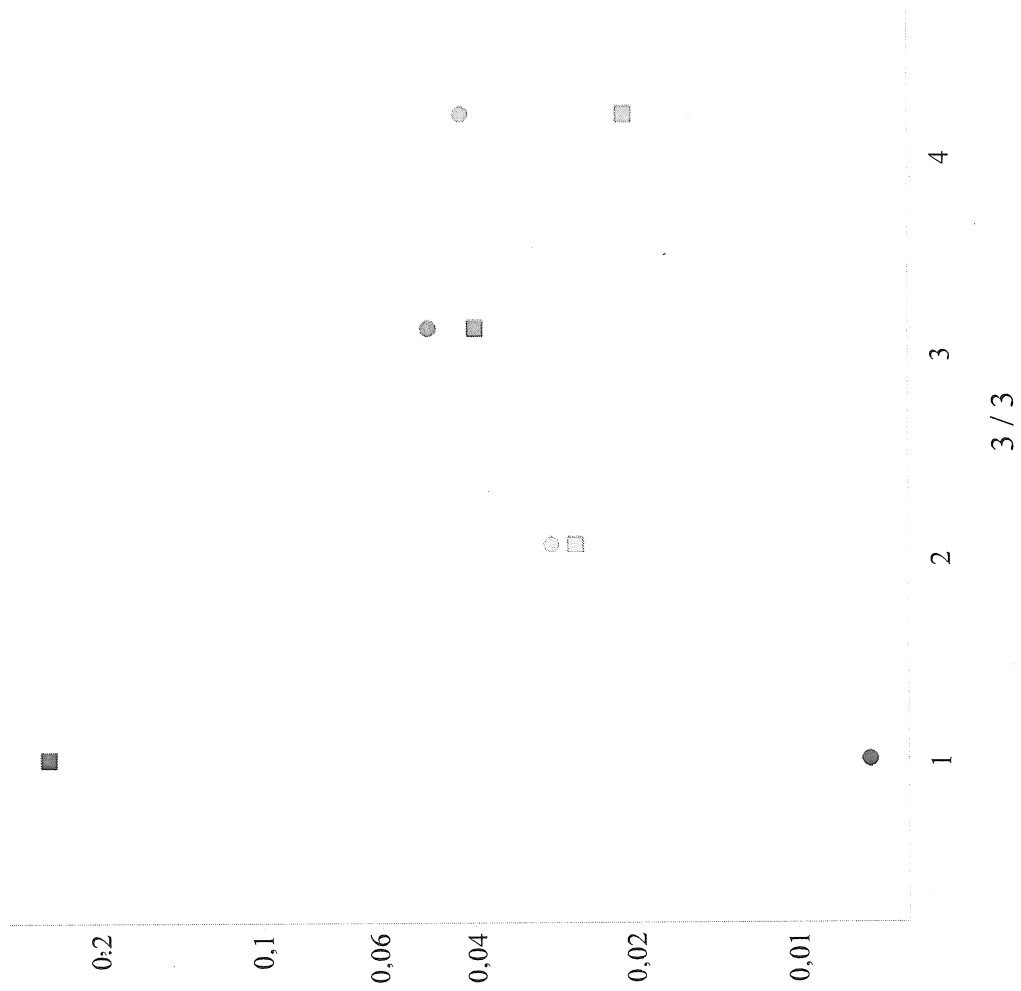


Fig.1

Fig.2



Fig.3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC LÀM GIỐNG NHƯ CỦA NGƯỜI GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI THỤ THỂ TRANSFERRIN Ở NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHẪM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P32937

<150> EP15173508.1

<151> 2015-06-24

<150> EP15176084.0

<151> 2015-07-09

<160> 97

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 1

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

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

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 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 Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Tyr
85 90 95

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

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mAb kháng TfR 567 VH (=h299 VH_bazơ được làm giống như của người)

<400> 2

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

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

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 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 Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Tyr
85 90 95

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

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-001 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-002 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu 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

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

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

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

Arg Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe
100 105 110

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-005 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-006 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-007 biến thể được làm giống như của người VH_DANG

<400> 7

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

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

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 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 Gly
50 55 60

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-008 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 8

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

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

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala 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 Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
65 70 75 80

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VH_DANG

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VH_DASG

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VH_DAGG

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Gln Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-011 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-012 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 13

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

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

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

Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe
100 105 110

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 14
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-013 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 14

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

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

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

Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe
 100 105 110

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-015 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 15

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-016 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 16

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-017 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 17

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-018 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 18

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

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe
100 105 110

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 19
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 299-019 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 19

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 Pro Ser Leu Lys Ser
 50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-020 biến thể được làm giống như của người VH

<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 Pro Ser Leu Lys Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-021 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 21

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 Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-022 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 22

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 Val 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 Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
65 70 75 80

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

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-023 biến thể được làm giống như của người VH_DANG

<400> 23

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 Asn Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-023 biến thể được làm giống như của người VH_DASG

<400> 24

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> 25

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-023 biến thể được làm giống như của người VH_DAQG

<400> 25

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 Gln Gly Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 26

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

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 27
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> mAb kháng TfR 567 VL (=299 VL_bazơ được làm giống như của người)

<400> 27

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

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 567 biến thể được làm giống như của người VL_PNYA

<400> 28

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

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Ala Asp Ala 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 Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 29

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-001 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-002 biến thể được làm giống như của người VL_SYS

<400> 30

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

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

Leu Asn 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 Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 31

