



(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)



1-0034523

(51)⁷ A61K 38/16; C07K 14/01; G01N 33/00; (13) B
A61K 47/48

(21) 1-2014-02078

(22) 28/11/2012

(86) PCT/US2012/066793 28/11/2012

(87) WO2013/082114 06/06/2013

(30) 61/564,602 29/11/2011 US; 61/708,709 02/10/2012 US; 61/730,316 27/11/2012 US

(45) 25/01/2023 418

(43) 25/11/2014 320A

(73) PROCLARA BIOSCIENCES, INC. (US)

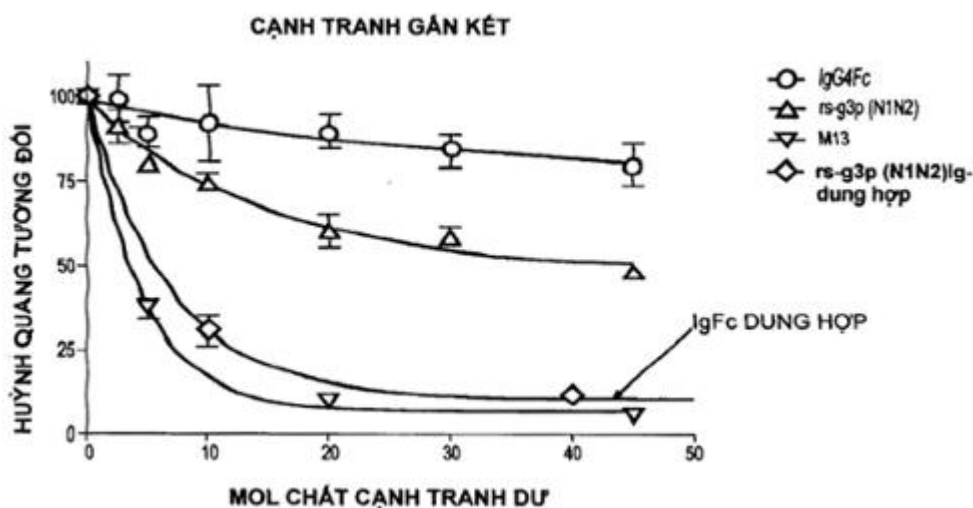
222 Third Street, Suite 3120, Cambridge, MA 02142, United States of America

(72) KRISHNAN, Rajaraman (IN).

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

(54) PROTEIN DUNG HỢP CHỨA POLYPEPTIT GẮN KẾT VỚI AMYLOID VÀ
DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN DUNG HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein dung hợp chứa polypeptit gắn kết với amyloid và ít nhất một polypeptit bổ sung thường không gắn kết với polypeptit gắn kết với amyloid, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có khả năng gắn kết với protein amyloid gấp nếp sai và/hoặc kết tụ; polypeptit gắn kết với amyloid, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có khả năng gắn kết với protein amyloid gấp nếp sai và/hoặc kết tụ; và dược phẩm chứa chúng.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa protein g3p của thực khuẩn thể dạng sợi, mảnh của g3p gắn kết với amyloid, thể đột biến và biến thể của g3p gắn kết với amyloid, và việc sử dụng các dược phẩm này như một liệu pháp nhằm giảm về lượng của amyloid liên quan đến bệnh, ví dụ, bệnh liên quan đến amyloid hệ thống hoặc ngoại biên, bệnh thoái hóa thần kinh kể cả bệnh do protein Tau gây thoái hóa thần kinh, và bệnh xốp não truyền nhiễm (bệnh gây ra bởi prion).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thực khuẩn thể dạng sợi M13, và thực khuẩn thể dạng sợi liên quan, đã cho thấy là có lợi đối với mẫu động vật bị mắc bệnh do sự gấp nếp sai protein, và do đó đề xuất phương pháp mới có khả năng điều trị bệnh do gấp nếp sai protein. Xem, US 2011/0142803, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Cụ thể, đã phát hiện rằng thực khuẩn thể dạng sợi này có khả năng dọn sạch amyloid đã hình thành trong não. Ví dụ, xem: WO2006083795 và WO2010060073, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Các bệnh hình thành amyloid có đặc trưng bởi sự thoái hóa thần kinh và xuất hiện protein kết tụ, gấp nếp sai trong não. Các protein kết tụ và gấp nếp sai này thay đổi tùy theo loại bệnh, nhưng phần lớn chúng đều có cấu trúc dạng tấm gấp nếp beta, mà cấu trúc này liên kết với thuốc nhuộm đỏ Congo và lưỡng chiết quang có màu lục nhạt. Việc loại bỏ amyloid này được cho rằng sẽ làm giảm, làm chậm tiến triển, thậm chí đảo ngược triệu chứng liên quan đến nhiều căn bệnh đặc trưng bởi amyloid.

Những cách tiếp cận với việc điều trị tiềm năng nhằm ngăn ngừa và/hoặc đảo ngược bệnh lý học và/hoặc các triệu chứng liên quan đến bệnh gây ra bởi amyloid bao gồm, ví dụ, ức chế sự hình thành amyloid, thúc đẩy sự đào thải amyloid, và ức chế sự kết tụ amyloid. Ví dụ, xem: Aguzzi & O'Connor, Nature Review Drug Discovery (2010) 9:237-48. Việc loại bỏ và/hoặc ngăn ngừa sự hình thành các oligome gây độc cũng có thể có lợi trong việc ngăn ngừa và điều trị bệnh hình thành amyloid.

Bệnh thoái hóa thần kinh đã biết mà liên quan đến protein kết tụ và/hoặc gấp nếp sai, bao protein gồm bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, bệnh do prion, bệnh do protein Tau gây thoái hóa thần kinh, bệnh xơ cứng teo cơ một bên (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) (ALS), bệnh thoái hóa tiểu não (spinocerebellar ataxia: SCA) (SCA1), (SCA3), (SCA6), (SCA7), bệnh Huntington, bệnh DRPLA (dentatorubral-pallidoluysian atrophy: DRPLA), bệnh teo cơ hành tủy, bệnh mạch máu não amyloid di truyền, chứng thoái hóa amyloid di truyền, bệnh suy thoái thùy trán-thái dương (frontotemporal lobar degeneration: FTLT) kể cả chứng mất trí do suy thoái thùy trán, chứng mất trí Anh/Đan Mạch, và bệnh não di truyền. Các bệnh khác liên quan đến protein gấp nếp sai và/hoặc kết tụ trong vùng ngoại biên, còn được gọi là chứng thoái hóa amyloid ngoại biên Ví dụ, xem: Chiti & Dobson, *Annu Rev Biochem* (2006) 75:333-66; and Josephs et al., *Acta Neuropathol* (2011) 122:137-153. Hiện có nhu cầu lớn trong việc ngăn ngừa và/hoặc làm giảm sự hình thành amyloid kết tụ (tức là, protein gấp nếp sai và/hoặc tích tụ) để điều trị hoặc làm giảm triệu chứng hoặc mức độ nghiêm trọng của các bệnh này.

