



(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)



1-0033551

(51)⁷ A61K 38/00; C12N 5/16; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2017-00304

(22) 26/06/2015

(86) PCT/US2015/038002 26/06/2015

(87) WO2015/200806 30/12/2015

(30) 62/018,436 27/06/2014 US; 62/080,903 17/11/2014 US; 62/170,036 02/06/2015 US

(45) 25/10/2022 415

(43) 25/05/2017 350A

(73) C2N DIAGNOSTICS LLC (US)

Center for Emerging Technologies, 4041 Forest Park Avenue, Saint Louis, MO
63108, United States of America

(72) WEST, Tim (US); ATHWAL, Diljeet, S. (GB); JONES, Timothy, D. (GB); CARR,
Francis, J. (GB); HOLGATE, Robert, George, Edward (GB).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG TAU ĐƠN DÒNG ĐƯỢC PHÂN LẬP

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng tau đơn dòng được phân lập, kháng thể này chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự được chọn từ các trình tự axit amin được nêu ở đây. Kháng thể được phân lập này là hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh lý tau ở đối tượng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các lĩnh vực các kháng thể được làm giống như của người và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết với tau và các phương pháp sử dụng các kháng thể này để điều trị các bệnh lý tau. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến kháng thể được làm giống như của người và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với các epitop đặc hiệu của tau và ngăn chặn sự gieo mầm tau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nói chung, các bệnh lý tau có sự tích tụ của protein tau bị phosphoryl hóa quá mức, không hoàn tan trong não. Trên 20 kiểu rối loạn thoái hóa thần kinh khác nhau được đặc trưng bằng mức độ thoái hóa sợi thần kinh nhất định và có thể được phân loại thành các bệnh lý tau (Williams 2006). Các bệnh lý tau nguyên mẫu, như bệnh liệt trên nhân tiến triển (progressive supranuclear palsy: PSP) và bệnh thoái hóa hạch nền vỏ não (corticobasal degeneration: CBD) được đặc trưng bằng các thể vùi tau là các tổn thương hệ thần kinh trung ương duy nhất hoặc nổi trội. Các bệnh lý tau nguyên mẫu khác với các bệnh lý tau khác ở chỗ các khối kết tụ tau được phát hiện với sự có mặt của các dấu hiệu bệnh lý thần kinh khác, như các mảng amyloid beta (A β) được phát hiện ở bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease: AD) hoặc các thể Lewy được phát hiện ở bệnh Parkinson (Parkinson's disease: PD). Ở các bệnh lý tau không nguyên mẫu này, càng không chắc chắn liệu bệnh lý tau thể hiện là yếu tố dẫn dắt bệnh nguyên phát hay nó là thứ phát đối với quá trình xoắn không chính xác protein khác và sự thoái hóa thần kinh.

Bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP, còn được biết như là hội chứng Steele-Richardson-Olszewski) là rối loạn thoái hóa thần kinh tiến triển, với tỷ lệ mắc hàng năm ước đoán là 5 đến 7 trên 100.000 người (Golbe 2014). Trong nước Mỹ, bệnh này ảnh hưởng đến khoảng 20.000 cá nhân. Tần suất mắc bệnh PSP không có sự khác biệt rõ ràng về địa lý, dân tộc, giới tính, hoặc chủng tộc. PSP đầu tiên có thể thể hiện các triệu chứng lâm sàng tương tự như các rối loạn não khác, bao gồm bệnh Parkinson tự

phát. Với lý do này, việc chẩn đoán chính xác bệnh PSP đôi khi bị chậm trễ, thường diễn ra 1 đến 3 năm sau khi bắt đầu khởi phát các triệu chứng lâm sàng. Sự khởi phát triệu chứng thường xuyên nhất là ở độ tuổi từ 50 đến 70 tuổi và mặc dù khóa điều trị lâm sàng thay đổi, thời gian sống sót điển hình từ khi khởi phát triệu chứng là 5 đến 9 năm (Houghton, 2007). Mặc dù có sự không đồng nhất ở biểu hiện lâm sàng, hội chứng PSP được mô tả ban đầu và thông thường nhất, hiện nay được gọi là hội chứng Richardson, là sự thể hiện của tính không ổn định tư thế nổi bật và cứng đờ trực dẫn đến ngã, liệt chức năng nhìn chằm chằm trên nhân (supranuclear gaze palsy) gây ra khoảng suy giảm tầm nhìn, sa sút trí tuệ trán-dưới vỏ, và chứng khó nuốt dẫn đến sự hút. Diễn biến bệnh là tiến triển và tử vong cùng kiểu (Williams and Lees 2009).

Về mặt bệnh lý học, PSP được đặc trưng bằng sự tích tụ bất thường của các khối kết tụ protein tau phosphoryl quá mức, không hòa tan trên các tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm trong thân não, tiểu não, hạch nền, và vỏ não (Williams and Lees 2009). Mức độ và sự phân bố mức kết tụ tau ở bệnh PSP có tương quan mạnh mẽ với triệu chứng PSP trong đời sống (Schofield et al. 2012). Viện nghiên cứu rối loạn thần kinh quốc gia và Hiệp hội bệnh liệt trên nhân tiến triển (National Institute of Neurological Disorders - Society for Progressive Supranuclear Palsy: NINDS-SPSP) đã nghiên cứu các tiêu chuẩn mô tả hội chứng Richardson là có tính dự báo cao về bệnh lý PSP cơ sở (Litvan et al. 1996). Tổn thất tế bào thần kinh ở các vùng khác nhau của não đi kèm với các đám rối sợi thần kinh (neurofibrillary tangle: NFT) mà bao gồm các khối kết tụ tau. Nhiều bất thường về chất dẫn truyền thần kinh cũng nảy sinh, bao gồm các bất thường ảnh hưởng đến các hệ dopamin, cholin, GABA, và noradrenalin cụ thể.

Hiện chưa có phương pháp điều trị được phê chuẩn đối với bệnh PSP (Stamelou et al. 2010). Kết quả tiêu cực của các nghiên cứu hiệu lực trị liệu trên PSP đã loại trừ khuyến nghị liệu pháp chuẩn trên cơ sở dấu hiệu (Boxer et al. 2014). Do không có các liệu pháp bảo vệ thần kinh hoặc cải biến bệnh một cách hữu hiệu bất kỳ, PSP thể hiện là một nhu cầu y tế cấp thiết chưa được đáp ứng.

Bệnh Alzheimer (AD) là bệnh thoái hóa thần kinh tiến triển mạn tính chung trong đó có sự mất mát không hồi phục các chức năng nhận thức và hành vi. Bệnh này

có thể kéo dài trên 10 năm, tiến triển từ các triệu chứng nhẹ đến các biểu hiện cực kỳ nặng. AD được cho là mắc phải ở mức khoảng 10% dân số có độ tuổi trên 65 tuổi và ở mức trên 30% dân số có độ tuổi trên 80 tuổi. Bản thân bệnh Alzheimer thể hiện về mặt bệnh lý học là các mảng amyloid ngoại bào và các đám rối sợi thần kinh nội bào. Các đám rối sợi thần kinh bao gồm, ví dụ, protein liên kết vi cấu trúc hình ống tau, protein này được lắp ráp thành các cặp sợi xoắn và thẳng. Đã có gợi ý rằng các tổ chức này có thể được liên kết về mặt chức năng, mặc dù các cơ chế mà qua đó sự lắng đọng amyloid thúc đẩy sự lắp ráp sợi tau bệnh lý, hoặc ngược lại, là không rõ ràng.

Các cấu trúc sợi thần kinh nội bào của các bệnh lý tau (các đám rối sợi thần kinh, các sợi trục loạn dưỡng, và các sợi mạng lưới thần kinh) có các cặp sợi xoắn (paired helical filament: PHF). Phân đơn vị protein chính của các PHF là protein tau kết hợp với vi cấu trúc hình ống dưới dạng phosphoryl quá mức bất thường. Các tế bào thần kinh với các thay đổi sợi thần kinh thoái hóa, và mức độ thoái hóa này tương quan một cách trực tiếp với mức độ sa sút trí tuệ ở các cá nhân bị bệnh.

Các bệnh lý tau khác đã biết là có thể vùi tế bào dạng sợi chứa protein tau kết hợp với vi cấu trúc hình ống bao gồm bệnh Pick (Pick's disease: PiD), nhóm các rối loạn liên quan được gọi chung là bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương với chứng bệnh Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (amyotrophic lateral sclerosis: ALS), bệnh Creutzfeldt-Jakob (Creutzfeldt-Jakob disease: CJD), sa sút trí tuệ chấn thương não (dementia pugilistica: DP), bệnh Gerstmann-Strausler-Scheinker (Gerstmann-Strausler-Scheinker disease: GSSD), bệnh thể Lewy, bệnh não chấn thương mạn tính (chronic traumatic encephalopathy: CTE), và bệnh Huntington. Mặc dù căn bệnh học, các triệu chứng lâm sàng, các phát hiện bệnh lý và các thành phần sinh hóa của các thể vùi tế bào dạng sợi trong các bệnh này là khác nhau nhưng có dấu hiệu nổi trội gợi ý rằng các cơ chế liên quan đến sự kết tụ của các protein tế bào bình thường để tạo thành các thể vùi dạng sợi khác nhau là có thể so sánh. Sự biến đổi ban đầu ở cấu tạo của protein tau kết hợp với vi cấu trúc hình ống được tin là tác động làm khơi mào sự sản sinh các nhân hoặc các mầm để lắp ráp sợi, là một trong số các dấu hiệu chủ chốt. Quy trình này có thể bị ảnh hưởng bởi sự sửa đổi sau dịch mã của các protein bình thường, bằng sự đột biến hoặc sự khuyết

đoạn của các gen nhất định và bằng các yếu tố mà liên kết với các protein bình thường và do đó làm thay đổi cấu tạo của chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà liên kết một cách đặc hiệu với tau. Kháng thể hoặc mảnh này gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), và mỗi vùng VH và VL này có trình tự được chọn từ các trình tự axit amin nêu trên Fig.1 và Fig.2. Cụ thể hơn, vùng VL có thể có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 4 [VK1, VK2, VK3, và VK4], và vùng VH có thể có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8 [VH1, VH2, VH3, và VH4]. Theo một số phương án, vùng VL có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2 [VK2] và vùng VH có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 5 [VH1]. Theo một số phương án, kháng thể gồm vùng Fc, mà có thể là IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 người hoặc các biến thể của chúng, như IgG4 người có sự đột biến ổn định hóa vùng bản lề S241P. Kháng thể có thể gồm vùng ổn định chuỗi nhẹ kiểu phụ kappa người hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này là scFv hoặc Fab. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này là kháng thể hoặc mảnh được làm giống như của người hoặc kháng thể hoặc mảnh khảm. Kháng thể hoặc mảnh này có thể là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này cạnh tranh với HJ8.5 trong việc liên kết đặc hiệu với protein tau của người. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này liên kết với protein tau của người với hằng số phân ly cân bằng (Kd) ít nhất là 10^{-4} M.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu có nhiều vùng liên kết kháng nguyên. Ít nhất một vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc mảnh đa đặc hiệu liên kết với protein tau của người. Cách khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép có hai vùng liên kết kháng nguyên được đề xuất. Một trong số các vùng liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc mảnh đặc hiệu kép này liên kết với protein tau của người. Cách khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được đề xuất trong đó một nhánh của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này cạnh tranh với HJ8.5 trong

việc liên kết đặc hiệu với protein tau của người. Cách khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép được đề xuất trong đó một nhánh của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó mỗi vùng VH và VL có trình tự được chọn từ các trình tự axit amin được nêu trên Fig.1 và Fig.2.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên nêu trên có thể còn chứa tải lượng độc tính, tùy ý thể liên hợp thuốc, hoặc nuclit phóng xạ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập mà mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên nêu trên, hoặc vùng VH hoặc vùng VL được nêu trên Fig.1 hoặc Fig.2. Vector (như vector biểu hiện) chứa phân tử axit nucleic này có thể được đề xuất. Tế bào chủ được phân lập chứa vector này có thể được đề xuất. Tế bào chủ này có thể là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn, như tế bào của động vật có vú.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm. Dược phẩm này chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên nêu trên, hoặc phân tử axit nucleic như được nêu ở đây, và chất mang được dụng.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất trình tự axit amin được phân lập chứa trình tự của một trong số các chuỗi nhẹ như được nêu trên Fig.1 và Fig.2. Cách khác hoặc ngoài ra, sáng chế còn đề xuất trình tự axit amin được phân lập chứa trình tự của một trong số các chuỗi nặng như được nêu trên Fig.1 và Fig.2.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được làm giống như của người được phân lập mà liên kết đặc hiệu với epitop chứa trình tự axit amin DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này có thể chứa các CDR của các vùng VH và VL là từ kháng thể cho. Theo một số phương án, kháng thể này chứa vùng Fc, ví dụ, vùng Fc này là của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 hoặc biến thể của chúng. Vùng Fc này có thể là IgG4 người hoặc

biến thể của nó, IgG4 người này có sự đột biến ổn định hóa vùng bản lề S241P. Kháng thể có thể gồm vùng ổn định chuỗi nhẹ kiểu phụ kapa người hoặc các biến thể của chúng. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này là scFv hoặc Fab. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này là kháng thể hoặc mảnh được làm giống như của người hoặc kháng thể hoặc mảnh khảm. Kháng thể hoặc mảnh này có thể là kháng thể đơn dòng. Kháng thể hoặc mảnh này có thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép trong đó một nhánh của kháng thể hoặc mảnh này liên kết một cách đặc hiệu với epitop chứa trình tự axit amin DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa một trong số các kháng thể hoặc mảnh nêu trên liên kết với gốc trị liệu hoặc có thể phát hiện được.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được làm giống như của người được phân lập mà liên kết đặc hiệu với epitop chứa trình tự axit amin GYTMHQDQ (SEQ ID NO: 10). Kháng thể hoặc mảnh này có thể có các CDR của các vùng VH và VL từ kháng thể cho. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này chứa vùng Fc, như vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 hoặc biến thể của chúng. Vùng Fc này có thể là IgG4 người hoặc các biến thể của nó có sự đột biến ổn định hóa vùng bản lề S241P. Kháng thể này có thể chứa vùng ổn định của chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này là scFv hoặc Fab. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép cũng được đề xuất trong đó một nhánh của kháng thể này liên kết một cách đặc hiệu với epitop chứa trình tự axit amin GYTMHQDQ (SEQ ID NO: 10). Theo một số phương án, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể hoặc mảnh bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh nêu trên được liên kết với gốc trị liệu hoặc có thể phát hiện được.

Theo khía cạnh thêm nữa, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh lý tau ở đối tượng, bao gồm việc cho người cần điều trị bệnh lý tau dùng một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh được mô tả ở đây. Các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được dùng trong các điều kiện và với lượng hữu hiệu để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh lý tau. Bệnh lý tau khác có thể là một hoặc nhiều trong số các bệnh như bệnh Alzheimer (AD), bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP), bệnh thoái hóa hạch nền vỏ não (CBD), bệnh Pick (PiD), nhóm các rối loạn liên quan được gọi chung là

bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương với chứng bệnh Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (ALS), bệnh Creutzfeldt-Jakob (CJD), sa sút trí tuệ chấn thương não (DP), bệnh Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSSD), bệnh thể Lewy, bệnh não chấn thương mạn tính (CTE), hoặc bệnh Huntington.

Phương pháp được đề xuất để điều trị bệnh lý tau bao gồm cho đối tượng cần điều trị dùng kháng thể hoặc mảnh kháng tau, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này liên kết một cách đặc hiệu với tau và gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó mỗi vùng VH và VL có trình tự được chọn từ các trình tự axit amin nêu trên Fig.1 và Fig.2, và kháng thể hoặc mảnh này được dùng cho đối tượng với liều nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg đến khoảng 250mg/kg, theo cách khác là từ 1mg/kg đến khoảng 25mg/kg. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh này có vùng VL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 4 [VK1, VK2, VK3, và VK4]; cách khác hoặc ngoài ra, kháng thể hoặc mảnh này còn có vùng VH chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 5, 6, 7 và 8 [VH1, VH2, VH3, và VH4].

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các trình tự vùng biến đổi của kháng thể HJ8.5 chuột cũng như 4 trình tự biến thể được làm giống như của người đối với mỗi chuỗi trong số các chuỗi nặng và nhẹ (4 trình tự VH và 4 trình tự VL/VK). Fig. 1 thể hiện các trình tự đối với MuVL (SEQ ID NO:11); VK1 (SEQ ID NO:1); VK2 (SEQ ID NO:2); VK3 (SEQ ID NO:3); VK4 (SEQ ID NO:4); MuVH (SEQ ID NO:12); VH1 (SEQ ID NO:5); VH2 (SEQ ID NO:6); VH3 (SEQ ID NO:7); VH4 (SEQ ID NO:8).

[0001] Fig.2A thể hiện trình tự của vùng biến đổi và ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VH1 (SEQ ID NO:13). Fig. 2B thể hiện trình tự của vùng biến đổi và vùng ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VH2 (SEQ ID NO:14). Fig. 2C thể hiện trình tự của vùng biến đổi và vùng ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VH3 (SEQ ID NO:15). Fig. 2D thể hiện trình tự của vùng biến đổi và vùng ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VH4 (SEQ ID NO:16). Chuỗi nặng biến đổi được ghép vào chuỗi nặng ổn định của IgG4 người có sự đột biến ổn định hóa vùng bản lề S241P. Fig. 2E thể hiện

trình tự của vùng biến đổi và vùng ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VL1 (SEQ ID NO:17). Fig. 2F thể hiện trình tự của vùng biến đổi và vùng ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VL2 (SEQ ID NO:18). Fig. 2G thể hiện trình tự của vùng biến đổi và vùng ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VL3 (SEQ ID NO:19). Fig. 2H thể hiện trình tự của vùng biến đổi và vùng ổn định được làm giống như của người đối với chuỗi nặng VL4 (SEQ ID NO:20).

Fig.3 thể hiện dữ liệu biểu hiện từ hai vòng biểu hiện tạm thời các tế bào được chuyển nhiễm bằng các polynucleotit mã hóa các vùng VH và VK. Kết quả được tổng kết cho 13 kháng thể kháng tau được làm giống như của người dựa trên các tổ hợp khác nhau của các vùng biến đổi nặng và nhẹ được làm giống như của người, với các mức biểu hiện khác nhau được quan sát.

Fig.4 thể hiện dữ liệu từ thử nghiệm hiệu lực mà đánh giá khả năng của các kháng thể kháng tau theo sáng chế trong việc cạnh tranh với HJ8.5 gốc của chuột (kháng thể mẹ) để liên kết với tau người trong thử nghiệm kiểu ELISA.

Fig.5 tổng kết kết quả từ phương pháp phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance: SPR), xác định động lực liên kết của sáu cấu trúc được làm giống như của người biểu hiện tốt nhất đối với tau người.

Fig.6 thể hiện liên kết của bốn biến thể kháng thể được làm giống như của người với tau người hòa tan trong thử nghiệm ELISA kiểu kẹp.

Fig.7A đến 7H thể hiện liên kết của các kháng thể được làm giống như của người và đối chứng với mô từ chuột nhất kiểu đại (mô đối chứng âm), chuột nhất P301S (mà biểu hiện tau người có sự đột biến P301S và phát triển bệnh lý tau kết hợp với độ tuổi), và người bị bệnh Alzheimer hoặc bị bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Fig.7A. thể hiện liên kết của thể khảm (đối chứng dương) với mô chuột nhất và người; FIG.7B. thể hiện liên kết của IgG4 người không đặc hiệu (đối chứng âm) với mô chuột nhất và người. Fig.7C. thể hiện liên kết của VH1/VK2 với mô chuột nhất và người. Fig.7D. thể hiện liên kết của VH1/VK3 với mô chuột nhất và người. Fig.7E. thể hiện liên kết của VH2/VK2 với mô chuột nhất và người. Fig.7F. thể hiện liên kết của

VH2/VK3 với mô chuột nhắt và người. Fig.7G. thể hiện liên kết của VH3/VK2 với mô chuột nhắt và người. Fig.7H. thể hiện liên kết của VH3/VK3 với mô chuột nhắt và người.