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-003 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 31

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

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

Leu Asn 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 Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
 85 90 95

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

<210> 32
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-004 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 32

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

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

Leu Ser 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 Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
 85 90 95

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

<210> 33
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-005 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 33

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

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

Leu Ser 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 Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 34

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-006 biến thể được làm giống như của người VL_SYS

<400> 34

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 Ser 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 Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 35

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-007 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 35

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 Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 36

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-008 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 36

Ala Tyr 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 Ser 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 Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
 85 90 95

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

<210> 37

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VL_NYA

<400> 37

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> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VL_SYA

<400> 38

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 Ser 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> 39

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VL_NYS

<400> 39

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 Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 40

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VL_GYS

<400> 40

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 Gly Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 41

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-009 biến thể được làm giống như của người VL_CYS

<400> 41

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 Cys Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 42

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-010 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 42

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

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

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

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

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

<210> 43

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-012 biến thể được làm giống như của người VL_HYS

<400> 43

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser 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 Arg 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 His Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 44

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-014 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 44

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

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

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 45

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-015 biến thể được làm giống như của người VL_AYS

<400> 45

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Ser Ser Asn
 85 90 95

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

<210> 46

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-017 biến thể được làm giống như của người VL_TYS

<400> 46

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 Thr Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

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

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Cys Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 494 biến thể VH D52A

<400> 48

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

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

Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 494 biến thể VH D52L

<400> 49

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Leu Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 494 biến thể VH D31G

<400> 50

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

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

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

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

Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 494 biến thể VH L101A

<400> 51

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 52
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 494-001 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 53
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 494-002 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 494-003 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 494-004 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 55

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 494-005 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 56

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 494-006 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 57

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Ser Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Ala Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 494-007 biến thể được làm giống như của người VH

<400> 58

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

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

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

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

Gln Val Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 59

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

Glu Arg Val Thr Leu Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 494-001 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 60

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

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr 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 Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 494-002 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 62

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 494-003 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 62

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 63

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 494-004 biến thể được làm giống như của người VL

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

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

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

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 65

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 66

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 67

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 68
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 68

Trp Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 69
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 69

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-000 HVR-H2 Kabat G65S

<400> 70

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 71

Arg	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ala	Asn	Gly	Phe	Asp
1				5					10					15	

Pro

<210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-000 HVR-H3 DASG

<400> 72

Arg	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp
1				5					10					15	

Pro

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-000 HVR-H3 DAQG

<400> 73

Arg	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ala	Gln	Gly	Phe	Asp
1				5					10					15	

Pro

<210> 74
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 74

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-000 HVR-L1 RAA

<400> 75

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 76

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 77

Gln Gln Cys Tyr Ser Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-000 HVR-L3 NYA

<400> 78

Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
1 5 10

<210> 79
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH kháng thể kháng CD20

<400> 79

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL kháng thể kháng CD20

<400> 80

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 81

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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> 82
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82

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> 83
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể kháng alpha synuclein được làm giống như của người 9E4 VH

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 84

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kháng thể kháng alpha synuclein được làm giống như của người 9E4 VL

<400> 84

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

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

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 85
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 85

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

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

Trp Met Asn Trp Ile Lys Ala Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 86

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 86

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser
 20 25 30

Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
 100 105 110

<210> 87
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 87

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

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

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

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

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser
115

<210> 88
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 88

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

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Phe Leu Ile Cys Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 89
<211> 115
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 89

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

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

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

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

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp
 85 90 95

Gly Thr Asp Lys Thr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Leu
 115

<210> 90

<211> 112

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 90

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

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

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

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Glu Phe Leu Cys Thr
85 90 95

Thr Ser Asp Cys Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gly Val Val Val Arg
100 105 110

<210> 91

<211> 119

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 91

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

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

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

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

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Thr
85 90 95

Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Gln Gly Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
115

<210> 92

<211> 111

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 92

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln
65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp
85 90 95

Ala Asp Met Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 93

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miễn biến đổi chuỗi nặng

<400> 93

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asp Thr
20 25 30

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

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

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

Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95

Asn Phe Ser Val Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
100 105 110

<210> 94

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền biến đổi chuỗi nhẹ

<400> 94

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

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

Arg Leu Ala Trp Phe Gln Gln Met Arg Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
35 40 45

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

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

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser
85 90 95

Ser Ala Glu Cys Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 95

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 96

<211> 32

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tác nhân liên kết peptit

<400> 96

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

<210> 97

<211> 536

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser
 1 5 10 15

Arg Val Ser Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln
 20 25 30

Ala Val Ser Trp Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe
 35 40 45

Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser
 50 55 60

Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu
 65 70 75 80

Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln
 85 90 95

Ala Asn His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln
 100 105 110

Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala
 115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu
 130 135 140

Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val
 145 150 155 160

Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp
 165 170 175

Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp
 180 185 190

Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln
 195 200 205

Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu
 210 215 220

Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro
 225 230 235 240

Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu
 245 250 255

Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu
 260 265 270

Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu
 275 280 285

Gly Phe Thr Pro Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly
 290 295 300

Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu
 305 310 315 320

Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr
 325 330 335

Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr
 340 345 350

Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg
 355 360 365

Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser
 370 375 380

Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met
 385 390 395 400

Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly
 405 410 415

Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp
 420 425 430

Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp
 435 440 445

Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys
 450 455 460

Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys
 465 470 475 480

Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val
 485 490 495

Val Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys
 500 505 510

Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile
515 520 525

His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg Gln
530 535