Gần đây, Viện Lão khoa quốc gia (National Institute on Aging) và Hiệp hội Alzheimer đã công bố tiêu chuẩn để chẩn đoán “các nguyên nhân” và bệnh mất trí Alzheimer. Xem: McKhann et al., *Alzheimer’s & Dementia*, (2011) 7(3):263-9. Trên cơ sở của hướng dẫn này, “các nguyên nhân” gây ra chứng mất trí được chẩn đoán khi thỏa mãn năm thử nghiệm về các triệu chứng liên quan đến hành vi hoặc nhận thức, bao gồm, ví dụ, thực hiện nhiệm vụ tại nơi làm việc hoặc trong các hoạt động thông thường nhưng bị giảm mức trong chức năng và hoạt động so với trước đó. Thử nghiệm này liên quan đến việc kết hợp giữa khả năng nhớ và đánh giá nhận thức khách quan. Như được mô tả ở đây, nhờ sự việc phát hiện ra protein g3p của thực khuẩn thể dạng sợi, mảnh gắn kết với amyloid của g3p, và các thể đột biến, biến thể gắn kết với amyloid của g3p nên sáng chế đã đề xuất thêm phương pháp nhằm chẩn đoán bệnh hoặc chứng mất trí do sự hình thành amyloid, kể cả “các nguyên nhân” và chứng mất trí Alzheimer.

Thực khuẩn thể dạng sợi là một nhóm virus liên quan với nhau về mặt cấu trúc mà chúng lây nhiễm tế bào vi khuẩn, và có hệ gen ADN chuỗi đơn. Virus này không tiêu diệt tế bào vật chủ trong quá trình lây nhiễm tái sinh. Rasched and Oberer, *Microbiol Rev* (1986) 50:401-427. Ví dụ về thực khuẩn thể dạng sợi này bao gồm thực khuẩn thể thuộc họ Ff (ví dụ, M13, f1, và fd). Trình tự nucleotit của fd là đã biết từ năm 1978. Beck et al.,

Nucleic Acids Research (1978) 5(12):4495-4503. Trình tự đầy đủ của M13 đã được công bố từ năm 1980. van Wezenbeek et al., Gene (1980) 11:129-148. Thực khuẩn thể f1 đã được giải trình tự vào năm 1982. Hill and Petersen, J. Virol. (1982) 44(1):32-46. Hệ gen của f1 chứa 6407 nucleotit, ít hơn một nucleotit so với thực khuẩn thể fd. Trình tự này khác với trình tự của fd là 186 nucleotit (kể cả một đoạn khuyết nucleotit), dẫn đến sự sai khác về trình tự protein giữa f1 và fd là 12 axit amin. Trình tự f1 khác với trình tự M13 là 52 nucleotit, kết quả dẫn đến sự sai khác 5 axit amin giữa các protein tương ứng. Trình tự ADN của M13 và fd có 192 (3%) nucleotit khác nhau, nhưng chỉ có 12 điểm khác biệt, tuy nhiên điều này cũng đã làm thay đổi về trình tự axit amin tương ứng (6,25%). van Wezenbeek et al., Gene (1980) 11:129-148.

Cấu trúc của thực khuẩn thể dạng sợi đã được công bố chi tiết và được tổng kết, ví dụ, Marvin, Curr. Opin. in Struct. Biol. (1998) 8:150-158; Rasched and Oberer, Microbiological Reviews (1986) 50(4):401-427. Thực khuẩn thể dạng sợi này có một "lớp vỏ" mà lớp vỏ này chứa hàng nghìn bản sao protein chính của vỏ được mã hóa bởi gen 8 (g8p, p8 hoặc pVIII). Đây là phức hợp lắp ghép g8p-ADN tạo ra dạng sợi đặc trưng của chúng. Protein phụ của vỏ, *nghĩa là*, những protein chỉ có mặt với một lượng nhỏ (3-5) bản sao, nằm phía cuối sợi virus. Một trong số protein nằm phía đầu sợi, g3p (còn được biết đến như là p3 hoặc pIII), là cần thiết trong việc gắn kết với tế bào vi khuẩn chủ để lây nhiễm.

Thực khuẩn thể M13 có g3p trưởng thành gồm 406 axit amin. Trình tự có số truy cập NP_510891.1 trong Genbank, được đề cập như trình tự tham khảo, bao gồm 18 gốc tín hiệu amin kết thúc. Thông thường, các biến thể có sự khác biệt về trình tự axit amin so với trình tự công bố. Thực khuẩn thể dạng sợi của họ I có g3p khác với các thành viên của họ Ff, nhưng vẫn thuộc họ g3p và có sự bảo toàn cao. Stassen et al., J Mol Evol (1992) 34:141-52.

Đã biết cấu trúc tinh thể của g3p. Lubkowski et al., Structure (1998) 7(6) 711-722. Protein này chứa 3 vùng được gấp nếp cách nhau bởi cầu nối liên kết linh động giàu glyxin. Protein này có hai miền amin kết thúc, N1 và N2 chứa 262 axit amin, mà các miền này tương tác với nhau tạo dạng phức hợp N1-N2. Miền đầu carboxyl (CT, còn được gọi là N3) gồm 146 axit amin có chức năng cố định g3p vào hạt thực khuẩn thể bởi phản ứng kỵ nước với g8p. Marvin, Current Opin. in Structural Biology (1998) 8:150-

158. Cấu trúc dài công bố được tạo ra bằng cách sử dụng protein dung hợp 2g3p miền N1-N2 của Holliger, J Mol. Biol. (1999) 288(4):649-57 như được nêu trong Fig.1.

Không giống như phần lớn protein khác, việc không gấp nếp của miền N1 và N2 từ dạng “bị khóa” tiềm năng là cần thiết đối với g3p để có hoạt tính sinh học nguyên thủy. Eckert & Schmid, J. Mol. Biol. (2007) 373:452-461. Trong bước đầu tiên của quá trình lây nhiễm, N2 gắn kết với F-pilus của thực khuẩn thể thông qua gốc nằm ở vành ngoài của N2. Deng & Perham, 2002. Việc liên kết ban đầu bằng N2 này giúp “mở khóa” g3p bằng cách “mở” phức hợp N1-N2, tiếp đó cho phép N1 liên kết với đồng thụ thể TolA. Trong mảnh N1-N2 của g3p, điểm chuyển nhiệt đối với bước mở khóa ban đầu, tại đó N2 không gấp nếp có mặt tại nhiệt độ nóng chảy (T_M) là 48,1°C. Một phần của quá trình này liên quan đến việc đồng phân hóa tại liên kết peptit Gln212-Pro213. Pro213 được chuyển đổi thành *trans* ở trạng thái mở. Các phần N1 được gấp nếp một cách ổn định cho đến bước thứ hai, xảy ra tại nhiệt độ T_M là 60,2°C. Các quá trình này đã được tổng kết trong tài liệu của Eckert & Schmid, 2007.