Fig.8 thể hiện sự lập bản đồ epitop đối với kháng thể chuột HJ8.5 kháng lại trình tự axit amin của tau người. Fig. 8 thể hiện các trình tự tau ở người, khi rezut và chuột nhắt (SEQ ID NO: 21, 22, 23, tương ứng).

Fig.9 thể hiện sự lập bản đồ epitop dựa trên peptit chi tiết đối với HJ8.5 và C₂N-8E12 . Sự lập bản đồ này chỉ ra rằng epitop liên kết của C₂N-8E12 là ₂₅DQGGYT₃₀ (SEQ ID NO: 9) và khớp với epitop của HJ8.5 gốc của chuột. Fig. 9 thể hiện trình tự của các peptit PEP_2875800 đến PEP_2875830 (SEQ ID NO:24 đến 54, tương ứng).

Fig.10 minh họa kết quả liên kết của các kháng thể kháng tau người khác nhau với tau người hoặc khi nâu. Kết quả này chứng minh rằng C₂N-8E12 và HJ8.5 không liên kết với tau khi nâu trong khi chúng thể hiện là liên kết tích cực với tau người. HJ8.7 liên kết với cả tau người và tau khi nâu.

Fig.11 thể hiện liên kết của kháng thể kháng tau được làm giống như của người với tau ở CSF (dịch não tủy: cerebrospinal fluid) từ người bị các bệnh lý tau khác nhau. Liên kết của C₂N-8E12 với tau trên các mẫu CSF từ các đối tượng được chẩn đoán bị các bệnh lý tau khác nhau được đánh giá.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dấu hiệu thử nghiệm mạnh và cơ sở sinh học hợp lý hiện có đã ủng hộ chiến lược miễn dịch trị liệu tau như là cách để chống lại bệnh lý tau trong bệnh thoái hóa thần kinh. Thứ nhất là, tau thường là protein nội bào, vốn không cuộn gấp, có tính hòa tan cao, do đó kháng thể ngoại bào là không thể tác động đến các chức năng bình thường của tau. Thứ hai là, gánh nặng bệnh lý tau có tương quan với sự loạn năng thần kinh tiến triển, sự mất xi nập, và sự suy giảm chức năng ở các mô hình bệnh lý tau trên người và chuột chuyển gen. Thứ ba là, trong các điều kiện bệnh lý, tau trở nên được cuộn gấp không chính xác và kết tụ thành các đám rối sợi thần kinh nội thần kinh (NFT) gồm các sợi tau bệnh lý. Đối với các bệnh lý tau ở người, bệnh lý này tiến triển từ một vùng não đến vùng khác theo kiểu hình đặc hiệu với bệnh. Dữ liệu thử nghiệm

gợi ý rằng các khối kết tụ tau có thể lan rộng từ tế bào này đến tế bào khác làm gây ra sự kết tụ tau thêm nữa và sự lan rộng bệnh lý tau ở não. Dữ liệu này gợi ý rằng các khối kết tụ được tạo ra ở một tế bào được giải phóng vào không gian ngoại bào và có thể thúc đẩy sự kết tụ ở tế bào lân cận hoặc tế bào kết nối. Cuối cùng là, lĩnh vực kỹ thuật hiện có đã chứng minh rằng các kháng thể kháng tau có thể ngăn ngừa hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh lý ở não của chuột nhắt mà mang dạng tau người được đột biến.

“Kháng thể được làm giống như của người” là kháng thể hoặc biến thể, dẫn xuất, chất tương tự hoặc mảnh của nó mà đã được sửa đổi để giảm nguy cơ kháng thể không phải của người này gây ra đáp ứng miễn dịch ở người sau khi dùng. Kháng thể được làm giống như của người, như được sử dụng ở đây, liên kết một cách đặc hiệu miễn dịch với epitop giống hoặc tương tự như kháng thể không phải của người (kháng thể cho). Theo một số phương án, kháng thể được làm giống như của người chứa vùng khung (framework region: FR) về cơ bản là có trình tự axit amin của kháng thể người và vùng quyết định bổ trợ (complementary determining region: CDR) về cơ bản là có trình tự axit amin của kháng thể không phải của người. Thuật ngữ “về cơ bản” trong ngữ cảnh của CDR dùng để chỉ CDR có trình tự axit amin giống ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của CDR kháng thể không phải của người. Kháng thể được làm giống như của người về cơ bản là bao gồm ít nhất một, và điển hình là hai, miền biến đổi (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người (nghĩa là, kháng thể cho) và tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các vùng khung là các vùng khung của trình tự tương đồng globulin miễn dịch của người. Tốt hơn là, kháng thể được làm giống như của người còn bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định globulin miễn dịch (Fc), điển hình là một phần của vùng ổn định globulin miễn dịch của người. Sáng chế đề xuất kháng thể được làm giống như của người mà chứa vùng khung mới.

Theo một số phương án, kháng thể được làm giống như của người chứa đồng thời chuỗi nhẹ cũng như ít nhất là miền biến đổi của chuỗi nặng. Kháng thể này có thể còn bao gồm các vùng CH1, vùng bản lề, vùng CH2, CH3, và CH4 của chuỗi nặng.

Theo một số phương án, kháng thể được làm giống như của người chỉ chứa chuỗi nhẹ được làm giống như của người. Theo một số phương án, kháng thể được làm giống như của người chỉ chứa chuỗi nặng được làm giống như của người. Theo các phương án cụ thể, kháng thể được làm giống như của người chỉ chứa miền biến đổi được làm giống như của người của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng được làm giống như của người.

Kháng thể có thể được lựa chọn từ nhóm các globulin miễn dịch bất kỳ, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và kiểu phụ bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Kháng thể được làm giống như của người có thể bao gồm các trình tự từ nhiều hơn một nhóm hoặc kiểu phụ, và các miền ổn định cụ thể có thể được lựa chọn để tối ưu hóa chức năng tác động mong muốn bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm gồm: Fv liên kết disulfua, kháng thể đơn dòng, mảnh biến đổi chuỗi đơn (single-chain variable fragment: scFv), kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, diabody, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể đa đặc hiệu, Fab (mảnh liên kết kháng nguyên: fragment antigen-binding), kháng thể đặc hiệu kép, F(ab')₂ (mảnh liên kết kháng nguyên, hai nhánh thường được điều chế bằng cách phân cắt kháng thể bằng pepsin), Fab' (kết quả của việc phân chia F(ab')₂ thành hai mảnh liên kết kháng nguyên, thường bằng cách khử nhẹ), hoặc Fv (mảnh biến đổi liên kết kháng nguyên).

Thuật ngữ “kháng thể khảm” chỉ các kháng thể mà chứa các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ từ một loài và các trình tự vùng ổn định từ loài khác, ví dụ như các kháng thể có các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của chuột được liên kết với các vùng ổn định của người.

“Vùng VH”, “vùng VL” hoặc “vùng VK” lần lượt chỉ vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH), vùng biến đổi của chuỗi nhẹ lamda (VL) hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kapa (VK). Các vùng VH và VL có thể được chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định bổ trợ (CDR), đặt rải rác với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc kiểu bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE,

IgM, IgD, IgA và IgY) và nhóm bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm bất kỳ.

Thuật ngữ “khung” hoặc “trình tự khung” dùng để chỉ các trình tự còn lại của vùng biến đổi trừ đi các CDR. Do định nghĩa chính xác của trình tự CDR có thể được xác định bởi các hệ thống khác nhau, nghĩa của trình tự khung được hiểu khác nhau theo cách tương ứng. Sáu CDR (CDR-L1, -L2, và -L3 của chuỗi nhẹ và CDR-H1, -H2, và -H3 của chuỗi nặng) cũng chia các vùng khung trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thành bốn phân vùng (FR1, FR2, FR3 và FR4) trên mỗi chuỗi, trong đó CDR1 nằm giữa FR1 và FR2, CDR2 nằm giữa FR2 và FR3, và CDR3 nằm giữa FR3 và FR4. Không chỉ rõ các phân vùng cụ thể như FR1, FR2, FR3 hoặc FR4, vùng khung, như được đề cập đến bởi các tài liệu khác, là các FR kết hợp trong vùng biến đổi của chuỗi globulin miễn dịch đơn có trong tự nhiên. FR là một trong bốn phân vùng, và các FR là hai hoặc nhiều hơn hai trong số bốn phân vùng tạo thành vùng khung.

Nhiều globulin miễn dịch được làm giống như của người mà đã được mô tả (Jones et al., Verhoeven et al., Riechmann et al.) gồm khung mà giống như khung của chuỗi globulin miễn dịch cụ thể của người, vùng nhận, và ba CDR từ chuỗi globulin miễn dịch cho không phải của người. Kháng thể “kháng tau được làm giống như của người” dùng để chỉ kháng thể mà đã được sinh ra từ kháng thể (thể cho) không phải của người có khả năng liên kết với tau và liên kết này được truyền cho kháng thể người (thể nhận).

Thuật ngữ “CDR” dùng để chỉ vùng quyết định hỗ trợ trong các trình tự biến đổi của kháng thể. Có ba CDR trong mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, chúng được gọi là CDR1, CDR2 và CDR3, cho mỗi vùng biến đổi. Các trình tự axit amin của các CDR của các vùng VH và VL/K theo sáng chế được trình bày trên FIG.1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ Fv chuỗi đơn, còn gọi là kháng thể chuỗi đơn, được dùng để chỉ các cấu trúc kháng thể được xử lý được điều chế bằng cách phân lập các miền liên kết (cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) của kháng thể liên kết, và cung cấp gốc liên kết mà cho phép bảo tồn chức năng liên kết. Nhóm liên kết peptit được xen đoạn giữa hai chuỗi cho phép ổn định hóa các miền biến đổi mà không can thiệp vào sự cuộn gấp hợp lý và sự tạo ra vị trí liên kết hoạt tính. Nhóm liên kết này

có thể có chiều dài từ 5 đến 30 axit amin và thường gồm các đoạn lặp trình tự axit amin “GGGGS” ((Gly)4Ser) (SEQ ID NO:55). Về bản chất, điều này tạo ra kháng thể được rút ngắn triệt để, chỉ có miền biến đổi cần thiết để liên kết kháng nguyên.

Các diabody, triabody, và tetrabody và các biến thể bậc cao hơn thường được tạo ra bằng cách thay đổi độ dài của nhóm liên kết peptit nêu trên, từ không đến vài axit amin. Các biến thể này là các kháng thể đa hóa trị, đa đặc hiệu trong đó các miền VH và VL được biểu hiện trên chuỗi polypeptit, nhưng bằng cách sử dụng nhóm liên kết mà quá ngắn để cho phép cặp đôi giữa hai miền trên cùng một chuỗi, nhờ đó buộc những miền này cặp đôi với miền bổ cứu của chuỗi còn lại và tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên (xem, ví dụ, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Các phần liên kết kháng thể như vậy là đã biết trong lĩnh vực này (Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. New York. p. 790 (ISBN 3-540-41354-5). Cách khác, cũng đã biết rõ trong lĩnh vực này là các biến thể kháng thể liên kết đa hóa trị có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các đơn vị tự lắp ráp được liên kết với miền biến đổi.

Các kháng thể đặc hiệu kép, đặc hiệu ba hoặc đa đặc hiệu được tạo ra bằng cách tổ hợp các chuỗi nặng và nhẹ của một kháng thể với các chuỗi nặng và nhẹ của một hoặc nhiều kháng thể khác. Các chuỗi này có thể được liên kết cộng hóa trị. Ví dụ, thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu kép” được dùng để chỉ các kháng thể có chiều dài đầy đủ mà được tạo ra bằng kỹ thuật quadroma (xem Milstein and Cuello (1983) *Nature* 305(5934): 537-40), bằng cách liên hợp hóa học hai kháng thể đơn dòng khác nhau (xem Staerz et al. (1985) *Nature* 314(6012): 628-31), hoặc bằng phương pháp gắn nút vào lỗ (knob-into-hole) hoặc phương pháp tương tự mà đưa các thể đột biến vào vùng Fc (xem Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(14): 6444-6448), dẫn đến nhiều loại globulin miễn dịch khác nhau trong đó chỉ có một globulin miễn dịch là kháng thể có chức năng đặc hiệu kép. Bằng chức năng phân tử, kháng thể đặc hiệu kép liên kết với một kháng nguyên (hoặc epitop) trên một trong hai nhánh liên kết của nó (một cặp HC/LC), và liên kết với kháng nguyên khác (hoặc epitop khác) trên nhánh thứ hai của nó (cặp HC/LC khác). Kháng thể đặc hiệu kép có hai nhánh liên kết kháng

nguyên riêng biệt (ở cả trình tự CDR và trình tự đặc hiệu), và có hóa trị một đối với mỗi kháng nguyên mà nó liên kết.

Chuỗi các kháng thể chuột có khả năng liên kết với tau đã được đưa ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Xem Holtzman et al., WO2014/08404. Hơn nữa, các kháng thể này đã được sàng lọc để nhận diện các kháng thể có hoạt tính sinh học đặc hiệu mà khiến chúng có thể là các ứng viên thích hợp cho các ứng dụng trị liệu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể phức hợp được làm giống như của người. Kỹ thuật Composite Human Antibody™ đã tạo ra các kháng thể được làm giống như của người bằng cách nhận diện các epitop tế bào T tiềm năng trong các trình tự vùng biến đổi (vùng V) của kháng thể cho và xử lý các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên theo cách sao cho liên kết với các epitop tế bào T tiềm năng được loại trừ (Xem EP2,388,871). Không giống như các kỹ thuật làm giống như của người khác mà sử dụng khung vùng V chuỗi nặng và nhẹ duy nhất của người hoặc khung tương đồng của người làm các ‘vùng nhận’ chuỗi nặng và nhẹ cho các vùng quyết định bổ trợ tương ứng (complementarity determining region: CDR) từ kháng thể cho (thường là chuột); Composite Human Antibodies™ chứa nhiều đoạn trình tự (các “phức hợp”) thu được từ các vùng V của nhiều kháng thể người không liên quan.

Các đoạn trình tự thu được từ các cơ sở dữ liệu của các vùng V người không liên quan được lựa chọn sau khi xác định các axit amin mà được xem như là có tính quyết định đối với việc liên kết kháng nguyên của kháng thể ban đầu. Tất cả các đoạn trình tự được chọn thu được từ các cơ sở dữ liệu vùng V người được lọc về sự có mặt của các epitop tế bào T CD4+ tiềm năng sử dụng công cụ *in silico* đã biết trong lĩnh vực này. Composite Human Antibodies™ vẫn giữ ái lực và độ đặc hiệu tốt hơn các kháng thể chuẩn được làm giống như của người do sự khớp chặt của các đoạn trình tự người với tất cả các phần của các vùng V kháng thể ban đầu. Composite Human Antibodies™ được làm nghèo các epitop tế bào T và do đó được xem như là được làm giống như của người và cả được khử gây miễn dịch.

Theo một phương án, các vùng biến đổi của chuột từ kháng thể cho thay thế các vùng biến đổi của người trong IgG nhận của người dẫn đến thu được kháng thể

khảm.

Theo phương án khác, các trình tự CDR của chuột từ kháng thể cho thay thế các trình tự CDR trong IgG nhận của người, để tạo ra kháng thể được làm giống như của người. Các thay đổi khác được kết hợp vào kháng thể được làm giống như của người để loại bỏ các epitop tế bào T tiềm năng và các gốc của khung được xem như là có tính quyết định đối với việc duy trì các đặc tính liên kết của kháng thể cho. Chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các phương pháp khác như ghép CDR có thể được sử dụng để làm cho kháng thể giống như của người.

Theo phương án khác nữa, các kháng thể không phải của người có khả năng liên kết với tau người được làm giống như của người.

Các kháng thể theo sáng chế có thể thể hiện ái lực liên kết thay đổi và/hoặc khả năng sinh miễn dịch thay đổi so với các kháng thể cho. Theo một số phương án, các kháng thể khảm hoặc được làm giống như của người về cơ bản là có ái lực liên kết với epitop của tau giống như kháng thể cho.

Theo phương án khác, mảnh biến đổi chuỗi đơn dựa trên kháng thể được làm giống như của người như được nêu ở đây, ví dụ, kháng thể kháng tau được làm giống như của người, có thể liên kết dưới dạng monome.

Theo phương án khác, liên kết đa hóa trị, sử dụng các mảnh kháng thể có thể đạt được bằng cách sử dụng các diabody, triabody, tetrabody, và các biến thể bậc cao hơn khác, mà có thể được điều chế.

Theo phương án thêm nữa, chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể kháng tau được làm giống như của người có thể được tổ hợp với các chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể khác để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu bổ sung khác.

Ngoài các kháng thể được làm giống như của người theo sáng chế, ví dụ, kháng thể kháng tau được làm giống như của người có thể còn ở dưới dạng mảnh kháng thể, ví dụ, monome Fab, Fab', dime F(ab)'₂, hoặc toàn bộ phân tử globulin miễn dịch.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất peptit được phân lập chứa trình tự axit amin, DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Peptit này là epitop nhân đối với các kháng thể

được mô tả ở đây như C₂N-8E12 hoặc HJ8.5. Theo một khía cạnh của sáng chế, peptit này gồm X₍₀₋₈₎DQGGYTX₍₀₋₈₎ (SEQ ID NO: 56) trong đó X là axit amin bất kỳ. Mặc dù ví dụ minh họa thể hiện 15 mers (xem FIG.11), nhưng chuyên gia có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng peptit có độ dài khác nhau cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Do đó, các kháng thể hoặc các mảnh theo sáng chế có thể liên kết một cách đặc hiệu với epitop chứa trình tự axit amin DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Epitop có thể là các epitop tuyến tính hoặc cấu dạng và có thể có chiều dài khoảng từ 6 đến 22 axit amin.

Theo phương án khác, các phương pháp theo sáng chế đề cập đến việc điều trị bệnh lý tau bằng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên, trong đó kháng thể hoặc mảnh này được dùng dưới dạng liều cho đối tượng bị bệnh lý tau.

Các liều thích hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này có thể biểu thị dưới dạng mg thuốc trên kg trọng lượng cơ thể của đối tượng. Liều thích hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này bao gồm ít nhất khoảng 0,1 mg/kg, theo cách khác khoảng 0,2 mg/kg, theo cách khác khoảng 0,25 mg/kg, theo cách khác khoảng 0,3 mg/kg, theo cách khác khoảng 0,5 mg/kg, theo cách khác khoảng 0,75 mg/kg, theo cách khác khoảng 1 mg/kg, theo cách khác khoảng 1,25 mg/kg, theo cách khác khoảng 1,5 mg/kg, theo cách khác khoảng 2 mg/kg, theo cách khác khoảng 5 mg/kg, theo cách khác khoảng 7,5 mg/kg, theo cách khác khoảng 10 mg/kg, theo cách khác khoảng 12,5 mg/kg, theo cách khác khoảng 15 mg/kg, theo cách khác khoảng 20 mg/kg, theo cách khác khoảng 25 mg/kg, theo cách khác khoảng 30 mg/kg, theo cách khác khoảng 50 mg/kg, theo cách khác khoảng 100 mg/kg. Liều thích hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này có thể tối đa khoảng 250 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 200 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 175 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 150 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 125 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 100 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 75 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 50 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 25 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 20 mg/kg, theo cách khác tối đa khoảng 15 mg/kg. Trị số bất kỳ trong số các trị số tối thiểu và tối đa nêu trên có thể được kết hợp với nhau để xác định một khoảng (ví dụ, từ khoảng 0,1 mg/kg đến khoảng 250 mg/kg),

miễn là trị số tối thiểu của khoảng này là thấp hơn trị số tối đa của khoảng này.