Các dạng đột biến của mảnh N1-N2 đã được dùng để nghiên cứu sự ổn định và khả năng lây nhiễm của nhiều thể đột biến khác nhau. Eckert & Schmid, 2007. Đã có biến thể, được ký hiệu là “3A” đã được giảm lỏng gắn kết và làm tăng tính ổn định của miền N2. Đối dạng đột biến này, T_M tăng đến 42,6°C. 3A có các dạng đột biến sau: W181A, F190A và F194A. Một dạng đột biến khác trong N2, G153D, làm mất tính ổn định N2, làm tăng T_M đến 44,4°C. Thể đột biến Q129H ổn định N2, có T_M tăng lên đến 51,4°C. Biến thể IY gồm đột biến T101I và D209Y trong phần bản lề và chúng làm tăng tính ổn định của mảnh N1-N2 ($T_M = 56,5^\circ\text{C}$). IHY gồm đột biến T101I, Q129H và D209Y ($T_M = 60,1^\circ\text{C}$). IIHY gồm đột biến T13I, T101I, Q129H, và D209Y ($T_M = 61,8^\circ\text{C}$). Cả Q129Y và T13I đều làm tăng tính ổn định và việc có các thể đột biến này giúp tăng nhiệt độ nóng chảy, T_M . Tính lây nhiễm của thực khuẩn thể tăng giảm theo chiều dài của miền phản ứng nằm trong g3p. Eckert & Schmid, 2007. Việc loại bỏ miền N2 (thực khuẩn thể fd(Δ N2)) giúp làm tăng tính lây nhiễm do loại bỏ một cách hiệu quả sự phong bế miền N2 trên N1-gắn kết của TolA.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế, một phần, dựa trên việc phát hiện ra rằng g3p cũng gây ra sự gắn kết của thực khuẩn thể dạng sợi vào amyloid theo cách tương tự với quá trình lây nhiễm của

thực khuẩn thể này vào vi khuẩn. Bằng sáng chế U.S 7,867,487 đề xuất cơ sở cho rằng cơ chế gắn kết này là hiệu quả điều trị của thực khuẩn thể trong việc phân ly amyloid, theo sáng chế, hiệu quả phân ly này là do thực khuẩn thể có cấu trúc dài và mảnh nên chúng có khả năng chui vào giữa các sợi amyloid. Ngoài ra, sáng chế cũng cho rằng với lượng xoắn alpha cao trong g8p, protein chính của vỏ, có thể xen vào cấu bên trong cấu trúc gấp nếp beta của amyloid. Cơ chế đó là phù hợp với sáng chế, đó là với một lượng thực khuẩn thể ở mức nanomol có thể gây phân ly một lượng của amyloid β ở mức micromol, điều này cho thấy rằng thành phần của thực khuẩn thể này có số lượng bản sao lớn, *nghĩa là*, g8p, thì mới tạo ra hiệu quả này. Điều này cũng phù hợp với công bố của US 20110182948 đối với virus khảm của cây thuốc lá, mà virus này có cấu trúc tương tự như thực khuẩn thể dạng sợi theo sáng chế, mà có thể gây ra sự phân ly. Do các nghiên cứu trên đã phát hiện ra rằng, đối với hiệu quả trong việc điều trị, hoặc là cấu trúc nguyên thể (sợi dài có nhiều cấu trúc xoắn alpha), hoặc là protein vỏ cụ thể, protein có nhiều trên vỏ của thực khuẩn thể, như g8p nắm vai trò quyết định. Tuy nhiên, không có nghiên cứu nào chỉ ra rằng thành phần phân lập được của thực khuẩn thể, khác với thực khuẩn thể nguyên thể, có thể liên kết với amyloid và/hoặc gây ra sự phân ly amyloid này. Ngoài ra, các nghiên cứu trên cũng không đề cập đến dạng protein phụ của vỏ thực khuẩn thể dạng sợi lại có vai trò đối với khả năng gắn kết và phân ly amyloid.

Tuy nhiên, các nghiên cứu trên cũng đưa ra bằng chứng cho thấy có sự thay đổi (mặc dù không nhất thiết loại trừ lẫn nhau) về cơ chế phản ứng. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng 3gp của thực khuẩn thể có thể gắn kết trực tiếp với sợi của amyloid và việc phân ly bởi thực khuẩn thể đó là độc lập với bước gắn kết ban đầu. Các tác giả sáng chế cũng đã phát hiện ra rằng g3p chịu trách nhiệm gắn kết với amyloid của thực khuẩn thể dạng sợi nên đã đề xuất cơ chế để điều trị bệnh một cách hiệu quả bằng thực khuẩn thể, đây được coi là cơ sở của phương pháp mới để chẩn đoán và điều trị bệnh.

Các đối tượng bổ sung và lợi thế của sáng chế được đề cập đến trong phần mô tả dưới đây, và phần mô tả này sẽ làm rõ bản chất của sáng chế hoặc có thể tham khảo từ phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Đối tượng và lợi thế theo sáng chế thu được bởi từng thành phần độc lập cũng như sự kết hợp cụ thể các thành phần này như được nêu trong phần yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Cần hiểu rằng, cả phần mô tả khái quát trên đây cũng như phần mô tả chi tiết dưới đây được đưa ra làm ví dụ và chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của sáng chế chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế, như được yêu cầu bảo hộ.

Sáng chế, một phần, dựa trên sự phát hiện của các tác giả sáng chế về vai trò của protein gen 3 (gene 3 protein: g3p), mà protein này còn được biết đến là “p3” hoặc “pIII”) gây ra sự gắn kết với amyloid và phân ly sự kết tụ amyloid. Sáng chế cũng dựa trên sự phát hiện của các tác giả sáng chế về trình tự tối thiểu của g3p cần thiết đối với sự gắn kết với amyloid.

Do đó, theo một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phân tử, cụ thể là polypeptit, chứa trình tự liên ứng tối thiểu gắn kết với amyloid có nguồn gốc từ g3p. Theo một khía cạnh của phương án, phân tử này có thể hòa tan được. Theo một khía cạnh khác, phân tử này phân ly và/hoặc ngăn ngừa sự kết tụ của amyloid (ví dụ, mảng amyloid). Theo một khía cạnh khác của phương án này, phân tử này là protetin dung hợp. Theo một khía cạnh cụ thể hơn của phương án này, phân tử này là protetin dung hợp chứa thêm trình tự axit amin của chuỗi globulin miễn dịch. Theo một khía cạnh cụ thể hơn nữa của phương án này, phân tử này là protetin dung hợp chứa thêm trình tự axit amin của chuỗi globulin G miễn dịch (ví dụ, IgG) hoặc globulin M miễn dịch (ví dụ, IgM). Vẫn theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, phân tử này chứa miền N2 của g3p. Theo một khía cạnh cụ thể hơn của phương án này, phân tử này chứa miền N1-N2 của g3p. Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, phân tử này là g3p có chiều dài toàn vẹn. Theo một khía cạnh khác nữa, phân tử này là polypeptit, mà polypeptit này là mảnh, thể đột biến hoặc biến thể của dạng bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết với TolA, như phân tử ức chế TolA, cụ thể là polypeptit, chứa trình tự liên ứng tối thiểu gắn kết với trình tự amyloid. Phân tử gắn kết với TolA và/hoặc phân tử ức chế TolA theo sáng chế được gắn kết, depolyme hóa, ngăn ngừa sự kết tụ và phân ly amyloid. Phân tử gắn kết với TolA và/hoặc phân tử ức chế TolA chứa protein dung hợp. Theo các phương án cụ thể, phân tử gắn kết với TolA và/hoặc phân tử chất ức chế TolA là colixin hoặc mảnh gắn kết với amyloid của colixin. Trong các phương án cụ thể, colixin này là colixin nhóm A. Ví dụ, xem: Cascales et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2007) 71(1): 158-229. Phân tử gắn kết