Các liều thích hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này có thể biểu thị dưới dạng mg thuốc được dùng cho đối tượng. Các liều thích hợp của kháng thể được làm giống như của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này bao gồm ít nhất khoảng 2,5 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 5 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 10 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 15 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 20 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 25 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 30 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 40 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 50 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 60 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 70 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 80 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 90 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 100 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 125 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 150 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 175 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 200 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 250 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 300 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 350 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 400 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 450 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 500 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 550 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 600 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 650 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 700 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 750 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 800 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 850 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 900 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 950 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1000 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1050 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1100 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1150 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1200 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1250 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1300 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1350 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1400 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1450 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1500 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1550 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1600 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1650 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1700 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1750 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1800 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1850 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1900 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 1950 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2000 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2050 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2100 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2150 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2200 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2250 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2300 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2350 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2400 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2450 mg, theo cách khác ít nhất khoảng 2500 mg. Trị số bất kỳ trong số các trị số tối thiểu và tối đa nêu trên có thể được kết hợp với nhau để xác định một khoảng (ví dụ, từ khoảng 5 mg đến khoảng 2500 mg), miễn là trị số tối thiểu của khoảng này là thấp hơn trị số tối đa của khoảng này.

C₂N-8E12 là kháng thể IgG4 kháng tau người tái tổ hợp được làm giống như của người. Khung IgG4 của C₂N-8E12 chứa sự đột biến ổn định hóa vùng bản lề S241P mà tối thiểu hóa sự tạo thành các bán kháng thể. C₂N-8E12 liên kết với các axit amin 25-30 trong tau người (DQGGYT) (SEQ ID NO: 9), trình tự mà có mặt trong tất cả các biến thể ghép nối tau người cũng như trong các mảnh đầu amino của tau. Kháng thể này liên kết với cả tau monome và tau kết tụ trong mô não người bị các bệnh lý tau. C₂N-8E12 là khá ổn định với sự kết tụ và thoái hóa rất ít. Các tính chất vật lý nói

chung của C₂N-8E12 được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1

Khối lượng phân tử	145,72 kDa
Hóa học lập thể	Các L-axit amin
Bề ngoài	Chất lỏng trong, không màu đến màu vàng nhạt
Độ hòa tan	~130 mg/mL

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mặc dù sáng chế đã được mô tả liên quan đến các ví dụ kèm theo nhưng cần hiểu rằng các cải biến và các biến đổi là nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế. Phần kèm theo đây là các ví dụ minh họa của sáng chế và toàn bộ nội dung của chúng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 1

Ví dụ này mô tả các nỗ lực và các kết quả của quy trình làm giống như của người đối với kháng thể kháng tau chuột HJ8.5. Các nỗ lực đã tạo ra bốn vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống như của người (VL hoặc VK) và bốn vùng biến đổi chuỗi nặng được làm giống như của người (VH).

Quy trình làm giống như của người nói chung dùng để chỉ các kỹ thuật làm giảm khả năng sinh miễn dịch tiềm năng mà đi kèm với việc sử dụng kháng thể đơn dòng không phải của người để điều trị mạn tính. Hai phương pháp thường được dùng để giảm khả năng sinh miễn dịch là ghép CDR và sự khử gây miễn dịch. Kháng thể chuột HJ8.5 được khử gây miễn dịch bằng cách sử dụng phương pháp được phát triển bởi Antitope.

Ghép CDR là phương pháp xử lý protein. Ngắn gọn là, nó dựa vào cả việc hiểu biết kiến trúc cơ sở của kháng thể và sự bảo toàn kiến trúc này qua các loài. Các kháng thể chuột và các kháng thể người có kiến trúc chung/được bảo toàn giống nhau. Cấu trúc kháng thể được chia thành các vùng ổn định và các vùng biến đổi. Vùng biến đổi có thể còn được chia thành các vùng khung và các vùng CDR. Có thể thấy rằng vùng

biến đổi bao gồm bốn khung (framework: Fwk) và ba CDR. Việc sắp xếp các khung và các CDR là giống nhau ở các miền biến đổi trên chuỗi nhẹ và nặng.

Trong quá trình ghép CDR, các vùng ổn định không phải của người được thay thế bằng các vùng ổn định của người, tạo ra kháng thể khảm. Ngoài ra, các vùng CDR của chuột được truyền vào các vùng khung của người; miền biến đổi thu được là hỗn hợp của các khung của người và các CDR của chuột. Bước cuối cùng là, một số gốc trong khung của chuột, được cho là đóng vai trò quyết định trong việc duy trì ái lực, được truyền vào (không được thể hiện).

Bước khử gây miễn dịch: Kỹ thuật Composite Human Antibody™ của Antitope được nêu là kỹ thuật khử gây miễn dịch mà được sử dụng cùng với việc nhận diện cả các CDR và các axit amin chủ chốt trong khung được cho là đóng vai trò trong việc liên kết. Các kháng thể được làm giống như của người đầy đủ thu được vẫn giữ ái lực liên kết và độ đặc hiệu của kháng thể đơn dòng ban đầu và còn không có các epitop tế bào T CD4+, điều này tránh được khả năng sinh miễn dịch không mong muốn ở người.

Composite Human Antibodies™ được tạo ra bằng cách tổ hợp nhiều đoạn của các trình tự kháng thể người từ cơ sở dữ liệu của Antitope gồm hàng 100.000 trình tự của các trình tự vùng biến đổi kháng thể người đầy đủ không liên quan. Việc mô hình hóa ban đầu đối với các trình tự vùng biến đổi của kháng thể HJ8.5 được sử dụng để nhận diện các axit amin có tính quyết định đối với liên kết kháng thể, sau đó các axit amin này được sử dụng để ràng buộc việc chọn lựa các đoạn trình tự người. Các đoạn trình tự riêng lẻ và các mối nối giữa các đoạn liên tiếp sau đó được phân tích bằng cách sử dụng hai kỹ thuật *in silico* thích hợp (iTope™ và TCED™) để chọn lựa các trình tự vùng biến đổi đầy đủ của người mà không có các epitop tế bào T CD4+. ADN mã hóa các vùng biến đổi đối với Composite Human Antibodies được tổng hợp, tách dòng trên vectơ biểu hiện với các vùng ổn định của người và được chuyển nhiễm vào các tế bào động vật có vú để tạo ra các kháng thể được làm giống như của người.

Bước làm giống như của người đối với HJ8.5: Các mô hình cấu trúc của các vùng V kháng thể HJ8.5 chuột kháng Tau412 được tạo ra bằng cách sử dụng Swiss PDB và được phân tích để nhận diện các axit amin "ràng buộc" quan trọng trong các vùng V mà dường như là thiết yếu đối với các tính chất liên kết của kháng thể. Từ việc

phân tích này, số gốc khung ràng buộc được nhận diện như là các ứng cử viên để đưa vào các vùng V được làm giống như của người đầy đủ. Các đoạn của các trình tự vùng biến đổi của người được chọn lọc để chứa một hoặc nhiều gốc này.

Tập hợp sơ cấp các đoạn trình tự người mà có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể HJ8.5 được làm giống như của người đầy đủ được chọn và được phân tích sử dụng kỹ thuật iTope™ để phân tích *in silico* sự liên kết của peptit với các alen MHC nhóm II của người (Perry *et al* 2008), và sử dụng TCED™ (Cơ sở dữ liệu epitop tế bào T: T Cell Epitope Database) gồm các epitop tế bào T có liên quan đến trình tự của kháng thể đã biết (Bryson *et al* 2010). Các đoạn trình tự mà được nhận diện như là các chất kết dính dòng mầm đáng kể không phải của người với MHC nhóm II của người hoặc được ghi nhận là tác động đáng kể chống lại TCED™ được loại bỏ. Các tổ hợp của các đoạn trình tự cũng được phân tích để đảm bảo rằng các mối nối giữa các đoạn không chứa các epitop tế bào T tiềm năng. Sau đó các đoạn được chọn được tổ hợp để tạo ra các trình tự vùng V chuỗi nặng và nhẹ để tổng hợp. Đối với HJ8.5, bốn chuỗi VH và bốn chuỗi Vk được thiết kế và xây dựng.

Fig.1 thể hiện các trình tự vùng biến đổi của kháng thể HJ8.5 chuột cũng như 4 trình tự biến thể được làm giống như của người đối với mỗi chuỗi trong số các chuỗi nặng và nhẹ (4 trình tự VH và 4 trình tự VL/VK). Các trình tự axit amin của bốn chuỗi VH này và bốn chuỗi Vk được thể hiện trên FIG.1. Các trình tự CDR, như được định nghĩa bởi Kabat *et al* được bôi màu đỏ (được gạch chân). Các thay đổi khung so với trình tự ban đầu của chuột nhất được bôi màu xanh da trời và bôi đậm.

Bảng B-1 tổng kết số các thay đổi khung được đưa vào trong mỗi biến thể của các miền biến đổi chuỗi nặng và nhẹ.

Bảng B-1

Miền biến đổi	Số các thay đổi khung
VH1	4
VH2	5
VH3	10
VH4	11

VK1	6
VK2	7
VK3	11
VK4	12

Fig.2 thể hiện các trình tự của vùng biến đổi và ổn định được làm giống như của người đối với mỗi chuỗi trong số các chuỗi nặng và nhẹ (4 trình tự VH và 4 trình tự VL/VK). Chuỗi nặng biến đổi được ghép vào chuỗi nặng ổn định của IgG4 người có sự đột biến ổn định hóa vùng bản lề S241P. Chuỗi nhẹ biến đổi được ghép vào chuỗi nhẹ ổn định của chuỗi nhẹ Kapa người. Bảng này còn liệt kê điểm đẳng điện lý thuyết (PI) và trọng lượng phân tử (Mw).

Fig.3 thể hiện dữ liệu biểu hiện từ hai vòng biểu hiện tạm thời các tế bào được chuyển nhiễm bằng các polynucleotit mã hóa các vùng VH và VK. Các kết quả đối với 13 kháng thể kháng tau được làm giống như của người được tổng kết. Các tổ hợp khác của các chuỗi nặng và nhẹ dẫn đến các mức biểu hiện thấy được là khác biệt rõ rệt. Ở vòng 1, tất cả các biến thể của các vùng VH và VL được tổ hợp với nhau (kết quả của chỉ 13 tổ hợp được thể hiện trong số 16 tổ hợp được thử nghiệm). Ở vòng 2, 6 tổ hợp biểu hiện tốt nhất được quan sát ở vòng 1 được đem thử nghiệm. Mức biểu hiện được thể hiện dưới dạng μg kháng thể đo được trên mL môi trường nuôi cấy. Các mức biểu hiện cao hơn là có lợi vì nó gợi ý rằng kháng thể được cuộn gấp chính xác, được tiết như mong đợi, không độc và thường ổn định.

Fig.4 thể hiện dữ liệu từ thử nghiệm hiệu lực. Để đặc trưng thêm nữa các biến thể kháng thể kháng tau được làm giống như của người, thử nghiệm hiệu lực đánh giá khả năng của kháng thể trong việc cạnh tranh với HJ8.5 gốc của chuột (kháng thể mẹ) để liên kết với tau người trong thử nghiệm kiểu ELISA. Hình thức thử nghiệm này gồm bước phủ tau người lên đĩa ELISA và sau đó để các kháng thể thử nghiệm cũng như HJ8.5 được biotinyl hóa cạnh tranh với nhau để liên kết với tau. Thử nghiệm này cho phép đo được trị số IC50 tương đối đối với mỗi biến thể kháng thể được làm giống như của người. Các trị số IC50 được chuẩn hóa theo các trị số IC50 của HJ8.5 khả

để cho phép việc so sánh được thực hiện giữa các đĩa. Dữ liệu này chứng minh rằng quy trình làm giống như của người đã không làm thay đổi đáng kể liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với tau người.

Ví dụ 2

Thử nghiệm này mô tả việc sử dụng Biacore T200 để đo và so sánh các đặc tính liên kết của tương tác giữa sáu kháng thể đơn dòng được làm giống như của người đầy đủ (VH1/VK2, VH1/VK3, VH2/VK2, VH2/VK3, VH3/VK2 và VH3/VK3, được mô tả trên đây trong ví dụ 1) và một kháng thể đơn dòng khảm dựa trên HJ8.5 với protein Tau-412 tái tổ hợp của người. Mục đích của thử nghiệm này là sử dụng thiết bị cộng hưởng plasmon bề mặt Biacore T200 cho việc đặc trưng hóa động lực phân giải cao đối với các tương tác giữa Tau-412 và bẫy mAb này.

Các kháng thể được bảo quản ở 4°C. Tau-412 được bảo quản ở -20°C như theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi hoàn nguyên, dung dịch Tau-412 được bảo quản trên đá và được sử dụng trong vòng 24 giờ. Các phân ước Tau-412 đã hoàn nguyên được làm đông băng trong vòng 30 phút hoàn nguyên và được bảo quản ở -20°C.

Thiết bị Biacore được chạy trên phần mềm đánh giá Biacore T200 V1.1 (Uppsala, Sweden). Tất cả các vật liệu đều mua từ Biacore trừ khi được chỉ ra:

Kit duy trì phòng ngừa Biacore 2	BR-1006-51
Chip cảm biến CM5 Series S	BR-1006-68
Kit kết hợp amin	BR-1000-50
Dung dịch axetat 10mM, độ pH bằng 4,5	BR-1003-51
Dung dịch đệm chạy HBS-EP\	BR-1006-69
Dung dịch Glyxin-HCl 10mM, độ pH bằng 1,5	BR-1003-54
Dung dịch Glyxin-HCl 10mM, độ pH bằng 2,0	BR-1003-55
Protein A (Sigma)	P6031
Dung dịch MgCl ₂ hexahydrat 4M (Sigma)	M9272-500G

Tất cả các thử nghiệm được triển khai bằng phần mềm Biacore 'wizard'. Các phương pháp Biacore dưới đây được sử dụng: Cố định hóa; Động lực/Ái lực; và Giải hấp và Sát trùng.

Trước khi chạy các mẫu bất kỳ, và trong khi thử nghiệm, việc kiểm tra hệ thống (Kit duy trì phòng ngừa Biacore 2) được thực hiện. Tất cả các hệ thống được thử nghiệm đều đạt (bơm chất phản ứng, khúc xạ kế, bơm tiêm, tạp âm, bộ chọn dung dịch đệm và trộn) thể hiện rằng thiết bị đang tiến hành theo bộ tiêu chuẩn của nhà sản xuất.

Khi lồng chip CM5/Protein A vào, hệ thống được môi và sau đó được chuẩn hóa bằng dung dịch chuẩn hóa BIA (Kit duy trì phòng ngừa Biacore 2). Tất cả các mẫu được chạy ở 25°C với máng mẫu được ủ ở 5°C. Chip này được bổ sung vào hệ thống với HBS-EP được sử dụng làm dung dịch đệm chạy.

Các mAb được bảo quản dưới dạng được cung cấp và được pha loãng đến 100nM đối với tất cả các lần chạy cố định hóa (bắt giữ). Kháng nguyên Tau-412 được hoàn nguyên từ bột khô sử dụng nước Milli-Q đến nồng độ cuối cùng là 1mg/mL; các bước pha loãng hơn nữa được thực hiện để chạy động lực. Khối lượng và trọng lượng phân tử của Tau-412 được sử dụng trong bước tính nồng độ được cung cấp bởi nhà sản xuất chất phản ứng (100µg/lọ và 42,9kDa). Không bổ sung chất mang protein vào dung dịch này. Các lọ chứa kháng nguyên chỉ được hoàn nguyên khi cần thiết và được bảo quản dưới dạng bột của chúng ở -20°C cho đến khi sử dụng. Sau khi hoàn nguyên, dung dịch kháng nguyên được giữ trên đá và được sử dụng trong vòng 24 giờ.

Thử nghiệm bắt giữ bằng protein A được lựa chọn cho thử nghiệm này. Đặc tính của bề mặt Protein A là ưu việt hơn đặc tính bề mặt của protein A/G, protein G và protein L kháng người mà cũng được thử nghiệm. Chip Protein A được điều chế qua việc cố định hóa sử dụng phương pháp hóa học kết hợp amin chuẩn. Việc cố định hóa được thực hiện ở nồng độ protein là 5µg/mL trong dung dịch đệm acetat 10mM, độ pH bằng 4,5 đến mức đáp ứng đích là 500 RU trên chip cảm biến CM5 Series S (Biacore).

Các mức đáp ứng cuối cùng đối với chip Protein A 'All' và F_cs được thiết kế được thể hiện trong bảng G-1.

Bảng G-1

	Phối tử	Mức đáp ứng cuối cùng (RU)
F _c 1	Protein A	697,1
F _c 2	Protein A	691,4
F _c 3	Protein A	708,3
F _c 4	Protein A	704,6

Đối với các thử nghiệm động lực, lượng phối tử được cố định hóa/bắt giữ cần được giới hạn để tránh các hiệu ứng truyền khối ở bề mặt của chip. Đối với các thử nghiệm động lực, bề mặt nên lý tưởng là có mức liên kết chất phân tích tối đa ($R_{\max}$) là nằm trong khoảng từ 50 đến 100 RU. Do đó lượng phối tử cố định hóa được tính bằng cách sử dụng phương trình 1:

$$\text{khả năng liên kết chất phân tích (RU)} = \frac{MW_{\text{chất phân tích}}}{MW_{\text{phối tử}}}, \text{phối tử cố định hóa (RU)} \cdot S_m$$

Sử dụng MW trung bình là 42,9kDa (được cung cấp bởi nhà sản xuất chất phản ứng) cho chất phân tích Tau-412, 150kDa cho phối tử (trị số ước định đối với các kháng thể) (mAb), 100 RU cho $R_{\max}$, và hệ số tỷ lệ lượng hóa học (S_m) là 1, đích 300 RU được cài đặt để bắt giữ tất cả các kháng thể thử nghiệm. Mức bắt giữ thu được trong thử nghiệm này thay đổi từ khoảng 280 đến 400 RU. Đối với các lần chạy thứ hai và thứ ba, lượng kháng thể được tiêm được điều chỉnh để đạt gần hơn đến mức bắt giữ 300 RU mong muốn.

Liên kết không đặc hiệu có thể là do chất phân tích hoặc các tạp chất phân tích tương tác với phối tử (không đặc hiệu và khó phát hiện), protein bắt giữ, hoặc bề mặt chip cảm biến. Bằng cách phân tích đáp ứng của bề mặt F_c1 trống sau khi tiêm 300 giây Tau-412 với nồng độ tương đối cao (40nM), NSB không được thấy đối với bề mặt carboxy-dextran, hay bề mặt bắt giữ Protein A. Ở nồng độ Tau-412 > 100nM, NSB đáng kể được thấy đối với bề mặt chip carboxy-dextran; tuy nhiên các nồng độ trong khoảng này không cần thiết đối với việc phân tích động lực tiếp theo.

Hoạt động giám sát sự tái tạo được thực hiện và các điều kiện tối ưu đối với sự tái tạo kháng thể khảm và kháng thể VH1/VK2 trên bề mặt Protein A là như sau. Ba

lần bơm 240 giây dung dịch Glyxin-HCl 10mM độ pH bằng 1,7 được theo sau bằng một lần bơm 300 giây dung dịch $MgCl_2$ 4M, tất cả ở tốc độ $40\mu L/phút$. Bước chờ 600 giây được đưa vào sau bước tiêm tái tạo cuối cùng để cho phép bề mặt ổn định hóa trước khi bắt đầu chu trình liên kết tiếp theo.

Hoạt động giám sát dung dịch đệm không được thực hiện như các thử nghiệm ban đầu thể hiện dung dịch đệm được chọn 'HBS-EP' đã tạo ra hệ tái sản xuất được thích hợp cho phân tích động lực.

Đặc tính của bề mặt được phân tích bằng các lần tiêm đối chứng lặp lại Tau-412 2,5nM ở thời điểm ban đầu, cách quãng và ở thời điểm kết thúc quá trình chạy động lực. Liên kết ổn định được quan sát trên toàn bộ quá trình chạy động lực nêu bật tính thích hợp của hệ thống đối với việc phân tích động lực.

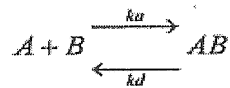
Giới hạn truyền khối diễn ra khi tỷ lệ kết hợp chứa thành phần đáng kể được kết hợp với tỷ lệ truyền chất phân tích đến và từ bề mặt chip. Khi sự truyền khối được phát hiện là đáng kể thì việc phân tích động lực thu được có thể là không chính xác. Việc làm giảm mật độ phối tử được cố định hóa, hoặc làm tăng tốc độ dòng, có thể làm giảm giới hạn truyền khối. Từ kinh nghiệm trước đây về việc sử dụng các bề mặt mật độ thấp và các kháng nguyên M_w tương tự, tốc độ dòng $40\mu L/phút$ được chọn cho thử nghiệm này.

Thử nghiệm đối chứng phản ứng liên kết được sử dụng để đánh giá tương tác phối tử-chất phân tích để kiểm tra sự lệch so với mô hình liên kết 1-đối-1. Chất phân tích được tiêm qua bề mặt trong các khoảng thời gian khác nhau (thời gian tiếp xúc) và tỷ lệ phân ly được phân tích để xác định liệu nó có thay đổi theo thời gian tiếp xúc hay không. Nếu mối quan hệ này được quan sát thấy thì nó đã chỉ ra rằng sự kiện tương tác lần thứ hai đang diễn ra sau sự kiện liên kết ban đầu điều này dẫn đến phức hợp được ổn định hóa ở bề mặt.

Từ kinh nghiệm trước đây về việc sử dụng các hình thức thử nghiệm bất giữ, hệ số tỷ lệ hóa học liên kết biểu kiến là 1,5 và mô hình 1-đối-1 có thể được khớp với độ tin cậy với dữ liệu động lực thu được, các đối chứng phản ứng liên kết không được thực hiện vì không có dấu hiệu bổ sung hỗ trợ các tương tác động lực phức hợp

hơn nữa.

Mô hình liên kết 1-đối-1 được sử dụng để khớp dữ liệu động lực thu được (Phương trình 2). Do các thay đổi về lượng kháng thể được bắt giữ nên thông số $R_{\max}$ được đặt cục bộ trái với phân tích toàn bộ đối với mỗi quá trình phân tích động lực kháng thể.



Đặc trưng hóa kháng thể: Việc đặc trưng hóa và các thử nghiệm đối chứng được thực hiện đối với bề mặt bắt giữ Protein A gợi ý đây là hệ thống thích hợp để xác định các trị số động lực đối với các tương tác Tau-412. Hệ số tỷ lệ lượng hóa học liên kết được đánh giá bằng cách tiêm nồng độ bão hòa của Tau-412 (1000nM) trên 277 RU của VH1/VK2 được bắt giữ trên bề mặt Protein A thử nghiệm. Hai lần tiêm tuần tự Tau-412 1000nM thể hiện là dẫn đến sự liên kết bão hòa ở 122 RU. Điều này đã dẫn đến hệ số tỷ lệ lượng hóa học liên kết là 150%, hệ số này là cao hơn mức trông đợi đối với một phân tử kháng thể liên kết với một phân tử Tau-412. Các nguyên nhân của điều này có thể gồm liên kết của kháng thể với hai phân tử Tau-412 hoặc sự oligome hóa Tau-412 trên bề mặt của chip.

Dữ liệu động lực được thu nhận ở tốc độ dòng 40 μ L/phút để tối thiểu hóa các hiệu ứng truyền khối tiềm năng bất kỳ. Hai lần lặp lại mẫu trống (không kháng nguyên) và nồng độ chất phân tích 2,5nM được lập trình thành quá trình chạy động lực để kiểm tra độ ổn định của cả bề mặt và chất phân tích trên khắp các chu trình động lực. Đối với các quá trình chạy động lực ban đầu, các dịch pha loãng 2 lần của Tau-412 từ 40nM đến 0,156nM được chạy. Đối với quá trình phân tích động lực và trên các quá trình chạy tiếp theo, khoảng chất phân tích từ 20nM đến 0,625nM được chọn. Khoảng này bao trùm nhiều nồng độ chất phân tích cả trên và dưới K_D được báo cáo.

Pha kết hợp được giám sát trong 500 giây để cho phép một số trong số các nồng độ chất phân tích cao hơn đạt đến trạng thái vững bền. Để quan sát sự giảm tín hiệu đủ (>10%) trong suốt pha phân ly của chu trình động lực, sự phân ly được đo trong 1200 giây. Như được bàn luận trong Phần 5, F_{cs} được cho phép ổn định hóa trong 600

giây sau mỗi bước tái tạo. Tín hiệu từ kênh tham chiếu F_c1 được trừ đi từ tín hiệu của F_c2, F_c3 và F_c4.

Các thông số động lực đối với tương tác của Tau-412 với 7 mAb như đo được sử dụng hệ thống bắt giữ Protein A trên Biacore T200 được thể hiện trong bảng F-2. Để hiệu chỉnh các chênh lệch về mức bắt giữ của kháng thể giữa mỗi chu trình liên kết, thông số R_{max} cục bộ được sử dụng trong mô hình liên kết 1-đôi-1. Phân tích động lực được thực hiện trong ba quy trình chạy độc lập sử dụng các sản phẩm điều chế mới của Tau-412 và kháng thể. Quy trình chạy 1 và các quy trình chạy 2+3 sử dụng các lọ khác nhau chứa kháng nguyên Tau-412; do đó các sai số được báo cáo được kết hợp với đáp ứng trung bình có thể thể hiện sự biến đổi trong quá trình điều chế chất phân tích và các khác biệt trong quá trình cài đặt và chạy thử nghiệm. Từ quy trình chạy 1 đến các quy trình chạy 2+3, lượng kháng thể được tiêm được điều chỉnh để cố gắng tiến gần hơn đến mức bắt giữ 300 RU đích. Đối với quy trình chạy 1, kháng thể khảm được chạy ba lần và kết quả phân tích tất cả ba bộ dữ liệu được thể hiện trong bảng F-2. % CV đối với K_D thu được từ ba bộ dữ liệu này là 4,3% thể hiện là các kết quả là trong mức biến đổi thử nghiệm.

Bảng F-2

Phối tử	Chip	k _a (1/Ms)	SE(k _a)	k _d <(1/s)	SE(k _d)	K _D (nM)	SD(K _D)	Chi ²	Phụ lục II
VH1/VK2	A11/1	2,80x10 ⁵	4,40x10 ³	6,11x10 ⁻⁴	2,80x10 ⁻⁷	2,18		1,28	A3-4
VH1/VK2	A11/3	3,25x10 ⁵	1,00x10 ³	6,32x10 ⁻⁴	8,20x10 ⁻⁷	1,95		0,44	A5-6
		k _a (1/Ms)	SD(k _a)	k _d <(1/s)	SD(k _d)	K _D (nM)	SD(K _D)(nM)		
Trung bình		3,02x10 ⁵	3,19x10 ⁴	6,21x10 ⁻⁴	1,48x10 ⁻⁵	2,06	0,17		
Phối tử	Chip	k _a (1/Ms)	SE(k _a)	k _d <(1/s)	SE(k _d)	K _D (nM)	SD(K _D)	Chi ²	Phụ lục II
VH1/VK3	A11/1	2,80x10 ⁵	9,10x10 ²	6,26x10 ⁻⁴	8,50x10 ⁻⁷	2,24		0,99	A7-8
VH1/VK3	A11/2	2,95x10 ⁵	4,40x10 ²	5,72x10 ⁻⁴	2,70x10 ⁻⁷	1,94		0,52	A9-10
		k _a (1/Ms)	SD(k _a)	k _d <(1/s)	SD(k _d)	K _D (nM)	SD(K _D)(nM)		
Trung bình		2,87x10 ⁵	1,07x10 ⁴	5,99x10 ⁻⁴	3,76x10 ⁻¹	2,09	0,21		

Phối tử	Chip	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	Chi^2	Phụ lục II
VH2/VK2	A11/1	$2,62 \times 10^5$	$4,30 \times 10^2$	$6,28 \times 10^{-4}$	$2,80 \times 10^{-7}$	2,40		0,83	A11-12
VH2/VK2	A11/2	$2,84 \times 10^5$	$4,10 \times 10^2$	$5,87 \times 10^{-4}$	$2,60 \times 10^{-7}$	2,06		0,70	A13-14
		$k_a(1/Ms)$	$SD(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SD(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)(nM)$		
Trung bình		$2,73 \times 10^5$	$1,59 \times 10^4$	$6,08 \times 10^{-4}$	$2,94 \times 10^{-5}$	2,23	0,24		
Phối tử	Chip	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	Chi^2	Phụ lục II
VH2/VK3	A11/1	$2,68 \times 10^5$	$8,80 \times 10^2$	$6,53 \times 10^{-4}$	$9,00 \times 10^{-7}$	2,44		1,11	A15-16
VH2/VK3	A11/2	$2,92 \times 10^5$	$4,40 \times 10^2$	$5,33 \times 10^{-4}$	$2,60 \times 10^{-7}$	1,83		0,50	A17-18
		$k_a(1/Ms)$	$SD(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SD(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)(nM)$		
Trung bình		$2,80 \times 10^5$	$1,71 \times 10^4$	$5,93 \times 10^{-4}$	$8,44 \times 10^{-5}$	2,13	0,43		
Phối tử	Chip	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	Chi^2	Phụ lục II
VH3/VK2	A11/1	$2,62 \times 10^5$	$3,20 \times 10^2$	$5,46 \times 10^{-4}$	$2,20 \times 10^{-7}$	2,08		0,45	A19-20
VH3/VK2	A11/2	$2,90 \times 10^5$	$3,70 \times 10^2$	$4,85 \times 10^{-4}$	$2,20 \times 10^{-7}$	1,67		0,71	A21-22
		$k_a(1/Ms)$	$SD(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SD(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)(nM)$		
Trung bình		$2,76 \times 10^5$	$1,99 \times 10^4$	$5,15 \times 10^{-4}$	$4,28 \times 10^{-5}$	1,88	0,29		
Phối tử	Chip	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	Chi^2	Phụ lục II
VH3/VK3	A11/1	$2,54 \times 10^5$	$3,10 \times 10^2$	$5,59 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-7}$	2,20		0,80	A23-24
VH3/VK3	A11/2	$2,76 \times 10^5$	$3,80 \times 10^2$	$4,54 \times 10^{-4}$	$2,20 \times 10^{-7}$	1,65		0,80	A25-26
		$k_a(1/Ms)$	$SD(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SD(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)(nM)$		
Trung bình		$2,65 \times 10^5$	$1,56 \times 10^4$	$5,07 \times 10^{-4}$	$7,40 \times 10^{-5}$	1,92	0,39		
Phối tử	Chip	$k_a(1/Ms)$	$SE(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SE(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)$	Chi^2	Phụ lục II
Thế khảm	A11/1	$7,18 \times 10^5$	$1,60 \times 10^3$	$1,60 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-6}$	2,23		1,17	A27-29
Thế khảm	A11/2	$7,22 \times 10^5$	$3,00 \times 10^3$	$1,30 \times 10^{-3}$	$3,50 \times 10^{-6}$	1,79		0,97	A30-31
Thế khảm	A11/3	$7,23 \times 10^5$	$2,60 \times 10^3$	$1,40 \times 10^{-3}$	$3,30 \times 10^{-6}$	1,94		0,49	A32-33
		$k_a(1/Ms)$	$SD(k_a)$	$k_d<(1/s)$	$SD(k_d)$	$K_D(nM)$	$SD(K_D)(nM)$		
Trung bình		$7,21 \times 10^5$	$2,87 \times 10^3$	$1,43 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-6}$	1,99	0,22		

Các trị số χ^2 thể hiện mức độ dữ liệu kết hợp và phân ly khớp với mô hình liên kết 1-đối-1 được đề xuất - trị số càng thấp thì mức độ khớp càng cao. Các trị số SE kết hợp đối với hằng số tỷ lệ thể hiện độ bất định kết hợp với việc khớp dữ liệu vào mô hình được mô tả, và không thể hiện độ bất định toàn bộ đối với các trị số động lực chính xác. Dữ liệu đáp ứng trung bình thể hiện các trị số động lực trung bình và SD kết hợp từ 2, hoặc 3 phân tích độc lập.

Sử dụng các trị số K_D trung bình từ Bảng F-2, các kháng thể có thể được xếp hạng dựa trên ái lực như sau: VH3/VK2 > VH3/VK3 > Khảm > VH2/VK3 > VH1/VK3 > VH1/VK2 > VH2/VK2. % CV kết hợp với các thông số động lực trung bình nằm trong khoảng từ 10 đến 20%, và do đó dường như là tất cả các kháng thể đều có ái lực rất giống nhau và các khác biệt chỉ là kết quả của sự biến đổi thử nghiệm. Nói chung, các khác biệt về liên kết giữa các kháng thể có thể quy cho các biến đổi thử nghiệm, và tin rằng không có khác biệt đáng kể về các trị số K_D của các kháng thể được làm giống như của người so với kháng thể khảm.

Kết quả so sánh các trị số động lực được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bắt giữ protein A trên Biacore T200 đối với tương tác giữa các kháng thể và Tau-412 được thể hiện. Kháng thể khảm thể hiện là có biên dạng liên kết khác biệt đáng kể so với các kháng thể được làm giống như của người, mặc dù các ái lực là giống nhau. Biểu đồ k_d so với k_a thể hiện các trị số động lực tương đối của các tương tác giữa các kháng thể được thử nghiệm và Tau-412 như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bắt giữ Protein A trên Biacore T200. Các đường chéo được gạch ngang thể hiện các đường đẳng ái lực. Xin lưu ý rằng các trục thể hiện các khoảng dữ liệu khác nhau, nhằm cải thiện tính rõ ràng của các kháng thể được làm giống như của người trên đồ thị.

Fig.5 tổng kết kết quả từ phương pháp phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance: SPR), xác định động lực liên kết của 6 cấu trúc được làm giống như của người biểu hiện tốt nhất đối với tau người. Kháng thể thử nghiệm được cố định hóa trên chip SPR với các nồng độ khác nhau của tau người sau đó được cho phép chảy trên chip này. Tỷ lệ kết hợp và phân ly cũng như ái lực dựa trên các trường hợp liên kết đo được được tính cho mỗi biến thể. Biến thể khảm cũng được thử nghiệm.

Ví dụ 3

Fig.6 thể hiện liên kết của bốn biến thể kháng thể được làm giống như của người với tau người hòa tan trong thử nghiệm ELISA kiểu kẹp. Các phương pháp thử nghiệm mà dựa vào sự hấp thụ thụ động có khả năng tạo ra kết quả liên kết giả. Để khắc phục khả năng này, phương pháp dựa trên dung dịch để đo hoạt tính liên kết của các biến thể kháng thể được làm giống như của người được sử dụng. Dưới hình thức thử nghiệm này, kháng nguyên (tau người) được bắt giữ bằng kháng thể đơn dòng kháng tau người mà nhận biết epitop khác với HJ8.5. Liên kết tiếp theo của các kháng thể kháng tau được làm giống như của người với tau người được bắt giữ sẽ phụ thuộc vào nồng độ kháng nguyên, trong khi các đối chứng kiểu phụ IgG4 thể hiện là hoàn toàn không liên kết. Thử nghiệm này chứng minh rằng liên kết của các kháng thể kháng tau được làm giống như của người với tau người là đặc hiệu và các kháng thể này liên kết với tau hòa tan của người.

Ví dụ 4

Fig.7A đến 7H thể hiện liên kết của các kháng thể được làm giống như của người và đối chứng với mô từ chuột nhắt kiểu đại (mô đối chứng âm), chuột nhắt P301S (mà biểu hiện tau người có sự đột biến P301S và phát triển bệnh lý tau kết hợp với độ tuổi), và người bị bệnh Alzheimer hoặc bị bệnh liệt trên nhân tiến triển (Progressive Supranuclear Palsy - PSP). Mục đích của thử nghiệm này là xác nhận rằng các kháng thể được làm giống như của người vẫn giữ khả năng liên kết với tau được kết tụ trong mô khi so với dạng khả của HJ8.5. Các fig này thể hiện các hình ảnh đại diện của việc nhuộm não người và não chuột bằng các biến thể khác nhau của kháng thể HJ8.5 được làm giống như của người. Chuột nhắt P301S ở độ tuổi 4 và 9 tháng tuổi được thử nghiệm, và cả hai mốc thời gian này đều thể hiện sự kết tụ bệnh lý của tau, trong đó chuột nhắt 9 tháng tuổi có bệnh lý tau nhiều hơn chuột nhắt 4 tháng tuổi. Đối với việc nhuộm người, mẫu mô não từ một đối tượng bị PSP, và mẫu mô não từ một đối tượng bị AD được kiểm tra. Fig. 7A minh họa việc nhuộm bằng HJ8.5 kháng đối với mô AD từ chuột nhắt và người. Fig. 7B minh họa việc nhuộm bằng kháng thể đối chứng âm (IgG4 không đặc hiệu của người). Các Fig 7C-7H minh họa việc nhuộm bằng sáu kháng thể được làm giống như của người. Tất cả các biến

thể được làm giống như của người của kháng thể HJ8.5 của chuột đều liên kết với các khối kết tụ tau được phát hiện trong não chuột nhắt P301S cũng như các khối kết tụ tau được phát hiện trong mô não của các đối tượng được chẩn đoán bị bệnh AD hoặc PSP.

Ví dụ 5

Fig.8 thể hiện các epitop của HJ8.5 trong tau người. Epitop được vẽ biểu đồ sử dụng cách hiển thị qua nấm men. Đối với phương pháp này, các peptit khác nhau bao trùm trình tự của tau người được biểu hiện bằng cách sử dụng nấm men. Liên kết của kháng thể HJ8.5 với nấm men trong môi trường được đo bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang. Liên kết với nấm men, biểu hiện các biến thể của tau mà gồm 34 axit amin đầu tiên được quan sát, nhưng không liên kết, nếu nấm men chỉ biểu hiện 32 axit amin đầu tiên của tau. Điều này gợi ý rằng epitop là nằm trong 34 axit amin đầu tiên. Ngoài ra, HJ8.5 liên kết nếu peptit chứa các axit amin 27-135 nhưng không liên kết nếu peptit kéo dài qua các axit amin 30-135. Điều này gợi ý rằng epitop chứa các axit amin lớn hơn axit amin 27. Dựa trên dữ liệu này, epitop được chứa trong trình tự 27-34 của tau người (GYTMHQDQ) (SEQ ID NO:10). Fig.8 cũng thể hiện các trình tự tau của khi nâu và chuột nhắt và các thay đổi axit amin so với tau người được bôi màu đỏ.

Fig.9 thể hiện sự lập bản đồ epitop dựa trên peptit chi tiết hơn đối với HJ8.5 và C₂N-8E12. Thư viện peptit của 15mer tuyến tính kéo dài trình tự đầy đủ của tau người (IN4R, 412 axit ami) được tạo ra. Ngoài ra, các phiên bản alanin kép của các peptit này trong đó các axit amin 10 và 11 được thay đổi thành alanin cũng được tạo ra. Đối với thư viện alanin kép, các alanin bất kỳ có trong tự nhiên ở vị trí 10 hoặc 11 được đột biến thành glyxin. Tất cả các peptit được chấm lên bảng peptit và sau đó được thăm dò bằng HJ8.5 hoặc C₂N-8E12 và liên kết được đo. (Các) epitop liên kết tau của cả hai kháng thể được vẽ bản đồ một cách tin cậy bằng cách sử dụng các bảng peptit này. Epitop liên kết của C₂N-8E12 là ₂₅DQGGYT₃₀ (SEQ ID NO: 9) và khớp với epitop của HJ8.5 gốc của chuột. Liên kết của HJ8.5 và C₂N-8E12 với các peptit tau cực kỳ dễ tổn thương khi các axit amin D, Q, Y, hoặc T trong epitop được thay thế bằng alanin, điều này gợi ý rằng chúng đóng vai trò quyết định trong việc liên kết

kháng thể. Tuy nhiên, nếu hai glyxin trung tâm trong epitop được thay thế bằng alanin thì liên kết của các kháng thể với các peptit tau không còn cực kỳ dễ tổn thương nữa (PEP 2875811). Điều này có thể không là dấu hiệu chỉ báo rằng các axit amin này không là quan trọng đối với việc liên kết mà thay vào đó điều này là do bản chất bảo tồn các sự thể giữa các axit amin Alanin và Glyxin. Epitop được vẽ bản đồ sử dụng các phương pháp chi tiết hơn này là hơi khác so với epitop được vẽ bản đồ sử dụng cách hiển thị qua nấm men (FIG.8). Sự khác biệt này được cho là do sự khác biệt về các thử nghiệm liên kết, với các peptit lớn hơn được sử dụng trên hệ hiển thị qua nấm men. Phương pháp bằng peptit 15mer được xem như là ưu việt hơn phương pháp hiển thị qua nấm men.