với TolA và phân tử ức chế TolA theo sáng chế là hữu dụng để điều trị nhằm giảm về lượng của amyloid liên quan đến bệnh đó, như là bệnh liên quan đến amyloid hệ thống hoặc bệnh ngoại biên, bệnh thoái hóa thần kinh kể cả bệnh do protein Tau gây thoái hóa thần kinh, và bệnh xốp não truyền nhiễm (bệnh gây ra bởi prion). Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng các chế phẩm trên để ngăn ngừa sự tích tụ về lượng của amyloid liên quan đến các bệnh này cũng như việc sử dụng chế phẩm để chẩn đoán nhằm phát hiện amyloid và do đó, chẩn đoán được các bệnh này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến thực khuẩn thể dạng sợi được cải biến để biểu hiện quá mức g3p khi so với thực khuẩn thể thể đại, nhằm biểu hiện mảnh gắn kết với amyloid của g3p, dạng đột biến hoặc biến thể gắn kết với amyloid của g3p, hoặc protein dung hợp gắn kết với amyloid chứa g3p.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và/hoặc dược phẩm chứa phân tử hoặc thực khuẩn thể bất kỳ nêu trên, cũng như việc sử dụng chúng để gắn kết, phân ly và ngăn ngừa sự kết tụ của amyloid cũng như việc sử dụng chế phẩm hoặc dược phẩm này để phát hiện sự tích tụ của amyloid và chẩn đoán bệnh và rối loạn đặc trưng gây ra bởi amyloid.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện cấu trúc dạng dài của miền N1 và N2 của g3p, và vùng bản lề.

Fig.2A - Fig.2C thể hiện kết quả so sánh g3p từ các nguồn khác nhau. Fig.2A thể hiện kết quả so sánh g3p của thực khuẩn thể M13 (SEQ ID NO.1), Fd (SEQ ID NO.2), và F1 (SEQ ID NO.3), kể cả trình tự liên ứng (SEQ ID NO.4). Fig.2B thể hiện kết quả so sánh g3p của thực khuẩn thể I2-2 (SEQ ID NO.5) và Ike (SEQ ID NO.6), cùng với trình tự liên ứng giữa I2-2 và Ike (SEQ ID NO.7). Fig.2C thể hiện trình tự axit amin g3p của thực khuẩn thể If (SEQ ID NO.8).

Fig.3A là biểu đồ thể hiện kết quả nghiên cứu cộng hưởng bề mặt hạt nhân (surface plasmon resonance: SPR) đối với sự gắn kết thực khuẩn thể. Sự gắn kết với sợi A β được so với sự gắn kết với A β dạng đơn thể bằng cách cho 10^{14} thực khuẩn thể/mL chảy qua chip cảm biến sinh học. Fig.3B cho thấy trị số K_a , K_d , và K_D thu được từ dữ liệu SPR nêu trong Fig.3A.

Fig.4A và Fig.4B là biểu đồ thể hiện kết quả nghiên cứu gắn kết. Fig.4A là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích gắn kết trực tiếp với hai liều dùng thực khuẩn thể ($10^{11}/\text{mL}$ và $10^{12}/\text{mL}$) tăng dần theo lượng mol của fA β 42. Fig.4B là biểu đồ thể hiện kết quả nghiên cứu cạnh tranh gắn kết đồng thời đề xuất một cách khác nhằm xác định K_D đối với sự gắn kết của M13. Cấu trúc 1 được sử dụng.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện kết quả gắn kết cạnh tranh có dùng nhiệt để biến tính (hình vuông - 90°C trong 10 phút) so với sự hình thành M13 tự nhiên (hình tròn) (cấu trúc 1) trong phương pháp phân tích cạnh tranh liên kết với sợi amyloid.

Fig.6 là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích huỳnh quang Thioflavin T (ThT) được ủ bằng fA β 42 khi có hoặc không có thực khuẩn thể M13 tại hai nồng độ khác nhau (cấu trúc 1).

Fig.7A và Fig.7B là biểu đồ thể hiện ảnh hưởng của các thông số phân tích đơn lẻ khác nhau trong phương pháp phân tích phân ly ThT. Fig.7A thể hiện tỷ lệ phân ly tại hai nồng độ muối (0,15 M và 1,5 M). Fig.7B thể hiện tỷ lệ của fA β còn lại tại hai trị số nhiệt độ (4°C và 37°C). Cấu trúc 1 được sử dụng.

Fig.8A và 8B là biểu đồ thể hiện kết quả của phương pháp phân tích gắn kết amyloid của M13 bằng cách sử dụng fA β 42. Trong Fig.8A, M13 gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng nhiệt độ ủ nằm trong khoảng từ 18°C đến 58°C trong 3 giờ. Fig.8B là biểu đồ thể hiện động học gắn kết khi ủ tại 37°C so với động học gắn kết khi ủ tại 50°C .

Fig.9A - Fig.9C là biểu đồ thể hiện tác dụng loại bỏ protein thủy phân của g3p trong phản ứng thực khuẩn thể-amyloid. Proteaza Arg C được sử dụng để cắt g3p của thực khuẩn thể M13 (M13 Δ g3p). Fig.9A thể hiện kết quả nghiên cứu cạnh tranh gắn kết A β bằng cách sử dụng thực khuẩn thể M13 Δ g3p so với dạng thực khuẩn thể nguyên thể (được xử lý như thực khuẩn thể được xử lý bằng ArgC nhưng không được xử lý bằng proteaza). Fig.9B thể hiện hiệu quả của Arg C được xử lý lây nhiễm bằng M13 Δ g3p so với thực khuẩn thể nguyên thể. Fig.9C là ảnh chụp thể hiện kết quả so sánh thực khuẩn thể được xử lý bằng ArgC với thực khuẩn thể nguyên thể trong phân tích phân ly.

Fig.10A và Fig.10B là biểu đồ thể hiện kết quả của phân tích cạnh tranh gắn kết bằng cách sử dụng mảnh N1-N2 của g3p, được đề cập theo sáng chế là N1N2 tái tổ hợp hòa tan được (rs-g3p(N1N2); “cấu trúc 3”), M13 Δ g3p (xử lý bằng Arg C), và M13 đóng

vai trò như chất cạnh tranh với M13 được đánh dấu gắn kết bằng fA β 42. Fig.10B thể hiện kết quả lặp lại của phân tích cạnh tranh.

Fig.11 là biểu đồ thể hiện dữ liệu cạnh tranh đối với thực khuẩn thể fd, IIHY, AAA và M13. Thực khuẩn thể fd, AAA, và IIHY được hoạt hóa trước tại 50°C trong 1,5 giờ, tiếp đó Fd, AAA, và IIHY đã được hoạt hóa hoặc chưa được hoạt hóa được sử dụng để so sánh khả năng cạnh tranh với M13 để gắn kết vào A β trong thời gian 45 phút, nhiệt độ ủ 37°C.

Fig.12A là hình vẽ thể hiện sơ đồ rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3). Fig.12B là biểu đồ tóm lược sự trao đổi ion đối với rs-g3p(N1N2). Fig.12C là ảnh chụp thể hiện kết quả của phân tích lọc gel bằng cách sử dụng Sephacryl S-300 và rs-g3p(N1N2). Fig.12D là ảnh chụp thể hiện kết quả thẩm tách Western của rs-g3p(N1N2) cùng với đối chứng là g3p và g8p. Thực khuẩn thể M13 được chạy trong làn 1 và 2 đóng vai trò là đối chứng dương, và được phát hiện bằng kháng thể kháng M13 đa dòng, mà kháng thể này có thể phát hiện được cả g8p và g3p. Rs-g3p tinh sạch được chạy trong làn 3 và 4, và được phát hiện bằng cùng loại kháng thể kháng M13 đa dòng.