Ví dụ 6

Fig.10 minh họa kết quả liên kết của các kháng thể kháng tau người khác nhau với tau người hoặc khi nâu. Các kháng thể chuột kháng tau người HJ8.5 và HJ8.7 dọc theo biến thể được làm giống như của người VH1/VK2 (còn gọi là C₂N-8E12) được thử nghiệm. Fig.8 thể hiện rằng có sự khác biệt axit amin duy nhất ở vị trí 32 giữa tau người và tau khi nâu, trong trình tự epitop liên kết theo sáng chế GYTM(H/L)QDQ (SEQ ID NO:57). Fig.8 thể hiện rằng có sự khác biệt axit amin duy nhất ở vị trí 27 giữa tau người và tau khi nâu, trong trình tự epitop liên kết theo sáng chế DQ(G/E)GYT (SEQ ID NO:58). Để xác định liệu sự khác biệt axit amin này giữa hai loại tau có tác động đến khả năng liên kết của các kháng thể HJ8.5 / C₂N-8E12 hay không, thử nghiệm dưới đây được thực hiện. Liên kết của C₂N-8E12, HJ8.5 (tiền chất của C₂N-8E12 của chuột), và HJ8.7 (kháng thể chuột kháng tau người mà liên kết với epitop của tau trong đó trình tự axit amin của người và khi nâu được bảo tồn 100%) với tau người và khi nâu bằng cách phủ tau người hoặc khi nâu ở nồng độ khác nhau lên các đĩa ELISA 96 lỗ được đo. Kết quả chứng minh rằng C₂N-8E12 và HJ8.5 không liên kết với tau khi nâu trong khi chúng thể hiện liên kết tích cực với tau người. Như mong đợi, HJ8.7 liên kết với cả tau người và tau khi nâu.

Ví dụ 7

Fig.11 thể hiện liên kết của kháng thể kháng tau được làm giống như của người với tau ở CSF từ người bị các bệnh lý tau khác nhau. Liên kết của C₂N-8E12 với tau

trên các mẫu CSF từ các đối tượng được chẩn đoán bị các bệnh lý tau khác nhau cũng như tuổi tác phù hợp và các đối tượng đối chứng bình thường, trẻ được đánh giá. Thử nghiệm ELISA kẹp được sử dụng để chứng minh liên kết của C₂N-8E12 với tau trong CSF người từ các đối tượng bị AD, CBD, FTD, hoặc PSP cũng như tuổi tác phù hợp và các đối tượng đối chứng trẻ/trưởng thành. C₂N-8E12 được sử dụng dưới dạng kháng thể phủ để bắt giữ tau trong các mẫu CSF. Kháng thể chuột đơn dòng tau được biotinyl hóa HJ8.7 được sử dụng làm kháng thể phát hiện. Các lỗ được phủ bằng IgG4 người đối chứng tác dụng như là đối chứng âm cho các thử nghiệm này. Khác biệt lớn về tín hiệu từ các lỗ được phủ C₂N-8E12 so với các lỗ được phủ IgG4 đối chứng được thấy, điều này chứng minh liên kết đặc hiệu của C₂N-8E12 với tau trong các mẫu CSF người. Bằng cách đưa vào đường cong chuẩn (tau tái tổ hợp), có thể lấy được thông tin định lượng trên nồng độ tau trong các mẫu CSF này.

Ví dụ 8

Thử nghiệm này là thử nghiệm pha 1 liều đơn tăng dần (single ascending dose: SAD), ngẫu nhiên hóa, mù đôi, đối chứng bằng giả dược, được thực hiện trên tối đa mười (10) tâm. Nó được thiết kế để đánh giá độ an toàn, khả năng dung nạp, khả năng sinh miễn dịch, và dược động học (PK) của việc dùng liều đơn C₂N-8E12 và để thiết lập MTD để được sử dụng trong các thử nghiệm cấp liều lặp lại sau này.

Mục đích thứ nhất của thử nghiệm này là xác định độ an toàn, khả năng dung nạp, khả năng sinh miễn dịch, và liều dung nạp được tối đa (maximally tolerated dose: MTD) của liều đơn C₂N-8E12 ở các đối tượng bị bệnh PSP. Các đánh giá độ an toàn sẽ bao gồm xét nghiệm thể chất và thần kinh, các thử nghiệm độ an toàn lâm sàng trong phòng thí nghiệm, khả năng sinh miễn dịch, các sự kiện bất lợi, các tín hiệu sống và xem xét cấp thuốc đi kèm.

Các mục đích thứ hai là để xác định: Dược động học toàn thân liều đơn gồm; Nồng độ huyết tương tối đa sau một lần truyền duy nhất; Diện tích dưới đường cong (Area under the curve: AUC) sau một lần truyền duy nhất; Thời gian tại đó nồng độ tối đa sau khi truyền đạt được; Thời gian bán thải cuối cùng của C₂N-8E12; Sự phân chia của C₂N-8E12 vào trong dịch não tủy (cerebrospinal fluid: CSF); và Sự tiếp hợp đích sinh học thông qua việc đo các mức tau hòa tan trong máu và CSF cũng như đánh

giá sự có mặt của các phức hợp C₂N-8E12-tau.

Thử nghiệm này dự tính kết nạp 32 đối tượng bị bệnh PSP (24 đối tượng trong nhánh điều trị và 8 đối tượng trong nhánh giả dược). Các đối tượng sẽ được kết nạp thành 8 nhóm mỗi nhóm gồm 4 bệnh nhân, với một bệnh nhân trong mỗi nhóm được ngẫu nhiên hóa để dùng giả dược và 3 bệnh nhân để đánh giá hiện tại liều dung nạp được tối đa (MTD). Các đối tượng bổ sung có thể được kết nạp nếu xuất hiện tính độc giới hạn liều (dose limiting toxicity: DLT). Tuy nhiên, không liều có thể được bỏ qua trong quy trình tăng liều.

Phương pháp đánh giá lại liên tục (continual reassessment method: CRM) đối với việc tăng liều sẽ được sử dụng như được mô tả trong phần phác họa thống kê. Mô hình logistic sẽ được sử dụng để xác định xác suất DLT theo liều lượng.

C₂N-8E12 sẽ được đưa đến vị trí lâm sàng dưới dạng lỏng đóng băng trong các chai sử dụng một lần duy nhất ở nồng độ danh nghĩa là 20mg/mL. Mỗi chai chứa 300mg C₂N-8E12 và phải được bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ từ -70°C đến -80°C.

Các bệnh nhân sẽ trải qua sự sàng lọc để đánh giá liệu các tiêu chuẩn nhận và loại trừ bệnh nhân có được đáp ứng hay không. Việc sàng lọc cũng sẽ bao gồm các đánh giá về máu và CSF, và MRI. Vào ngày dùng liều (Ngày 0), liều đơn C₂N-8E12 sẽ được dùng qua đường dùng trong tĩnh mạch và các đối tượng sẽ được giám sát chặt chẽ ở khoa lâm sàng trong 24 giờ sau khi dùng liều. Thử nghiệm này chứa các mẫu máu để đánh giá độ an toàn và dược động học. Trong 3 ngày tiếp theo, cũng như một và hai tuần sau khi truyền, việc xét nghiệm lâm sàng bổ sung và lấy mẫu máu sẽ diễn ra. Việc lấy mẫu CSF và MRI độ an toàn bổ sung sẽ được thực hiện 4 ngày sau truyền. Các đối tượng sẽ được theo dõi mỗi 28 ngày, trong thời gian không dưới hai tháng từ ngày dùng liều (ví dụ, ngày 56). Sau đó các phép đo hàng tháng sẽ tiếp tục cho đến khi xảy ra trước thời hạn sự kiện bất kỳ trong số các sự kiện sau: (i) C₂N-8E12 không còn phát hiện được trong máu; (ii) Người bảo trợ xác định hoàn thành thử nghiệm; (iii) đối tượng quyết định sớm không tiếp tục tham gia vào thử nghiệm.

Mục đích của thử nghiệm pha 1 bao gồm thiết lập MTD như được đánh giá bằng các phép đánh giá độ an toàn bao gồm các thử nghiệm trên phòng thí nghiệm

lâm sàng, các xét nghiệm thể chất và thần kinh, và sự xuất hiện các sự kiện bất lợi để xác định khoảng liều được khuyến nghị để đánh giá trong thử nghiệm pha 2/MAD tiếp theo. Việc gán ngẫu nhiên các đối tượng và việc đưa vào nhánh giả được làm tránh sự thiên lệch và tăng khả năng mà cả yếu tố nguy cơ đã biết và chưa biết được phân bố đồng đều giữa các nhóm điều trị.

Ủy ban giám sát độ an toàn dữ liệu (data safety monitoring committee: DSMC) sẽ xem xét dữ liệu độ an toàn trên cơ sở những việc đang xảy ra. Ủy ban giám sát độ an toàn sẽ bao gồm tối thiểu hai bác sĩ độc lập, một nhà sinh thống kê học, một bác sĩ chuyên về bệnh PSP, và một thành viên không bỏ phiếu từ Người bảo trợ. Nếu đối tượng thử nghiệm bất kỳ trải qua các sự kiện bất lợi nghiêm trọng (serious adverse event: SAE), tất cả các dữ liệu độ an toàn sẵn có đối với đối tượng này sẽ được xem xét kỹ để xác định liệu sự kiện này có đáp ứng quy định về DLT hay không, và liệu MTD đã được thiết lập hay chưa. Nếu MTD chưa được thiết lập, và việc kết nạp bệnh nhân tiếp tục, thì DSMC sẽ đưa ra các khuyến nghị cho Người bảo trợ liệu các hoạt động tiếp theo hoặc các sửa đổi phương thức bất kỳ có cần thiết để đảm bảo độ an toàn của các bệnh nhân được kết nạp sau đó. Người bảo trợ sẽ đưa ra các quyết định cuối cùng về các sửa đổi bất kỳ đối với quá trình thử nghiệm hoặc sự kết thúc sơ bộ quá trình thử nghiệm.

Tính độc giới hạn liều được định nghĩa là: (i) Sự kiện bất lợi cấp 3 hoặc cao hơn bất kỳ trên Các tiêu chuẩn độc tính chung thấp khớp v2 (Rheumatology Common Toxicity Criteria v2) mà vì độc tính giới hạn liều này có khả năng hợp lý là C₂N-8E12 gây ra sự kiện này; (ii) Sự kiện bất lợi cấp 2 trong nhóm tổ chức hệ các tiêu chuẩn thuật ngữ chung về các sự kiện bất lợi của NCI v4.0 (NCI's Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0: CTCAE) về hệ thần kinh và các rối loạn tâm thần mà được xem là đáng kể về mặt lâm sàng và vì độc tính giới hạn liều này có khả năng hợp lý là C₂N-8E12 gây ra sự kiện này; hoặc (iii) các độc tính liên quan đến sự truyền bất kỳ (ví dụ, phản ứng dị ứng / quá mẫn) xảy ra trong quá trình truyền C₂N-8E12 hoặc trong 24 giờ sau khi hoàn thành việc truyền mà không giải quyết nhanh chóng được bằng cách giảm tốc độ truyền và/hoặc chăm sóc tích cực.

Tăng liều: Việc phân các đối tượng vào các nhóm dùng liều được chi phối bởi

các quy tắc sau: (1) Trong mỗi nhóm 4 bệnh nhân, 1 bệnh nhân sẽ được phân phối vào nhánh giả dược; (2) thông tin độc tính đầy đủ là yêu cầu đối với ít nhất 3 bệnh nhân ở mức liều trước khi tăng liều đến mức liều cao hơn; (3) Gia số tối đa của việc tăng liều từ một nhóm đến nhóm tiếp theo là 1 mức liều; và (4) Ít nhất 12 đối tượng (3 nhóm) sẽ được dùng liều ở mức liều MTD.

Trong mỗi nhóm 4 bệnh nhân, các bệnh nhân sẽ được dùng liều liên tục, với khoảng thời gian tối thiểu ít nhất hai ngày giữa các lần dùng liều liên tiếp cho các đối tượng để đo thêm khả năng đảm bảo an toàn.

Nhóm đầu tiên sẽ được phân vào d_1 . Mô hình thống kê sẽ được cập nhật sau khi thông tin độc tính đầy đủ là có sẵn đối với mỗi nhóm. Quy tắc là một nhóm bổ sung có thể được kết nạp trước khi thông tin đầy đủ là có sẵn đối với tất cả các đối tượng trên nhóm gần nhất. Dữ liệu độc tính không đầy đủ được cho phép đối với không nhiều hơn 3 bệnh nhân trước khi nhóm tiếp theo được kết nạp và được ngẫu nhiên hóa.

Mỗi nhóm đến sau sẽ được gán cho liều mà được ước định là MTD theo quy định trên đây. Trong trường hợp sự tích dồn chậm, mô hình này có thể được cập nhật khi mỗi bệnh nhân kết nạp và mỗi bệnh nhân đến sau được dùng liều đến mức MTD hiện được ước định.

Quản thể thử nghiệm: Thử nghiệm này sẽ kết nạp các đối tượng nam và nữ bị bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) có độ tuổi từ 50 đến 85 tuổi.

Các tiêu chuẩn nhận bệnh nhân: Để nhận vào thử nghiệm này, mỗi đối tượng phải sẵn sàng và có thể cung cấp bản ưng thuận có hiểu biết. Trước khi bắt đầu phương thức điều trị, mỗi đối tượng sẽ được xác nhận rằng có thể cung cấp bản ưng thuận về phương thức điều trị này. Các đối tượng sẽ được mời tham gia vào thử nghiệm, và sau khi ký vào bản ưng thuận có hiểu biết, các quy trình sàng lọc sẽ diễn ra. Nếu các đối tượng không hoàn thành các tiêu chuẩn nhận bệnh nhân hoặc đáp ứng tiêu chuẩn bất kỳ trong số các tiêu chuẩn loại trừ, các đối tượng này sẽ không được kết nạp vào quy trình đánh giá sàng lọc hoặc quy trình điều trị.

Mỗi đối tượng phải đáp ứng các tiêu chuẩn sau để được kết nạp vào thử nghiệm này: Nam hoặc nữ; Tuổi từ 50 đến 85 tuổi; Đáp ứng các tiêu chuẩn NINDS-SPSP chắc

hắn hoặc khả dĩ như được cải biến đối với các thử nghiệm lâm sàng NNIPPS và AL-108-231s, bao gồm: (d) liệt chức năng nhìn xuống thẳng đứng trên nhân hoặc tốc độ di chuyển mắt đột ngột giảm, (ii) không ổn định dáng đi hoặc ngã trong vòng 3 năm đầu có triệu chứng; MRI não khi sàng lọc là phù hợp với bệnh PSP (< 4 điểm vi xuất huyết, và không có sự đột quy lớn hoặc bệnh lý chất trắng nặng); Điểm trên thang đánh giá bệnh PSP là nằm trong khoảng từ 20 đến 50; Có thể cung cấp bản ưng thuận có hiểu biết để tham gia tại thời điểm ranh giới hoặc nếu không thể cung cấp bản ưng thuận có hiểu biết thì có thể cung cấp văn bản đồng ý tham gia và có đại diện y tế được ủy quyền người này có thể cung cấp bản ưng thuận; Có đối tác thử nghiệm, người này thăm bệnh nhân ít nhất 5 giờ một tuần, người này có thể đồng hành với bệnh nhân trong các lần thăm khám và tán thành tham gia thử nghiệm; Các liệu pháp không thuộc lĩnh vực sinh học đồng thời khác được cho phép nhưng liều phải ổn định trong ít nhất 30 ngày trước khi kết nạp; Có thể đi bộ 5 bước với sự trợ giúp tối thiểu (ổn định một tay hoặc sử dụng gậy/khung tập đi); Dùng thuốc ổn định để điều trị chứng bệnh Parkinson trong ít nhất 2 tháng trước khi sàng lọc; bao gồm, levodopa, chất chủ vận dopamin, rasagalin, các chất ức chế COMT, amantadin, memantin hoặc các chất ức chế cholinesteraza; Đồng ý tới 3 lần chọc dò tủy sống trong thời gian 4 đến 18 tháng, tới 6 lần chọc dò tủy sống nếu đối tượng sẽ tham gia cả thử nghiệm pha 1/SAD và thử nghiệm pha 2/MAD; Văn bản ưng thuận có hiểu biết được ký và ghi rõ ngày thu được từ đối tượng; Đồng ý sử dụng các phương pháp tránh thai được quy định trong phương thức (xem dưới đây).

Các đối tượng mà đáp ứng tiêu chuẩn bất kỳ trong số các tiêu chuẩn dưới đây sẽ bị loại trừ ra khỏi thử nghiệm: Các dấu hiệu về rối loạn thần kinh tiến triển mà đáp ứng tốt hơn các tiêu chuẩn đối với các loại rối loạn thần kinh ngoài bệnh PSP, bao gồm: (a) đáp ứng các tiêu chuẩn đối với bệnh Alzheimer khả dĩ hoặc (b) đáp ứng các tiêu chuẩn nghiên cứu đối với chứng sa sút trí tuệ Parkinson với các thể Lewy, teo đa hệ thống (multiple system atrophy: MSA), hoặc bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (amyotrophic lateral sclerosis: ALS); Bệnh ác tính bất kỳ (ngoài bệnh caxinom tế bào đáy không di căn của da) trong vòng 5 năm tính từ khi sàng lọc; loạn năng gan hoặc thận đáng kể về mặt lâm sàng tại thời điểm sàng lọc dựa trên đánh giá chuyên môn

của Người điều tra nghiên cứu; Có sự cố tim mạch đáng kể về mặt lâm sàng trong vòng ba tháng trước khi đi vào thử nghiệm, dựa trên đánh giá chuyên môn của Người điều tra nghiên cứu; Các kết quả thử nghiệm huyết học hoặc hóa học trong phòng thí nghiệm bất thường đáng kể về mặt lâm sàng trong quá trình sàng lọc, dựa trên đánh giá chuyên môn của Người điều tra nghiên cứu; Đã nhận liệu pháp kháng thể đơn dòng bất kỳ trước đó vì lý do bất kỳ trong vòng 90 ngày cuối cùng hoặc nhận thuốc đang thử nghiệm bất kỳ khác trong vòng 30 ngày trước đó hoặc trong vòng 5 chu kỳ bán thải (tùy theo cái nào dài hơn). Việc dùng C₂N-8E12 trước không áp dụng cho các tiêu chuẩn loại trừ này và, do đó, không làm mất tư cách của đối tượng tham gia vào thử nghiệm pha 2/MAD; Hiện đang trong liệu pháp điều biến miễn dịch hoặc liệu pháp sinh học bất kỳ khác; Khoảng thời gian bị bệnh là trên 5 năm từ khi khởi phát triệu chứng; Thể tích não giữa > 8.600 mm³ khi quét MRI sàng lọc; Các đối tượng mà cư trú ở cơ sở điều dưỡng chuyên nghiệp hoặc ở cơ sở chăm sóc bệnh sa sút trí tuệ; Có dấu hiệu rõ ràng về bệnh thần kinh vận động khi xét nghiệm, phù hợp với bệnh lý ALS (dấu hiệu này đã được mô tả trong các chất mang C90RF72 với bài thuyết trình CBS); Chẩn đoán các rối loạn thần kinh hoặc tâm thần đáng kể không liên quan bất kỳ khác mà có thể gây ra các suy giảm nhận thức (ví dụ, rối loạn co giật hoạt động, đột quỵ, sa sút trí tuệ liên quan đến mạch máu), dựa trên đánh giá chuyên môn của Người điều tra nghiên cứu; Chứng trầm cảm nặng không được điều trị tại thời điểm đánh giá ranh giới ban đầu, dựa trên đánh giá lâm sàng và dẫn đến GDS; Tiền sử bị bệnh tâm thần nặng khác; Tiền sử bất kỳ trước đây đã cố gắng tự tử; Suy giảm nhận thức nặng như được đánh giá bằng MMSE (<17) mà theo ý kiến của Người điều tra nghiên cứu sẽ không thể thu thập được số liệu về hiệu quả của thuốc; Không thể tham gia vào phương thức đánh giá; Các chỉ số bất thường, đáng kể nói chung từ các mẫu máu được lấy tại thời điểm sàng lọc mà sẽ gây ra nguy cơ về độ an toàn hoặc can thiệp vào việc hiểu dữ liệu thử nghiệm một cách thích hợp; Tiền sử hiện tại hoặc gần đây (trong vòng bốn tuần trước khi sàng lọc) bị nhiễm khuẩn, nấm hoặc vi khuẩn hình que đáng kể về mặt lâm sàng; Không thể chịu được việc quét MRI tại thời điểm sàng lọc hoặc chống chỉ định bất kỳ khác đối với MRI; Chống chỉ định bất kỳ đối với hoặc không thể chịu được việc chọc dò tủy sống tại thời điểm sàng lọc, bao gồm việc sử dụng các thuốc chống đông như warfarin. Việc dùng hàng ngày 81mg aspirin hoặc thuốc chống đông

tương tự sẽ được phép miễn là liều dùng phải ổn định trong 30 ngày trước khi sàng lọc; Các đối tượng mà, theo ý kiến của Người điều tra nghiên cứu, không thể hoặc không có khả năng tuân theo lịch trình dùng liều hoặc các đánh giá thử nghiệm; Việc tham gia vào thử nghiệm lâm sàng can thiệp trong vòng 3 tháng tính từ khi sàng lọc; Điều trị bằng thuốc đang thử nghiệm khác trong vòng 30 ngày tính từ khi sàng lọc; Thời gian QTcF tồn tại trước bất kỳ vượt quá 450 ms; Đối tượng là người lao động hoặc thành viên trong gia đình của Người bảo trợ hoặc nhân viên vị trí điều tra nghiên cứu hoặc các thành viên trong gia đình của họ.

Các đối tượng phải đồng ý sử dụng (và/hoặc khiến đối tác của họ sử dụng) các phương pháp tránh thai chấp nhận được bắt đầu từ lần thăm khám ở thời điểm ranh giới xuyên suốt quá trình thử nghiệm và cho đến 56 ngày sau liều thuốc thử nghiệm cuối cùng trong khóa điều trị cuối cùng. Các phương pháp tránh thai chấp nhận được được liệt kê dưới đây.

Thuốc thử nghiệm: Thử nghiệm pha 1/SAD sẽ sử dụng C₂N-8E12 từ DP Lot # 1018775 - vật liệu từ Ngân hàng tế bào nghiên cứu (Research Cell Bank: RCB) hiện đang được sử dụng trong chương trình tiếp cận mở rộng IND 119404. Nó được phối chế trong dung dịch đệm axetat 25mM ở độ pH bằng 5,5, và nó được cung cấp ở nồng độ 20 mg/mL. Giả dược: Giả dược được phối chế giống như C₂N-8E12 nhưng không có thuốc thử nghiệm hoạt tính.

Cơ sở dùng liều hợp lý: Liều ban đầu được khuyến nghị tối đa (maximum recommended starting dose: MRSD) được tính sử dụng Hướng dẫn của Cục quản lý dược phẩm và thực phẩm (Food and Drug Administration: FDA) cho việc "Ước định liều ban đầu an toàn trong các thử nghiệm lâm sàng để trị liệu cho các tình nguyện viên trưởng thành khỏe mạnh" trong công nghiệp. Theo hướng dẫn này, đối với các protein trị liệu đang thử nghiệm với trọng lượng phân tử > 100.000 Dalton mà được dùng trong tĩnh mạch, MRSD nên được ước định bằng cách chuẩn hóa qua các loài thay vì qua thông qua việc xác định theo tỷ lệ diện tích bề mặt cơ thể. Dựa trên mức hiệu quả không thấy (No Observed Effect Level: NOEL) quan sát được đối với liều 250 mg/kg trong thử nghiệm độc tố trên chuột, hệ số an toàn chuẩn là 10 sẽ hạn chế mức liều đến 25 mg/kg.

Liều ban đầu đối với thử nghiệm pha 1/SAD sẽ là 2,5 mg/kg dùng trong tĩnh mạch. Liều ban đầu này là nhỏ hơn 10 lần so với liều ban đầu được phép tối đa dựa trên thử nghiệm độc học trên chuột nhất 4 tuần tuổi và nhỏ hơn 6 lần so với liều tối đa hiện tại (15 mg/kg) được dùng trong chương trình tiếp cận mở rộng và trong các phương thức điều trị cho người sử dụng vì tình thương liên quan đến C₂N-8E12 (xem Sách giới thiệu của Người điều tra nghiên cứu).

Dựa trên số liệu dược động học huyết tương sơ cấp từ thử nghiệm trên một bệnh nhân, có thể ước định phần trăm tau trong CSF mà được liên kết bởi C₂N-8E12 ở các thời điểm khác nhau sau khi dùng liều 2,5 mg/kg C₂N-8E12. Đối với phép tính này, giả định rằng nồng độ kháng thể được làm giống như của người trong CSF là 0,1% so với nồng độ kháng thể được làm giống như của người trong huyết tương và nồng độ tau trong CSF là 500 pg/mL. Dựa trên các giả định này, liều 2,5 mg/kg sẽ dẫn đến nồng độ C₂N-8E12 trong CSF trong tháng đầu tiên cao hơn từ 3 đến 40 lần so với nồng độ mol của tau trong CSF. Dựa trên K_D của C₂N-8E12, liều 2,5 mg/kg sẽ dẫn đến 3 đến 26% tau trong CSF được liên kết bởi kháng thể. Việc mô hình hóa tương tự đã được thực hiện trên các số liệu dược động học từ liều cao nhất được dùng cho người cho đến nay (15 mg/kg) và được ước định rằng mức độ liên kết tau trung bình trong thời gian 28 ngày là khoảng 50% (liên kết tối đa 72%, tối thiểu 40%). Cũng sẽ có lượng lớn tau ngoại bào có mặt trong não mà không thể tiếp cận thông qua khoang CSF, nhưng kháng thể sẽ có thể liên kết với các tau này. Do đó, việc tăng liều sẽ tiến đến 25 mg/kg để đánh giá độ an toàn của liều mà có thể sẽ dẫn đến sự tiếp hợp đích đáng kể trong não.

Trừ khi được phê chuẩn bởi Người điều tra nghiên cứu, trong thời gian điều trị, đối tượng thử nghiệm sẽ không được nhận: Liều pháp sinh học hoặc điều biến miễn dịch bất kỳ khác; Thuốc đang thử nghiệm bất kỳ khác; Warfarin; Thuốc chống đông bất kỳ (ngoài aspirin liều hàng ngày 81mg) để phòng trường hợp mà sự chấm dứt tạm thời việc điều trị đó trước khi lấy mẫu CSF sẽ gây ra mối nguy về y học.

Bản ưng thuận có hiểu biết: Sau khi cung cấp bản ưng thuận có hiểu biết, mỗi đối tượng sẽ trải qua các đánh giá sàng lọc để tái xác nhận rằng các tiêu chuẩn nhận bệnh nhân có thể được đáp ứng, và không có các chống chỉ định đối với việc nhận sự

điều trị theo phương thức này. Cụ thể là, mỗi đối tượng sẽ được đánh giá tại thời điểm sàng lọc bằng các xét nghiệm lâm sàng và thần kinh để xác nhận lời chẩn đoán. Việc sàng lọc nhận thức ngắn gọn với thang đánh giá bệnh PSP và thang bệnh trầm cảm bằng cuộc phỏng vấn sẽ được thực hiện và lịch sử dùng thuốc/được phẩm và tiền sử bệnh lý đầy đủ sẽ được thu nhận. Nếu đối tượng đáp ứng tất cả các tiêu chuẩn nhận bệnh nhân và không có các tiêu chuẩn loại trừ thì quá trình nghiên cứu thử nghiệm sẽ được tiến hành. Việc thăm khám sàng lọc diễn ra từ 28 ngày đến 7 ngày trước lần thăm khám ở thời điểm ranh giới / Ngày 0.

Các đánh giá dược động học: Các mẫu sẽ được thu gom để phân tích dược động học ở các thời điểm khác nhau được mô tả trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Liều sơ bộ	15 phút (#)	3 giờ	6 giờ	12 giờ	24 giờ	48 giờ	168 giờ	336 giờ	28 ngày	Sau ngày 28 (@)
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	(@)

(*) Nếu việc kết thúc sớm diễn ra, mẫu máu cuối cùng sẽ được thu nhận tại lần Thăm khám kết thúc sớm để đánh giá dược động học cuối cùng;

(#) Trong vòng 15 phút kể từ khi hoàn thành việc truyền;

(@) Sau ngày 28, các mẫu dược động học sẽ được lấy mỗi 28 ngày cho đến thời điểm xảy ra sự kiện tùy theo sự kiện nào xuất hiện sớm hơn trong số các sự kiện dưới đây: (i) kết thúc thử nghiệm; (ii) không phát hiện được mức C₂N-8EI2 trong máu.

Các đánh giá sự kiện bất lợi: Đánh giá độ an toàn dưới đây sẽ được thực hiện để giám sát các sự kiện bất lợi: Các dấu hiệu sống (huyết áp, nhịp tim, nhiệt độ, nhịp thở, SPO₂); xét nghiệm thần kinh đầy đủ, gồm đánh giá nhận thức (các phép thử tình trạng tâm thần); các phép thử trong phòng thí nghiệm: (1) Bảng huyết học: đếm tế bào máu tổng số (complete blood count: CBC) với số tiểu cầu, hematocrit, và hemoglobin (Hb) khác nhau; (2) Bảng hóa học: các chất điện phân huyết thanh, glucoza, axit uric, nitơ ure máu (blood urea nitrogen: BUN), creatinin, protein tổng, albumin, bilirubin (tổng, trực tiếp và gián tiếp), phosphatasa kiềm, lactat dehydrogenaza (LDH), các enzym trong gan (AST, ALT và GGT), sắt, bảng cholesterol, CPK, amylaza, và lipaza;

(3) Bảng đông máu: Thời gian Prothrombin (Prothrombin Time: PT), INR, và Thời gian Thromboplastin một phần (Partial Thromboplastin Time: PTT); Phân tích nước tiểu, bao gồm các phép đo Hb, WBC, và lượng protein; theo dõi liên tục - ECG (điện tâm đồ: Electrocardiogram) hoặc ECG 12 chuyển đạo; chụp não MRI, gồm chuỗi xung hóa tín hiệu các dịch (fluid attenuated inversion recovery: FLAIR); lấy mẫu CSF cùng với việc đo số các tế bào (WBC và RBC), protein tổng và glucoza.

Xác định C2N-8E12 trong huyết tương và CSF của người: Các thử nghiệm ELISA kẹp đã được phát triển để đo nồng độ của C2N-8E12 trong huyết tương và CSF. Charles River Laboratories đã phê chuẩn các thử nghiệm này để sử dụng trong nhiều chất nền khác nhau (Xem Bảng 4).

Bảng 4

Thử nghiệm CRL #	Tiêu đề thử nghiệm
20056682 Đã hoàn thành	Phê chuẩn phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) để xác định C ₂ N-8E12 trong huyết tương của người (K2EDTA)
20057088 Đang tiến hành	Phê chuẩn phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) để xác định C ₂ N-8E12 trong dịch não tủy của người

Xác định các kháng thể kháng C2N-8E12 trong huyết tương của người: Các mẫu máu sẽ được thu gom để đánh giá sự phát triển kháng thể kháng thuốc (anti-drug antibody: ADA) trước khi dùng liều đầu tiên và vào ngày 14 và 28 sau khi dùng thuốc. Phép đo cuối cùng sẽ diễn ra ở thời điểm kết thúc. Thử nghiệm ELISA kẹp dựa trên ECL đã được phát triển để đo sự có mặt của các kháng thể kháng C₂N-8E12 trong huyết tương (ADA). Charles River Laboratories đã phê chuẩn thử nghiệm này để phát hiện đáp ứng ADA trong huyết tương của người (Xem Bảng 5).

Bảng 5

Thử nghiệm CRL #	Tiêu đề thử nghiệm
20056682 Đã hoàn thành	Phê chuẩn phương pháp thử nghiệm điện hóa quang định tính (Qualitative Electrochemiluminescent (ECL) Assay) để phát hiện các kháng thể kháng C ₂ N-8E12 trong huyết tương của người (K2EDTA)

Các đánh giá lâm sàng và chức năng gồm Thang đánh giá khả năng tự sát - Colombia (Colombia-Suicide Severity Rating Scale: C-SSRS): Như là thông số độ an toàn, Thang đánh giá khả năng tự sát - Columbia (C-SSRS) đối với ý tưởng tự sát sẽ được sử dụng (Posner et al. 2011). Thang đánh giá trầm cảm ở người cao tuổi (Geriatric Depression Scale: GDS): Tương tự với C-SSRS, thang đánh giá trầm cảm ở người cao tuổi (GDS) sẽ được sử dụng để đánh giá tâm trạng chung trong suốt quá trình thử nghiệm. Thang đánh giá trầm cảm ở người cao tuổi (GDS) là phép đánh giá tự báo cáo 30 mục được sử dụng để nhận diện sự trầm cảm ở người cao tuổi (Yesavage et al. 1983). Thang đánh giá PSP: Thang đánh giá PSP (PSP Rating Scale: PSPRS) sẽ được sử dụng tại thời điểm sàng lọc để nhận bệnh nhân cũng như tại thời điểm ranh giới và khi kết thúc quá trình thử nghiệm để đánh giá các thay đổi về thang đánh giá theo thời gian (Golbe and Ohman-Strickland 2007). Các cảm nhận tổng thể lâm sàng (Clinical Global Impression): Tỷ lệ thay đổi các cảm nhận tổng thể lâm sàng (Clinical Global Impressions rate of change: CGIc) và thang đánh giá độ nặng cảm nhận tổng thể lâm sàng (Clinical Global Impression severity: CGIIs) sẽ được sử dụng để đánh giá độ nặng của các triệu chứng. Hoạt động sống hàng ngày của Schwab và England (Schwab and England Activities of Daily Living): Thang hoạt động sống hàng ngày của Schwab và England (Schwab and England Activities of Daily Living: SEADL) sẽ được sử dụng như là phương tiện để đánh giá khả năng của đối tượng thực hiện được các hoạt động hàng ngày (Schwab and England 1969). Đánh giá sa sút trí tuệ trên lâm sàng bằng phương pháp tổng số hộp đối với bệnh Sa sút trí tuệ thùy trán thái dương (Clinical Dementia Rating Sum of Boxes Frontotemporal Lobe Dementia: CDR-SB-FTL): Đánh giá sa sút trí tuệ trên lâm sàng bằng phương pháp tổng số hộp đối với bệnh Sa sút trí tuệ thùy trán thái dương (CDR-SB-FTLD) là phiên bản của phép kiểm tra đánh giá nhận thức CDR-SB mà gồm đánh giá về hành vi, cách ứng xử, nhân cách, và ngôn ngữ (Knopman et al. 2008). Thang đánh giá tâm thần tối thiểu (Mini Mental State Examination: MMSE): Thang đánh giá tâm thần tối thiểu (MMSE) là bộ câu hỏi đáng tin cậy gồm 30 câu mà đo sự suy giảm nhận thức (Folstein, Folstein, and McHugh 1975).

Dịch não tủy (Cerebrospinal fluid: CSF): CSF sẽ được lấy từ khoang giữ L3-4

bằng cách chọc dò tủy sống. Nếu việc lấy mẫu CSF là không thành công thì việc chọc dò tủy sống theo hướng dẫn CT/flo có thể được sử dụng theo sự quyết định của nhân viên tại vị trí lâm sàng cục bộ như theo phương thức cục bộ. Các số liệu phòng thí nghiệm về độ an toàn đối với CSF sẽ được phân tích cục bộ tại vị trí lâm sàng khả dụng sau mỗi lần chọc dò tủy sống/thu thập CSF. Các số liệu này bao gồm: số tế bào (WBC và RBC), protein tổng và glucoza. Các số liệu CSF khác (ví dụ, nồng độ C2N-8E12, mức tiếp hợp đích và các dấu hiệu sinh học khai thác khác) sẽ được phân tích bằng phòng thí nghiệm khả dụng được chỉ định.

Chụp: Đối tượng cũng sẽ được quét MRI đường ranh giới với việc chụp cấu trúc, FLAIR, chụp cộng hưởng từ khuếch tán và chụp cộng hưởng từ xung nhịp. Các phương pháp phân tích chụp sau khi dùng liều sẽ được thực hiện theo Lịch trình sự kiện.

Phân tích hệ gen được lý khai thác: Mẫu máu sẽ được thu thập để chiết ADN tại thời điểm ranh giới. Tất cả các cá nhân sẽ trải qua bước phân tích trình tự MAPT haplotype mở rộng để xác định tình trạng chất mang H1(A-D) và H2. ADN sẽ được chiết từ các mẫu và ADN được đưa vào nhân hệ gen được lý được chỉ định cho nghiên cứu này.

Các đối tượng sẽ được kết nạp vào thử nghiệm này cho đến khi xảy ra trước thời hạn sự kiện bất kỳ trong số các sự kiện sau: (i) họ hoàn thành việc tham gia của họ và toàn bộ Lịch trình sự kiện; (ii) họ hoặc Người điều tra nghiên cứu quyết định kết thúc sự tham gia của họ; hoặc (iii) đối tượng khả dụng bị DLT bất kỳ hoặc SAE bất kỳ mà Người điều tra nghiên cứu cho rằng phải loại bỏ việc tham gia thêm vào thử nghiệm này và loại tính có đủ tư cách tham gia vào thử nghiệm pha 2/MAD sau đó. Ngoài ra, tùy theo quyết định của Người điều tra nghiên cứu, các đối tượng mà ngừng đáp ứng tiêu chuẩn nhận bệnh nhân, hoặc đáp ứng một hoặc nhiều tiêu chuẩn loại trừ trong quá trình thử nghiệm, có thể được xác định là không đủ tư cách để tiếp tục tham gia vào thử nghiệm hoặc tham gia tiếp vào thử nghiệm pha 2/MAD.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng tau đơn dòng được phân lập chứa chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 5.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG4 được làm giống như của người có sự đột biến ổn định hóa vùng bản lề S241P.
3. Kháng thể kháng tau đơn dòng được phân lập chứa chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, và chuỗi nặng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO: 13.