Fig.13 là biểu đồ thể hiện dữ liệu SPR bằng cách sử dụng rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3). Rs-g3p(N1N2) có khả năng gắn kết với fA β 42 với K_D vào khoảng 160 nM, nhưng không gắn kết với dạng đơn thể.

Fig.14 là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích huỳnh quang ThT được sử dụng để xác định amyloid có trong mẫu cho trước. 10 μ M A β 42 dạng đơn thể được ủ trong điều kiện có hoặc không có 5 nồng độ rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3) tại 37°C trong 3 ngày. Lượng sợi được hình thành sau 3 ngày được xác định bằng cách định lượng huỳnh quang ThT gắn kết. IC₅₀ có giá trị khoảng 20 nM cho thấy rằng rs-g3p(N1N2) có khả năng ức chế sự hình thành sợi A β 42. Hình vẽ này cũng chỉ ra rằng sự gắn kết này phụ thuộc vào liều dùng.

Fig.15A là ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy: TEM) thu được từ việc ủ fA β 42 trong điều kiện có hoặc không có rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3). Fig.15B là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích huỳnh quang ThT bằng cách sử dụng A β 42 và 2 μ M rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3) ủ tại 37°C trong 7 ngày. rs-g3p(N1N2) phong bế sự hình thành fA β 42.

Fig.16 là biểu đồ chứng minh rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3) có khả năng ức chế sự hình thành sợi α -synuclein. 25 μ M α -synuclein được tập hợp lại bằng cách khuấy ở tốc độ 300 vòng/phút trong 4 ngày tại 37°C (xem, cột 1). Cột thứ hai của hình vẽ mô tả α -synuclein dạng đơn thể được bổ sung 1×10^{-13} thực khuẩn thể M13 dạng tứ liên và lắc ở 37°C trong 3 ngày. Kết quả thể hiện trong cột 2 cho thấy rằng M13 dạng tứ liên này phong bế sự hình thành sợi α -synuclein. Cột thứ ba trên hình vẽ thể hiện kết quả khi có mặt của α -synuclein dạng đơn thể + 83 nM rs-g3p dạng đơn thể. Kết quả trong cột 3 cho thấy rằng, dạng đơn thể có hiệu quả ức chế sự hình thành sợi α -synuclein thấp hơn M13 dạng tứ liên. Cột 4 là mẫu đối chứng âm thể hiện α -synuclein dạng đơn thể tại thời điểm ban đầu. Trong cột 5, kết quả g3p dạng đơn thể không có sợi α -synuclein được dùng để xác định xem liệu g3p có gắn kết với pTAA khi không có thuốc nhuộm gắn kết với sợi hay không. Kết quả thể hiện tại cột 5 chỉ ra rằng g3p không gắn kết với pTAA.

Fig.17 là biểu đồ thể hiện dữ liệu gắn kết cạnh tranh đối với rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3), M13 (cấu trúc 2), protetin dung hợp rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 4), và IgG4-Fc đối chứng âm.

Fig.18 là biểu đồ thể hiện dữ liệu gắn kết cạnh tranh M13 so sánh (cấu trúc 2; ô vuông), rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3; tam giác), protetin dung hợp rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 4; tam giác ngược), và đối chứng âm là IgG4-Fc tái tổ hợp (hình thoi).

Fig.19 là ảnh chụp thể hiện kết quả phân tích bẫy lọc so sánh năm nồng độ của sợi A β 42 được tăng hoặc giảm hai lần nồng độ của M13 (cấu trúc 2), 800 nM rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3), và ba lần nồng độ của protein dung hợp rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 4).

Fig.20 là biểu đồ thể hiện dữ liệu gắn kết cạnh tranh đối với rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3; “đơn thể”) và streptavidin tiếp hợp rs-g3p(N1N2) (“SA[g3pN1N2]_{n=2-4}”; “SA-g3p”; “tứ liên”). So sánh khả năng cạnh tranh của rs-g3p(N1N2) và SA-g3p với M13 được đánh dấu trong việc gắn kết với A β trong khi ủ 3 giờ tại 37°C.

Fig.21 là ảnh chụp thể hiện kết quả phân tích bẫy lọc so sánh năm lần nồng độ của fA β 42 tăng hoặc giảm hai lần nồng độ của rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3; “đơn thể”) và hai lần nồng độ của SA-g3p (“tứ liên”).

Fig.22A và Fig.22B là ảnh chụp thể hiển TEM của fA β 42 tại thời điểm ban đầu (Fig.22A) và tại thời điểm ngày thứ ba sau khi ủ cùng SA-g3p (Fig.22B).

Fig.23 thể hiện trình tự axit amin của cấu trúc rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc “cấu trúc 4” (SEQ ID NO.9). Vùng N1N2 của “cấu trúc 4” có nguồn gốc từ vùng N1N2 của “cấu trúc 1” (SEQ ID NO.10).

Fig.24 thể hiện trình tự axit amin của cấu trúc rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc khác “cấu trúc 5” (SEQ ID NO.11). Vùng N1N2 của “cấu trúc 5” có nguồn gốc từ vùng N1N2 của “cấu trúc 2” (SEQ ID NO.12).

Fig.25 thể hiện trình tự axit amin cấu trúc rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc “cấu trúc 6” (SEQ ID NO.13). Vùng N1N2 của “cấu trúc 6” có nguồn gốc từ vùng N1N2 của “cấu trúc 2”.

Fig.26 thể hiện kết quả so sánh trình tự axit amin của N2 với: fd (SEQ ID NO.14), fl (SEQ ID NO.15), M13 (SEQ ID NO.16), Ike (SEQ ID NO.17), I2-2 (SEQ ID NO.18) và Ifl (SEQ ID NO.19). Dấu hoa thị “*” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vị trí gốc đơn bảo toàn nghiêm ngặt. Dấu hai chấm “:” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc bảo toàn giữa các nhóm có đặc tính rất giống nhau mà vùng này có điểm số trung bình lớn hơn 0,5 trong ma trận Gonnet PAM 250. Dấu chấm “.” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ gốc bảo toàn giữa các nhóm có đặc tính khá giống nhau mà các nhóm này có điểm trung bình thấp hơn 0,5 trong ma trận Gonnet PAM 250.

Fig.27A là hình vẽ thể hiện sơ đồ của cấu trúc 3. Fig.27B thể hiện trình tự ADN của phần g3p của cấu trúc 3 (SEQ ID NO.23). Fig.27C thể hiện trình tự axit amin của phần g3p của cấu trúc 3 (SEQ ID NO.24).

Fig.28 là biểu đồ thể hiện kết quả của thử nghiệm đánh giá hai protein dung hợp rs-g3p(N1N2)-IgG về khả năng làm giảm mức của amyloid β trong mẫu chuột chuyển gen bệnh Alzheimer. Cả rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 5) và rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) đều cho thấy khả năng làm giảm đáng kể mức của amyloid β trong thùy cá ngựa của chuột mắc bệnh Alzheimer.

Fig.29 là biểu đồ thể hiện kết quả của thử nghiệm đánh giá hai protein dung hợp rs-g3p(N1N2)-IgG về khả năng làm giảm mức của amyloid β trong mẫu chuột chuyển gen mắc bệnh Alzheimer. Cả rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 5) và rs-g3p(N1N2)-

hIgG1-Fc (cấu trúc 6) đều cho thấy khả năng làm giảm đáng kể mức của amyloid β trong vỏ não của chuột mắc bệnh Alzheimer.