Trình tự vùng biến đổi

Trình tự vùng V được ghép C2N

Chuỗi nhẹ		CDR1	CDR2	CDR3	
MuVL	DIVLTQSPDASLAVSLQRA	TISCRASQSVTSRYSYIH	WYQQKPGQPPKLLIKYAS	NLESGVPARFSGSGGTDF	TINIHPLEEEDAATYYCHHSWEIPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:11)
VK1	DIVLTQSPDSLAVSLGERAT	ISCRASQSVTSRYSYIH	WYQQKPGQPPKLLIKYAS	NLESGVPSRFSGSGGTDF	TINIHPLEEEDFATYYCHHSWEIPLTFGOGTKLEIK (6) (SEQ ID NO:1)
VK2	DIVLTQSPDSLAVSLGERAT	ISCRASQSVTSRYSYIH	WYQQKPGQPPKLLIKYAS	NLESGVPSRFSGSGGTDF	TINIHPLEPEDEATYYCHHSWEIPLTFGOGTKLEIK (7) (SEQ ID NO:2)
VK3	DIVLTQSPDSLAVSLGERAT	ISCRASQSVTSRYSYIH	WYQQKPGQPPKLLIKYAS	NLESGVPSRFSGSGGTDF	TITISSLPEDFATYYCHHSWEIPLTFGOGTKLEIK (11) (SEQ ID NO:3)
VK4	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT	ISCRASQSVTSRYSYIH	WYQQKPGQPPKLLIKYAS	NLESGVPSRFSGSGGTDF	TITISSLPEDFATYYCHHSWEIPLTFGOGTKLEIK (12) (SEQ ID NO:4)

Chuỗi nặng		CDR1	CDR2	CDR3		
MuVH	EVKVEESGGGLVQPGGSMKLS	CVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGK	GLEWVAQIRL	KSDNYATHYESVKGRFTISR	DDSKSSVYLQMN	NLRAEDSGIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF
	(SEQ ID NO:12)					
VH1	EVKVVESGGGLVQPGGSMKLS	CVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGK	GLEWVAQIRL	KSDNYATHYESVKGRFTISR	DDSKSSVYLQMN	NLRAEDSGIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF (4)
	(SEQ ID NO:5)					
VH2	EVKVVESGGGLVQPGGSLKL	SCVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGK	GLEWVAQIRL	KSDNYATHYESVKGRFTISR	DDSKSSVYLQMN	NLRAEDTGIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF (7)
	(SEQ ID NO:6)					
VH3	EVQVVESGGGLVQPGGSLKL	SCVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGK	GLEWVAQIRL	KSDNYATHYESVKGRFTISR	DDSKNSVYLQMN	NLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF (10)
	(SEQ ID NO:7)					
VH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKL	SCVVSGFTFSNYWVNWVRQAPGK	GLEWVAQIRL	KSDNYATHYESVKGRFTISR	DDSKNSLYLQMN	NLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF (12)
	(SEQ ID NO:8)					

Lưu ý:

- Mu: Biểu thị trình tự loài gặm nhấm
- VH: Biểu thị vùng thay đổi trên chuỗi nặng được làm giống như của người
- VL: Biểu thị vùng thay đổi trên chuỗi nhẹ được làm giống như của người
- CDR: Vùng quyết định bổ trợ
- AAA: Các thay đổi ở khung được đưa ra bởi Antitope

FIG. 1

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nặng đã được ghép

gVH1 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,80 / 48822,90

EVKVVESGGGLVQPGGSMKLSCVVS GFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKS DNYATHYEESVKGRFTISR D
DSKSSVYLQMNRLRAEDSGIYYCTNWEDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO:13)

FIG. 2A

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nặng đã được ghép

gVH2 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,80/48791,87

EVKVVESGGGLVQPGGSLKLSCVVS GFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKS DNYATHYEESVKGRFTISR D
DSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTNWEDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO:14)

FIG. 2B

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nặng đã được ghép

gVH3 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,51 /48832,88

EVQVVESGGGLVQPGGSLKLSCVVS GFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKS DNYATHYEESVKGRFTISR D
DSKNSVYLQMNRLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO:15)

FIG. 2C

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nặng đã được ghép

gVH4 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,51 /48860,93

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCVVS GFTFSNYWVNWVRQAPGKGLEWVAQIRLKS DNYATHYEESVKGRFTISR D
DSKNSLYLQMNRLRAEDTAIYYCTNWEDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(SEQ ID NO:16)

FIG. 2D

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nhẹ đã được ghép

gVL1 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,08 / 24100,81

DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTL
NIHPLEEEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:17)

FIG. 2E

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nhẹ đã được ghép

gVL2 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,33 / 24068,81

DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTL
NIHPLEPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:18)

FIG. 2F

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nhẹ đã được ghép

gVL3 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,57 / 23994,72

DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:19)

FIG. 2G

Các trình tự axit amin đầy đủ của các biến thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ C₂N

Các biến thể chuỗi nhẹ đã được ghép

gVL4 Theo lý thuyết pI/Mw: 6,57 / 24012,76

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCRASQSVSTSRYSYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCHHSWEIPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:20)

FIG. 2H

Dữ liệu biểu hiện tạm thời từ các biến thể được làm giống như của người

Biến thể được làm giống như của người	Biểu hiện tạm thời Vòng 1 (ug/ml)	Biểu hiện tạm thời Vòng 2 (ug/ml)
VH1/VK1	9,0	
VH1/VK2	13,4	13,1
VH1/VK3	22,2	20,2
VH1/VK4	12,4	
VH2/VK1	6,5	
VH2/VK2	11,3	6,2
VH2/VK3	13,7	13,8
VH2/VK4	9,3	
VH3/VK1	7,3	
VH3/VK2	12,0	8,1
VH3/VK3	15,2	15,9
VH3/VK4	6,4	
VH4/VK3	3,6	

FIG. 3

Thử nghiệm hiệu lực

Kháng thể	IC50 (so với thể khảm)		
	C2N chạy lần 1	C2N chạy lần 2	Bên ngoài
Thể khảm	1,00	1,00	1,00
VH1/VK1	1,49	1,11	0,84
VH1/VK2	1,34	0,91	0,78
VH1/VK3.1	1,58	0,92	0,79
VH1/VK3.2	1,93	1,07	1,02
VH1/VK4	2,05	1,02	1,41
VH2/VK1	1,43	1,02	1,02
VH2/VK2	1,37	0,85	1,12
VH2/VK3	1,17	0,97	0,94
VH2/VK4	1,36	1,03	1,37
VH3/VK1	1,16	1,42	1,04
VH3/VK2	0,81	1,28	0,94
VH3/VK3	0,84	1,34	0,93
VH3/VK4	0,89	1,22	1,51
VH4/VK3	1,79	1,9	1,31
HJ8.5	0,79	0,99	1,07

FIG. 4

Động lực liên kết của kháng thể đối với tau người

Biến thể được làm giống như của người	Hằng số kết hợp K_a (1/Ms)	Hằng số phân ly K_d (1/s)	Ái lực K_D (M)
Thể khảm	7,21E+05	1,43E-03	1,99E-09
VH1/VK2	3,02E+05	6,21E-04	2,06E-09
VH1/VK4	2,87E+05	5,99E-04	2,09E-09
VH2/VK3	2,73E+05	6,08E-04	2,23E-09
VH2/VK4	2,80E+05	5,93E-04	2,13E-09
VH3/VK3	2,76E+05	5,15E-04	1,88E-09
VH3/VK4	2,65E+05	5,07E-04	1,92E-09

FIG. 5

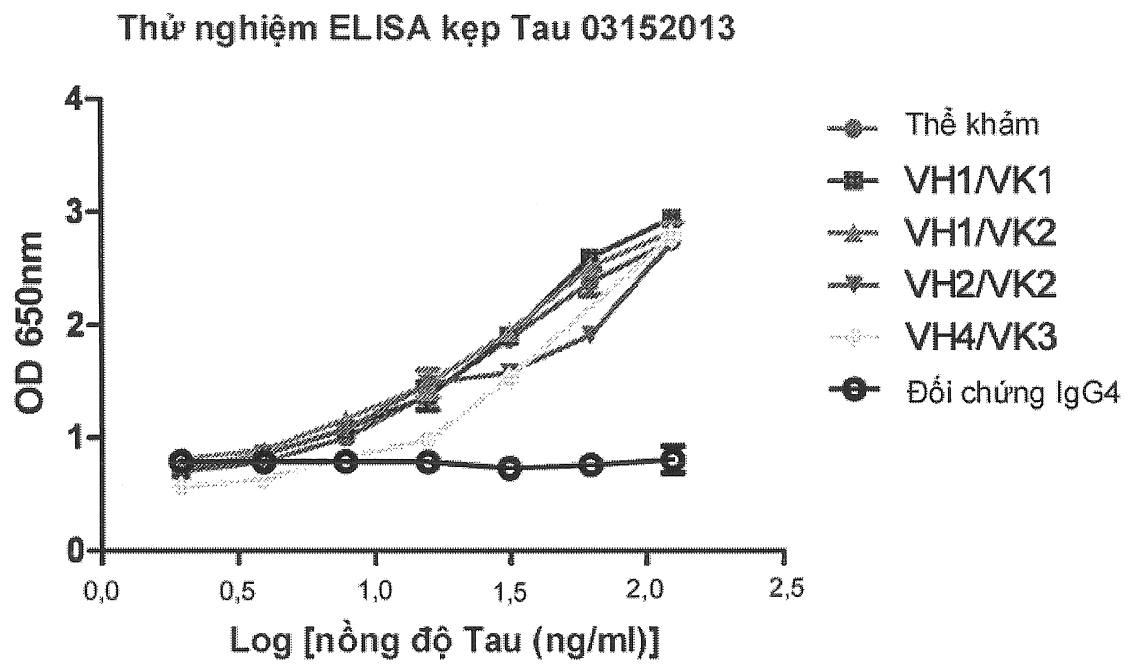
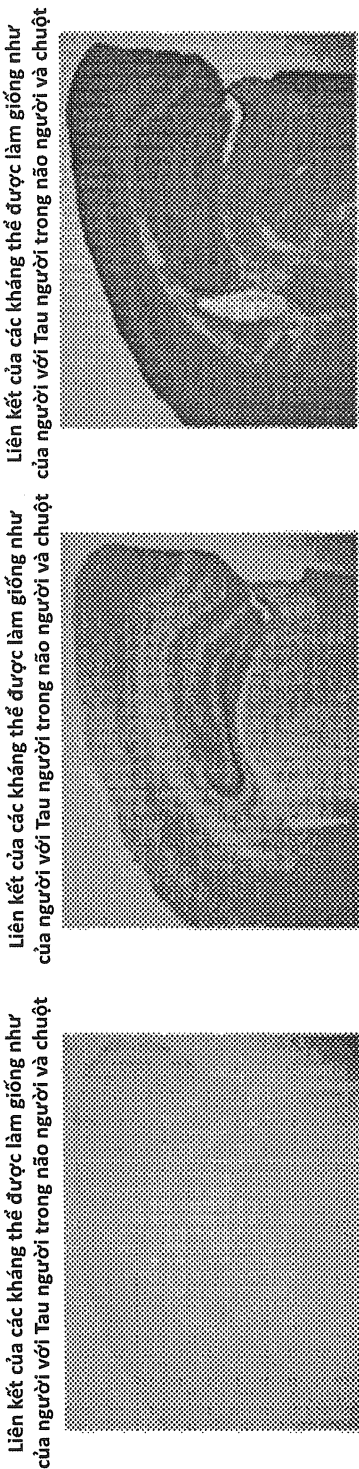


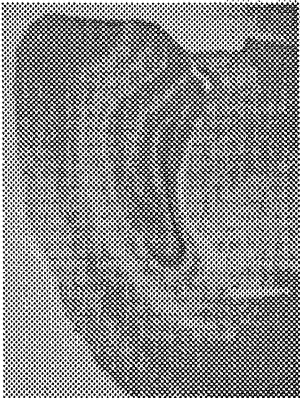
FIG. 6



Chuột nhất kiểu đại

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột với mô chuột nhất và người

FIG. 7A



Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi

Liên kết của thể khảm (Đối chứng dương tính) với mô chuột nhất và người

FIG. 7B

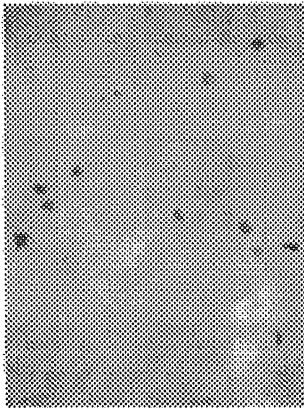


Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi

Liên kết của thể khảm (Đối chứng dương tính) với mô chuột nhất và người

FIG. 7C

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

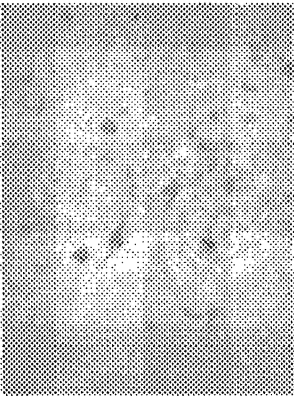


PSP người (nhuộm với H18.5)

Liên kết của thể khảm (Đối chứng dương tính) với mô chuột nhất và người

FIG. 7D

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

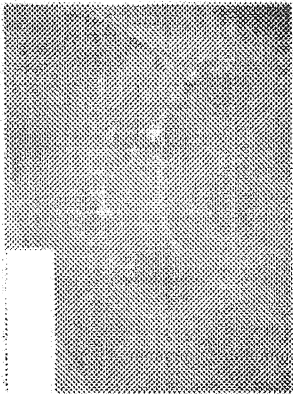


Vỏ não AD ở người #2

Liên kết của thể khảm (Đối chứng dương tính) với mô chuột nhất và người

FIG. 7E

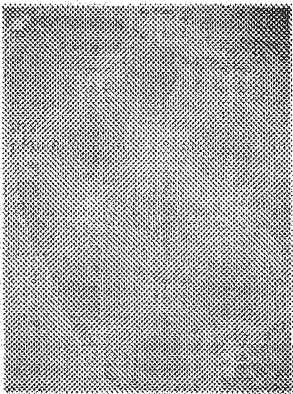
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất kiểu đại

Liên kết của IgG4 người không đặc hiệu (Đối chứng âm tính) với mô chuột và người

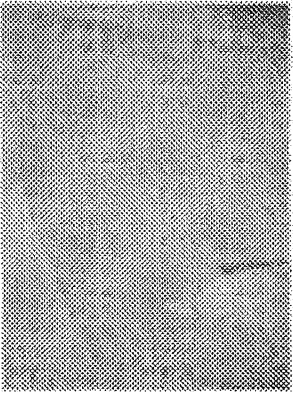
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi

Liên kết của IgG4 người không đặc hiệu (Đối chứng âm tính) với mô chuột và người

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi

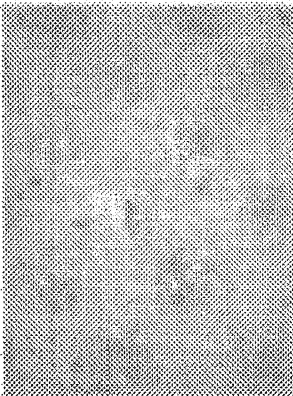
Liên kết của IgG4 người không đặc hiệu (Đối chứng âm tính) với mô chuột và người

FIG. 7F

FIG. 7G

FIG. 7H

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

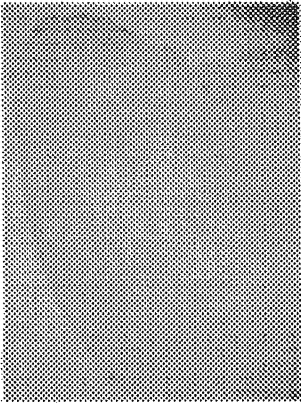


Vỏ mô não AD ở người #2

Liên kết của IgG4 người không đặc hiệu (Đối chứng âm tính) với mô chuột và người

FIG. 7I

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

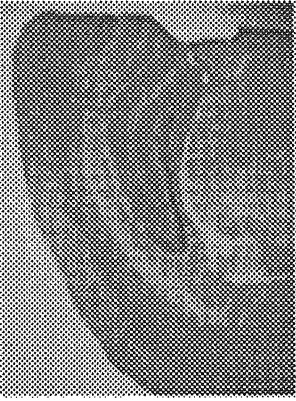


Chuột nhất kiểu đại

Liên kết của VH1/VK2 với mô người và chuột

FIG. 7J

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

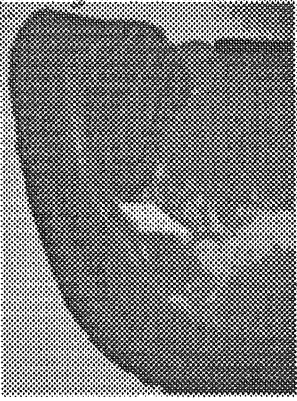


Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi

Liên kết của VH1/VK2 với mô người và chuột

FIG. 7K

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

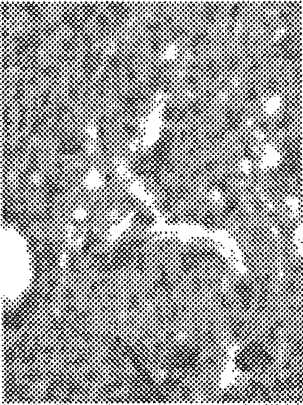


Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi

Liên kết của VH1/VK2 với mô người và chuột

FIG. 7L

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

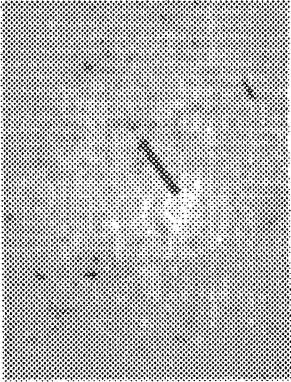


PSP người

Liên kết của VH1/VK2 với mô người và chuột

FIG. 7M

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Vỏ mô não AD ở người #2

Liên kết của VH1/VK2 với mô người và chuột

FIG. 7N

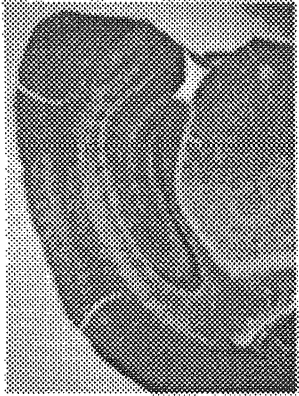
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất kiểu đại
Liên kết của VH1/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 70

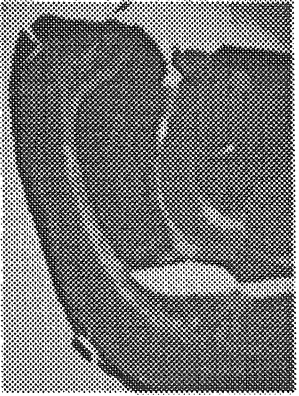
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi
Liên kết của VH1/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7P

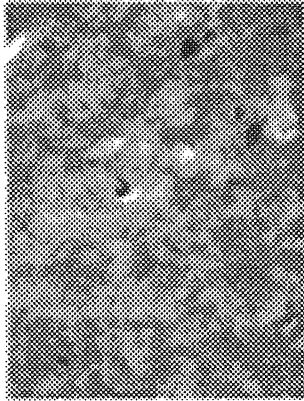
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi
Liên kết của VH1/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7Q

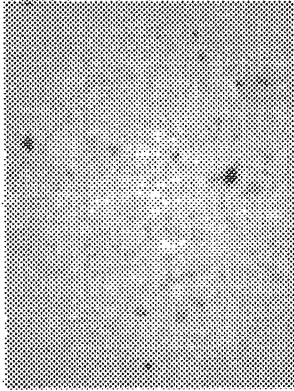
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



PSP người
Liên kết của VH1/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7R

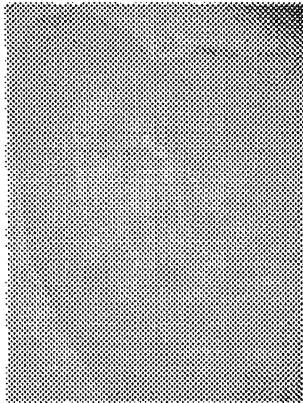
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Vỏ mô não AD ở người #2
Liên kết của VH1/VK3 với
mô chuột và người

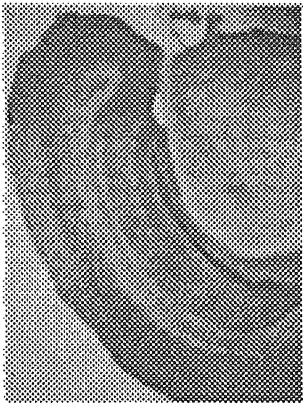
FIG. 7S

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



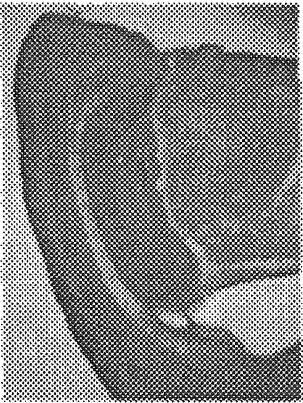
Chuột nhất kiểu đại
Liên kết của VH2/VK2 với
mô chuột và người
FIG. 7T

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



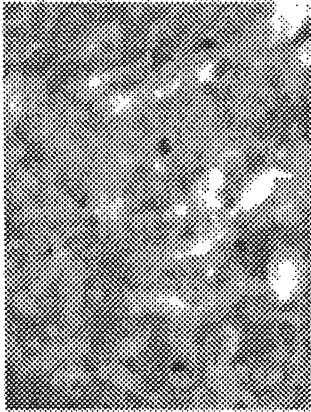
Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi
Liên kết của VH2/VK2 với
mô chuột và người
FIG. 7U

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



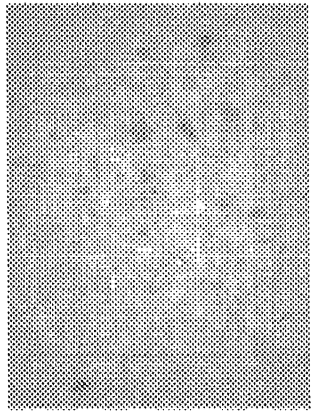
Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi
Liên kết của VH2/VK2 với
mô chuột và người
FIG. 7V

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



PSP người
Liên kết của VH2/VK2 với
mô chuột và người

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột

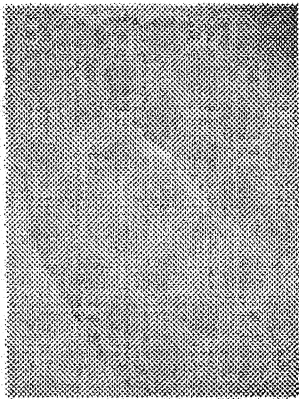


Vỏ mô não AD ở người #2
Liên kết của VH2/VK2 với
mô chuột và người

FIG. 7X

FIG. 7W

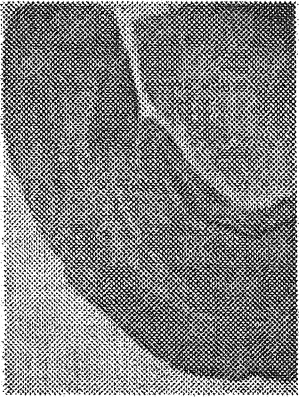
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất kiểu đại
Liên kết của VH2/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7Y

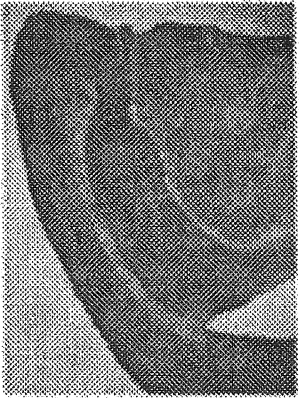
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi
Liên kết của VH2/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7Z

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi
Liên kết của VH2/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7AA

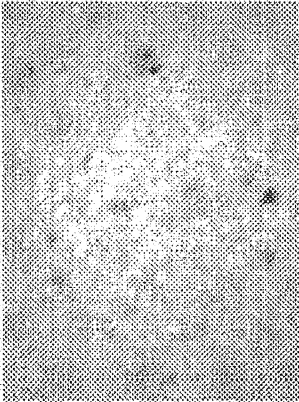
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



PSP người
Liên kết của VH2/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7BB

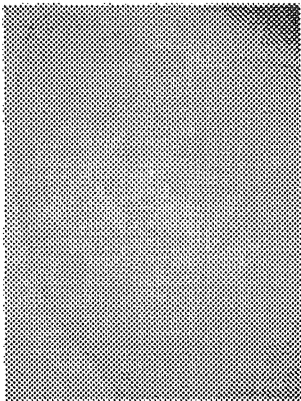
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Vỏ não AD ở người #2
Liên kết của VH2/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7CC

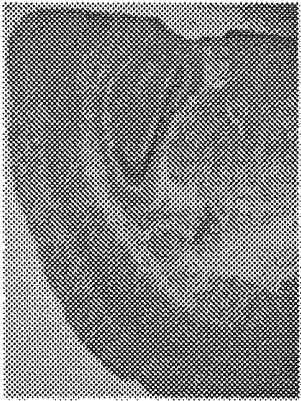
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất kiểu đại
Liên kết của VH3/VK2 với
mô chuột và người

FIG. 7DD

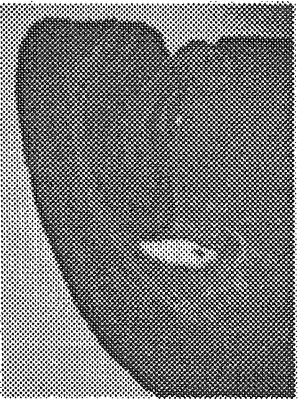
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi
Liên kết của VH3/VK2 với
mô chuột và người

FIG. 7EE

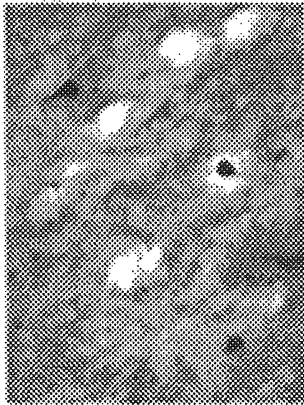
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi
Liên kết của VH3/VK2 với
mô chuột và người

FIG. 7FF

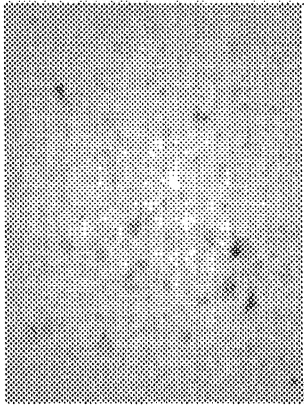
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



PSP người
Liên kết của VH3/VK2 với
mô chuột và người

FIG. 7GG

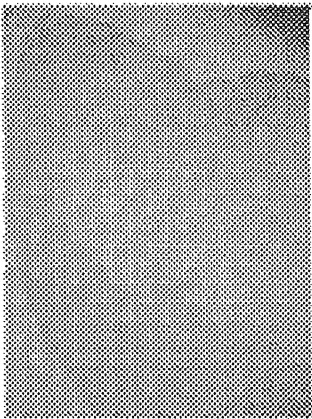
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Vỏ mô não AD ở người #2
Liên kết của VH3/VK2 với
mô chuột và người

FIG. 7HH

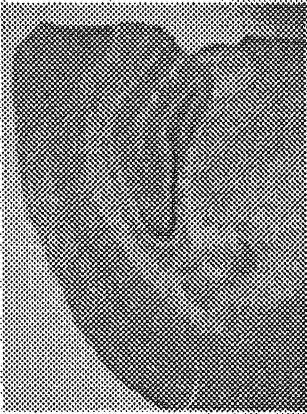
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất kiểu đại
Liên kết của VH3/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7II

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 4 tháng tuổi
Liên kết của VH3/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7JJ

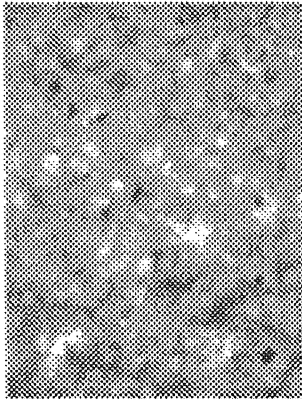
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Chuột nhất P301S 9 tháng tuổi
Liên kết của VH3/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7KK

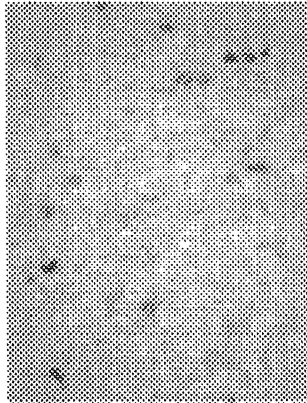
Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



PSP người
Liên kết của VH3/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7LL

Liên kết của các kháng thể được làm giống như của người với Tau người trong não người và chuột



Vỏ mô não AD ở người #2
Liên kết của VH3/VK3 với
mô chuột và người

FIG. 7MM

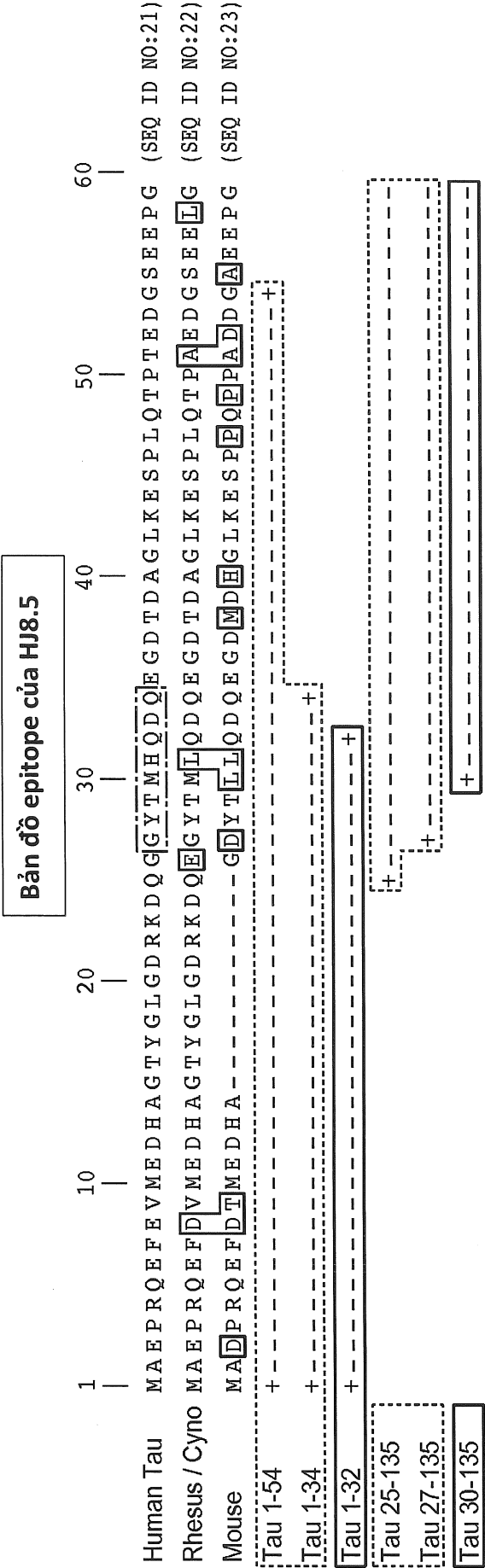


FIG. 8

Bản đồ epitope của C₂N-8E12 và HJ8.5

		Kháng thể	Epitop lõi		
		HJ8.5 and C ₂ N-8E12	²⁵ DQGGYT ₃₀ (SEQ ID NO:9)		
Dữ liệu PepLabData	Trình tự	Nhận dạng	Nhãn	HJ8.5 (Tín hiệu gắn kết)	C ₂ N-8E12 (Tín hiệu gắn kết)
PEP_2875800	DHAGTYGLGDRKDQG	SEQ ID NO:24	LIN	61	78
PEP_2875801	DHAGTYGLGAAKDQG	SEQ ID NO:25	LIN.AA	52	90
PEP_2875802	HAGTYGLGDRKDQGG	SEQ ID NO:26	LIN	63	65
PEP_2875803	HAGTYGLGDAADQGG	SEQ ID NO:27	LIN.AA	51	65
PEP_2875804	AGTYGLGDRKDQGGY	SEQ ID NO:28	LIN	427	1286
PEP_2875805	AGTYGLGDRAAQGGY	SEQ ID NO:29	LIN.AA	58	76
PEP_2875806	GTYGLGDRKDQGGYT	SEQ ID NO:30	LIN	2638	1714
PEP_2875807	GTYGLGDRKAAGGYT	SEQ ID NO:31	LIN.AA	110	114
PEP_2875808	TYGLGDRKDQGGYTM	SEQ ID NO:32	LIN	2640	2588
PEP_2875809	TYGLGDRKDAAGYTM	SEQ ID NO:33	LIN.AA	2814	2755
PEP_2875810	YGLGDRKDQGGYTMH	SEQ ID NO:34	LIN	2844	2671
PEP_2875811	YGLGDRKDQAAYTMH	SEQ ID NO:35	LIN.AA	1780	1876
PEP_2875812	GLGDRKDQGGYTMHQ	SEQ ID NO:36	LIN	2824	2729
PEP_2875813	GLGDRKDQGAATMHQ	SEQ ID NO:37	LIN.AA	80	65
PEP_2875814	LGDRKDQGGYTMHQD	SEQ ID NO:38	LIN	2835	2749
PEP_2875815	LGDRKDQGGAAAMHQD	SEQ ID NO:39	LIN.AA	69	99
PEP_2875816	GDRKDQGGYTMHQDQ	SEQ ID NO:40	LIN	2647	2699
PEP_2875817	GDRKDQGGYAAHQDQ	SEQ ID NO:41	LIN.AA	2635	661
PEP_2875818	DRKDQGGYTMHQDQE	SEQ ID NO:42	LIN	2692	2788
PEP_2875819	DRKDQGGYTAAQDQE	SEQ ID NO:43	LIN.AA	2697	2585
PEP_2875820	RKDQGGYTMHQDQEG	SEQ ID NO:44	LIN	2699	2779
PEP_2875821	RKDQGGYTMAAQDQEG	SEQ ID NO:45	LIN.AA	2713	2791
PEP_2875822	KDQGGYTMHQDQEGD	SEQ ID NO:46	LIN	2701	2680
PEP_2875823	KDQGGYTMHAAQEGD	SEQ ID NO:47	LIN.AA	2707	2712
PEP_2875824	DQGGYTMHQDQEGDT	SEQ ID NO:48	LIN	2677	2648
PEP_2875825	DQGGYTMHQAAEGDT	SEQ ID NO:49	LIN.AA	2707	2585
PEP_2875826	QGGYTMHQDQEGDTD	SEQ ID NO:50	LIN	399	789
PEP_2875827	QGGYTMHQDAAGDTD	SEQ ID NO:51	LIN.AA	427	636
PEP_2875828	GGYTMHQDQEGDTDA	SEQ ID NO:52	LIN	109	110
PEP_2875829	GGYTMHQDQAADTDA	SEQ ID NO:53	LIN.AA	106	118
PEP_2875830	GYTMHQDQEGDTDAG	SEQ ID NO:54	LIN	77	97

FIG. 9

Liên kết của kháng thể kháng tau được làm giống như của người với tau từ khí nẫu

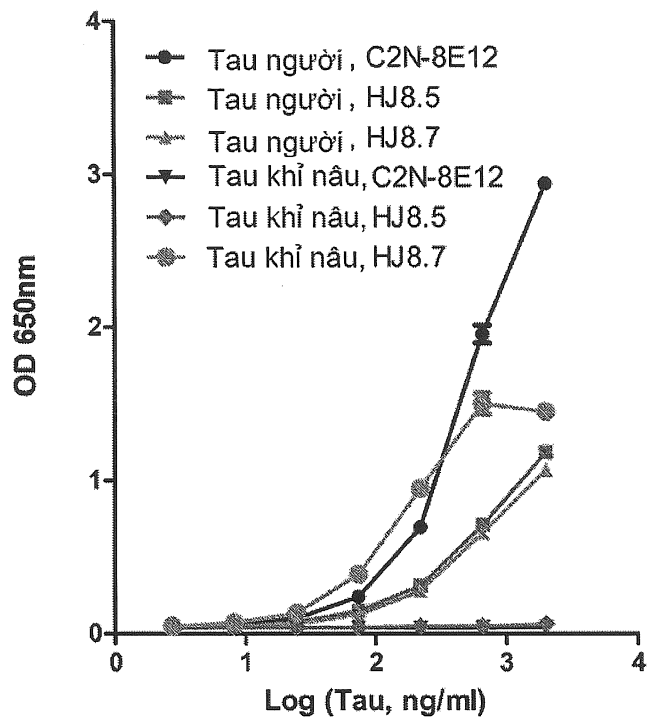


FIG. 10

Liên kết của kháng thể kháng tau được làm giống như của người với Tau trong CSF từ người bị các bệnh lý Tau khác nhau

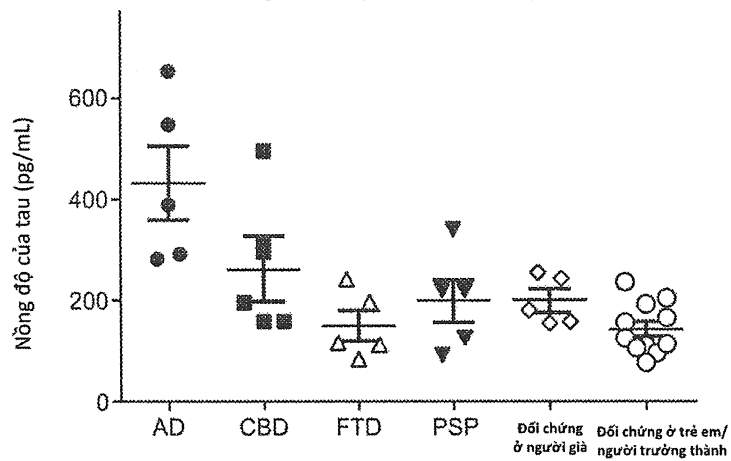


FIG. 11

Danh mục trình tự

<110> C2N DIAGNOSTICS, LLC

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG TAU ĐƠN DÒNG ĐƯỢC PHÂN LẬP

<130> ABV12215WO

<150> PCT/US2015/038002

<151> 2015-06-26

<150> 62/170,036

<151> 2015-06-02

<150> 62/080,903

<151> 2014-11-17

<150> 62/018,436

<151> 2014-06-27

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Arg	Tyr	Ser	Tyr	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			

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

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

Pro	Leu	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	His	Ser	Trp
			85						90					95	

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 3
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 4
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 5
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Glu Val Lys Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

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

<210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Glu Val Lys Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

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

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Glu Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

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

<210> 8
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

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

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Asp Gln Gly Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln
 1 5

<210> 11
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val 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 Leu Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

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

<210> 12
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Glu Val Lys Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

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

<210> 13
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Glu Val Lys Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 14
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 15

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 16

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

Ala Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Glu Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Asn Trp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

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

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

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

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 17

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Pro Leu Glu Glu Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 18
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Pro Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 19

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 20
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
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 Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Arg Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 21

<211> 60

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

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

<210> 22
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Asp Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

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

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

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

<210> 23
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Met Ala Asp Pro Arg Gln Glu Phe Asp Thr Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Tyr Thr Leu Leu Gln Asp Gln Glu Gly Asp Met Asp His Gly Leu
 20 25 30

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

Gly

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Ala Ala Lys Asp Gln Gly
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Ala Ala Asp Gln Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Ala Ala Gln Gly Gly Tyr
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Ala Ala Gly Gly Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Ala Ala Gly Tyr Thr Met
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Ala Ala Tyr Thr Met His
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Ala Ala Thr Met His Gln
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Ala Ala Met His Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln
1				5					10					15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Ala	Ala	His	Gln	Asp	Gln
1				5					10					15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gln	Asp	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln	Glu	Gly
1				5					10					15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	Ala	Ala	Asp	Gln	Glu	Gly
1				5					10					15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln	Glu	Gly	Asp
1				5					10					15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Ala	Ala	Gln	Glu	Gly	Asp
1				5					10					15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Asp	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr
1				5					10					15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His	Gln	Ala	Ala	Glu	Gly	Asp	Thr
1				5					10					15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Ala Ala Gly Asp Thr Asp
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ala
 1 5 10 15

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly
 1 5 10 15

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(8)

<223> Axit amin bất kỳ hoặc không có mặt

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(22)

<223> Axit amin bất kỳ hoặc không có mặt

<400> 56

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> His hoặc Leu

<400> 57

Gly Tyr Thr Met Xaa Gln Asp Gln
1 5

<210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Gly hoặc Glu

<400> 58
Asp Gln Xaa Gly Tyr Thr
1 5