Fig.30 thể hiện sự ức chế quá trình tập hợp A β 42 bằng rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6). Fig.30A là ảnh chụp gel agarosa “nguyên bản” được tạo ra không có SDS. Mẫu này được cho chạy trong đệm TEA mà không có SDS và không được đun sôi. Kết quả cho thấy rằng cấu trúc 6 có khả năng ức chế quá trình tập hợp fA β 42. Fig.30B là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích huỳnh quang ThT được dùng để xác định sự có mặt của amyloid có trong mẫu. 10 μ M A β 42 dạng đơn thể được ủ trong điều kiện tăng hoặc giảm hai lần nồng độ của rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) tại 37°C trong 1 ngày. Lượng sợi tạo ra tại thời điểm ngày cuối được xác định bằng cách định lượng gắn kết huỳnh quang ThT. Rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) có khả năng ức chế sự hình thành của sợi A β 42. Hình vẽ này cũng cho thấy rằng việc ức chế sự hình thành sợi với cấu trúc 6 là phụ thuộc vào liều lượng sử dụng.

Fig.31 là biểu đồ dữ liệu của phổ lưỡng cực tròn, dữ liệu cho thấy rằng quá trình tập hợp A β 42 bị ức chế bởi rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3). Phổ lưỡng cực tròn xác định thành phần cuộn xoắn α và gấp nếp β của sợi A β được ước định. Fig.31A thể hiện tính chất elip theo bước sóng của A β 42 tại T= 0, T=24 giờ, và T=48 giờ. Fig.31B thể hiện tính chất elip theo bước sóng của A β 42 có bổ sung cấu trúc 3 tại T=0, T=24 giờ, và T=48 giờ. Fig.31C mô tả kết quả phân tích ThT, trong đó lượng sợi được hình thành trong khoảng từ 24 đến 48 giờ được xác định bằng cách định lượng huỳnh quang ThT được gắn kết. Cấu trúc 3 có khả năng ức chế sự hình thành sợi A β 42. Fig.31D thể hiện tính chất elip theo bước sóng của cấu trúc 3 tại T= 0, T=24 giờ, và T=48 giờ. Khi xem xét đồng thời, các dữ liệu này xác nhận khả năng của cấu trúc 3 trong việc ức chế quá trình tập hợp A β 42.

Fig.32 là biểu đồ thể hiện dữ liệu mô tả cho thấy M13 (cấu trúc 2) và rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) phong bế độc tính gây ra bởi các oligome của tế bào N2a. Ví dụ, xem: (2003) J. Biol. Chem. 278(13): 11612-11622 và Stine et al. (2011) Erik D. Roberson (ed.) Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia, Methods in Molecular Biology, vol. 670: 13-32. Tế bào N2a được biệt hóa bằng cách không cung cấp huyết thanh trong 48 giờ trước khi xử lý. Các oligome A β 42 (2 μ M) được ủ trước cùng cấu trúc 2 và cấu trúc 6 tại 37°C trong 3 giờ trước khi bổ sung vào tế bào N2a. Thời điểm

T=0 (“T0”), phức hợp này chưa được xử lý. Sau 24 giờ ủ, kinaza được adenyl hóa (adenylated kinase: AK) giải phóng được kiểm soát. AK giải phóng vào môi trường cho thấy tế bào bị chết/phân giải. Các oligome A β 42 được tạo ra theo cách được hướng dẫn bởi Stine và cộng sự, 2011. Kết quả cho thấy rằng M13 và rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc có khả năng ức chế các oligome gây độc.

Fig.33 là ảnh chụp thể hiện kết quả so sánh bằng phương pháp phân tích bẫy lọc sáu nồng độ sợi A β 42 tăng hoặc giảm 1×10^{12} /mL M13 (cấu trúc 2); 80 nM và 800 nM cấu trúc rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 5); và 80 nM hoặc 800 nM rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6). Sợi A β 42 được ủ cùng cấu trúc 2, 5, và 6 tại 37°C trong 3 ngày, sau đó được lọc chậm. Phần lọc được dò bằng mAb 6E10 (1:15000), điều này cho phép nhận ra sợi A β 42 mắc trên bộ lọc. 800nM cấu trúc 5 hoặc cấu trúc 6 tương đương 5×10^{14} /mL cấu trúc 2 theo nồng độ mol phân tử. Kết quả chỉ ra rằng cấu trúc 2, 5, và 6 có khả năng phân ly sợi amyloid β .

Fig.34A và Fig.34B là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích điển hình được sử dụng để định lượng M13 (cấu trúc 2) gắn kết với fA β 42 đã được ủ trước với ftau 3 trong giờ. 5 μ M A β 42 dạng đơn thể gắn kết với cấu trúc 2 được ủ trong điều kiện có hoặc không có 4 lần nồng độ của ftau tại 37°C trong 3 giờ. Khi mà fA β :M13-Alexa488 tạo hạt nhưng ftau:M13-Alexa488 không tạo hạt, tiến hành xác định lượng huỳnh quang suy giảm do vật liệu tạo hạt gây ra, điều này chỉ ra rằng toàn bộ ftau gắn kết hoàn toàn với fA β . Ở đây, lượng M13-fA β tạo ra sau 3 giờ được xác định bằng cách định lượng huỳnh quang Alexa488 trong phản ứng cạnh tranh gắn kết tạo hạt. Kết quả cho thấy rằng ftau có thể cạnh tranh được với M13-Alexa488 (cấu trúc 2) để gắn kết với fA β 42.

Fig.35 là biểu đồ thể hiện kết quả của phương pháp phân tích điển hình SPR để kiểm tra khả năng gắn kết của rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 4) với ftau. Kết quả chỉ ra rằng cấu trúc 4 có khả năng gắn kết với ftau.

Fig.36 là biểu đồ thể hiện khả năng của rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) phân ly ftau. Sợi tau được chuẩn bị bằng cách pha loãng 40 μ M vùng lặp lại gắn kết với vi ống (microtubule binding repeat region: MTBR) của tau bằng 50 mM peroxit dismutaza (“Sod”). Các nồng độ khác nhau của cấu trúc 6 và ftau được chuẩn bị ở trên được ủ trong đệm axetat tại pH 7,0, 37°C trong 72 giờ. Đo huỳnh quang ThT phát ra khi vượt quá 5 lần ThT. Fig.36A là biểu đồ thể hiện kết quả phân tích ThT điển hình cho thấy khả năng ảnh

hướng của cấu trúc 6 đến sự phân ly ftau. Fig.36B là biểu đồ thể hiện một thử nghiệm khác nhằm xác nhận khả năng của cấu trúc 6 đối với sự phân ly tau. Fig.36A và Fig.36B cũng cho thấy sự phân ly của ftau bởi cấu trúc 6 phụ thuộc vào liều lượng sử dụng.

Fig.37 là ảnh chụp kết quả thử nghiệm cho thấy sự ức chế kết tụ A β bởi rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) và rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3) theo thời gian. A β 42 được hòa tan trong DMSO và pha loãng bằng PBS chứa NaN₃. A β 42 được kết tụ tại 37°C trong điều kiện có mặt hoặc không có mặt nồng độ cấu trúc 3 và cấu trúc 6. Sự kết tụ của A β 42 được xác định bằng huỳnh quang ThT. Fig.37A là ảnh chụp thể hiện SDS PAGE của mẫu. Fig.37B là biểu đồ thể hiện kết quả của một thử nghiệm khác. Fig.37C là biểu đồ thể hiện kết quả của một thử nghiệm khác. Fig.37D là biểu đồ tổng hợp kết quả.

Fig.38A và Fig.38B thể hiện kết quả thử nghiệm cho thấy khả năng của rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) phong bế sự chuyển đổi PrP thành PrP-Sc. Cấu trúc 6 và phần chất phân giải tế bào IgG được đưa đi siêu ly tâm để phân tách phần PrP hòa tan (phần dịch nổi) và phần PrP không hòa tan (hạt). Dạng PrP được nhận biết về mặt sinh hóa bằng kháng thể đơn dòng kháng PrP (6D11). Khi có mặt IgG thì có sự phân chia PrP trong cả phân đoạn hòa tan và phân đoạn không hòa tan. Khi có mặt cấu trúc 6, thì PrP hòa tan bị hạn chế. Dữ liệu mô tả n=4.

Fig.39A và Fig.39B thể hiện kết quả thử nghiệm cho thấy khả năng của rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) làm giảm sự tích lũy và kết tụ PrP^{Sc} trong mẫu nuôi cấy tế bào bị bệnh do prion. Fig.39A là ảnh chụp thể hiện sự phân giải tế bào N2a22L^{Sc} được phân giải hoặc không được phân giải bằng PK về mặt sinh hóa sau khi xử lý bằng cấu trúc 6 và IgG. Có một sự suy giảm đáng kể một cách rõ ràng mức PrP^{Sc} đối với tế bào được xử lý theo mức tăng nồng độ của cấu trúc 6. Mức PrP^{Sc} giảm khoảng 50% khi xử lý bằng ~0,08ug/mL cấu trúc 6. Việc xử lý bằng 10ug/mL cấu trúc 6 làm giảm mức PrP^{Sc} xuống còn 5,725%, p<0,0001. Không thấy có sự thay đổi đáng kể về mức PrP^{Sc} trong tế bào N2A22L^{Sc} được xử lý bằng 1μg/mL IgG của chuột. Theo Fig.39B, ảnh chụp X quang sau đó được số hóa và chuẩn hóa về mức ban đầu đối với ảnh hưởng của tế bào N2a22L^{Sc} được xử lý bằng IgG cùng số lần cấy chuyển, được ấn định là 100%. Dữ liệu mật độ từ dịch thẩm tách được phân giải bằng PK được phân tích theo dịch thẩm tách không được phân giải tương ứng và được biểu hiện theo tỷ lệ phần trăm thay đổi PrP^{Sc}/PrP_c. Dữ liệu mô tả n=4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Thuật ngữ “g3p” khi được sử dụng một mình hoặc khi được sử dụng cùng với các thuật ngữ khác như “dẫn xuất g3p” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein g3p của thực khuẩn thể thể đại hoặc tái tổ hợp bất kỳ (kể cả các mảnh, biến thể, và dạng đột biến của g3p). Thuật ngữ này không nhằm giới hạn g3p của thực khuẩn thể dạng sợi bất kỳ. Ví dụ, thuật ngữ “g3p” bao gồm trình tự protein được nêu trong SEQ ID NO.1 và các protein liên quan được đề cập đến trong Fig.2.

Thuật ngữ “thực khuẩn thể dạng sợi” bao hàm cả thực khuẩn thể dạng sợi thể đại, và thực khuẩn thể dạng sợi tái tổ hợp. Theo sáng chế, “thực khuẩn thể dạng sợi” này cũng có thể được đề cập đến như là “thể thực khuẩn” “thực khuẩn thể” hoặc “M13.”

Thuật ngữ “thực khuẩn thể dạng sợi thể đại” được sử dụng theo sáng chế chỉ thực khuẩn thể dạng sợi được tìm thấy trong tự nhiên, thực khuẩn thể dạng sợi được ghi là “thể đại” trong cơ sở dữ liệu trình tự axit amin hoặc nucleotit bất kỳ, thực khuẩn thể dạng sợi được bán trên thị trường và được mô tả là “thể đại” và thực khuẩn thể dạng sợi thu được bằng cách đột biến chủng bất kỳ nêu trên thông qua cấy chuyển mà không phải bằng phương pháp tái tổ hợp.

Thuật ngữ “miền” nghĩa là vùng của polypeptit (kể cả protein) có một số đặc tính vật lý hoặc vai trò đặc biệt bao gồm, ví dụ, cấu trúc gấp nếp độc lập chứa một phần của chuỗi polypeptit. Một miền có thể chứa trình tự có đặc tính vật lý đặc biệt của polypeptit hoặc có thể chứa mảnh có đặc tính vật lý mà nó duy trì được đặc tính gắn kết (tức là, nó có thể gắn kết vào miền thứ hai). Một miền có thể liên quan đến miền khác. Theo cách khác, miền thứ nhất có thể gắn kết một cách tự nhiên với miền thứ hai. Ví dụ, miền g3p N2 gắn kết với F-pili và miền g3p N1 gắn kết với TolA.

Thuật ngữ “amyloid”, “sợi amyloid” và “xơ amyloid” được sử dụng theo sáng chế là thuật ngữ chung đại diện cho cấu trúc bậc ba được tạo ra bởi sự kết tụ của một số protein khác nhau mà sự kết tụ này bao gồm các lớp gấp nếp β theo thứ tự xếp chồng trực giao với trục sợi. Sunde et al., J. Mol. Biol. (1997) 273:729-39. Ví dụ về amyloid là sự kết tụ của amyloid β hình thành ở đối tượng bị bệnh mắc bệnh Alzheimer, bệnh này sẽ tạo ra peptit amyloid β “ βA ”, peptit này là mảnh 39-43 axit amin được cắt từ tiền chất

protein amyloid của người (human amyloid precursor protein: hAPP). Dạng cắt ngắn, như là A β 40, và dạng dài, như là dạng đồng phân của sợi fibrinogen A β , A β 42. Lấy ví dụ về protein amyloid khác bao gồm α -synuclein gấp nếp sai (liên quan đến bệnh Parkinson), huntingtin (liên quan đến bệnh Huntington), tau (liên quan đến bệnh Alzheimer), và dạng cấu tạo bất thường của protein prion, PrP^{Sc}. Ví dụ khác được đề cập theo sáng chế và đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem: Aguzzi (2010), and Eichner and Radford, Mol. Cell (2011) 43:8-18). Do đó, trừ các protein hoặc peptit đặc biệt, việc sử dụng thuật ngữ “amyloid”, “sợi amyloid” hoặc “xơ amyloid” không nhằm giới hạn vào protein hoặc bệnh cụ thể.

Thuật ngữ “peptit amyloid beta” là đồng nghĩa với “peptit amyloid β ”, “ β AP”, “ β A” và “A β ”. Các thuật ngữ này dùng để chỉ peptit tạo ra amyloid có nguồn gốc từ protein tiền chất amyloid của người (human amyloid precursor protein: hAPP).

Thực khuẩn thể, protein, protetin dung hợp, vùng protetin dung hợp, hoặc thể đột biến, mảnh, hoặc biến thể của tiền amyloid được đề cập ở trên mà “gắn kết với sợi amyloid” hoặc “gắn kết với amyloid” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ một đối tượng, mà đối tượng này dương tính trong phân tích gắn kết với amyloid. Gắn kết với amyloid này có thể được phát hiện *in vitro* bằng cách sử dụng phương pháp gắn kết trực tiếp như phương pháp cộng hưởng bề mặt hạt nhân (surface plasmon resonance: SPR), trong hầu hết các trường hợp liên kết có Kd ít nhất 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M, 10⁻¹⁰ M, hoặc 10⁻¹¹ M. Theo cách khác, việc liên kết với amyloid này có thể phát hiện được bằng cách sử dụng phương pháp phân tích gắn kết fA β 42 được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Các mảnh gắn kết với amyloid, các biến thể và dạng đột biến của g3p cũng có thể xác định được do chúng xuất hiện đồng thời với amyloid khi tiêm vào mẫu chuột chuyển gen mắc bệnh bất kỳ do gấp nếp protein sai.

Sản phẩm hoặc chế phẩm bất kỳ theo sáng chế được mô tả là “phân ly” hoặc “gây ra sự phân ly” làm giảm sự kết tụ đã hình thành. Sự phân ly này có thể xác định được bằng phương pháp phân tích bẫy lọc. Wanker et al., Methods Enzymol (1999) 309:375-86. Phương pháp phân tích bẫy lọc được mô tả trong tài liệu ở trên có thể được sử dụng để phát hiện sự kết tụ và kiểm tra sự phân ly gây ra bởi chế phẩm theo sáng chế. Sự phân ly được phát hiện theo lượng giảm của amyloid trên màng lọc, theo sự giảm của thuốc nhuộm màu, khi tăng nồng độ của chất phân ly.

Như được sử dụng theo sáng chế, chế phẩm “làm giảm amyloid” có một hoặc nhiều tác dụng sau: ức chế sự hình thành amyloid, gây ra sự phân ly amyloid, thúc đẩy sự đào thải amyloid, ức chế sự kết tụ amyloid, chặn và/hoặc ngăn ngừa sự hình thành của các oligome amyloid và/hoặc xúc tiến sự hình thành các oligo amyloid gây độc.

Sản phẩm hoặc chế phẩm bất kỳ theo sáng chế có tác dụng “bảo vệ thần kinh khỏi sự gây hại của amyloid” ngăn ngừa sự tích tụ amyloid và/hoặc ngăn ngừa sự hình thành oligome amyloid gây độc. Sản phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế có tác dụng “bảo vệ thần kinh khỏi sự gây hại của amyloid” có thể là phương pháp ngăn ngừa bệnh. Hoặc là sản phẩm hoặc chế phẩm này bảo vệ thần kinh khỏi sự gây hại của amyloid có thể xác định được bằng phương pháp phân tích độc tính tế bào bằng cách nuôi cấy tế bào trung tính như được mô tả theo sáng chế.

Như được sử dụng theo sáng chế, “protein PrP,” “PrP,” và “prion” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ polypeptit có khả năng, trong điều kiện thích hợp, làm giảm sự hình thành của dạng kết tụ gây bệnh do gấp nếp sai protein. Ví dụ, protein prion của tế bào bình thường (PrP^C) bị thay đổi trong điều kiện tương ứng với bệnh cừu điên (PrP^{Sc}) thì nó chịu trách nhiệm đối với các bệnh như, nhưng không giới hạn ở, bệnh xốp não của bò (BSE), hoặc bệnh bò điên, bệnh xốp não của mèo, kuru, bệnh Creutzfeldt-Jakob (CJD), bệnh Gerstmann-Straussler-Scheinker (Gerstmann-Straussler-Scheinker: GSS), và chứng mất ngủ di truyền gây chết (fatal familial insomnia: FFI).

Thuật ngữ “biến thể” được sử dụng theo sáng chế cùng với thực khuẩn thể, protein, polypeptit, trình tự axit amin (ví dụ, biến thể g3p hoặc biến thể của mảnh gắn kết với amyloid của g3p), chỉ cơ chất tương ứng chứa ít nhất một sự khác biệt về trình tự axit amin (thay thế, chèn đoạn hoặc khuyết đoạn) khi so với trình tự tham chiếu. Theo một phương án cụ thể “biến thể” có độ tương đồng cao về trình tự axit amin và/hoặc có sự thay thế, khuyết đoạn và/hoặc chèn đoạn axit amin bảo tồn khi so với trình tự tham chiếu. Theo một số phương án, biến thể có sự sai khác về trình tự axit amin không quá 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 axit amin khi so với trình tự tham chiếu. Một “sự thay thế bảo toàn” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự thay thế axit amin thứ nhất bằng axit amin thứ hai nhưng về cơ bản không làm thay đổi đặc tính chức năng và/hoặc tính chất hóa lý của protein g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của g3p đó (ví dụ, protein g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó nhưng vẫn duy trì được tính chất

tích điện, cấu trúc, tính phân cực, tính ưa/kỵ nước, và/hoặc bảo tồn được chức năng như khả năng nhận biết, gắn kết với, và/hoặc làm giảm amyloid). Những sự cải biến axit amin như vậy dựa trên tính tương đồng tương ứng của các gốc thể axit amin chuỗi bên, ví dụ, tính kỵ nước, tính ưa nước, tính tích điện, kích thước, và các tính chất tương tự. Ví dụ về sự thay thế bảo toàn, mà giữ được nhiều đặc tính nêu trên là đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm: arginin và lysin; glutamat và aspartat; serin và threonin; glutamin và asparagin; và valin, leuxin, và isoleuxin.

Thuật ngữ “đột biến” (ví dụ, “g3p đột biến” hoặc “mảnh gắn kết với amyloid đột biến”) chỉ protein bị đột biến một hoặc nhiều axit amin nhằm điều chỉnh hiệu quả trong việc chẩn đoán hoặc điều trị bệnh của nó. Theo một phương án cụ thể, thể đột biến này có thể gồm sự thay thế, khuyết đoạn và/hoặc chèn đoạn tại vị trí axit amin mà đã biết có khả năng tương tác với amyloid. Theo một phương án khác, thể đột biến này gồm sự thay thế, khuyết đoạn và/hoặc chèn đoạn tại một vị trí axit amin là axit amin được bảo toàn trong g3p thể đại hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó. Theo một số phương án, đột biến này có sự sai khác về trình tự axit amin không quá 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 2, 1 axit amin khi so với trình tự tham chiếu. Theo một số phương án, sự thay thế axit amin này là sự thay thế bảo toàn. Thuật ngữ “biến thể” và “thể đột biến” được sử dụng theo sáng chế thay thế cho nhau ngoại trừ “biến thể” là dạng không tái tổ hợp thường xuất hiện trong tự nhiên, trái lại “thể đột biến” thường là dạng tái tổ hợp.

Thuật ngữ “tính nghiêm ngặt cao” được sử dụng theo sáng chế, bao gồm các điều kiện dễ dàng xác định được bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, dựa trên, ví dụ, chiều dài của ADN. Nói chung, các điều kiện nghiêm ngặt được định nghĩa trong Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), và bao gồm việc sử dụng dung dịch rửa trước cho bộ lọc nitroxenluloza 5X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (PH 8,0), trong điều kiện lai 50% formamit, 6X SSC ở 42°C (hoặc các dung dịch lai tương tự, như dung dịch Stark, trong 50% formamit ở 42°C), và rửa ở khoảng 68°C, 0,2X SSC, 0,1% SDS. Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ xác định được nhiệt độ và nồng độ muối hòa tan để có thể điều chỉnh được theo các yếu tố như chiều dài của đoạn dò.

Thuật ngữ “tính nghiêm ngặt trung bình” được sử dụng theo sáng chế, kể cả các điều kiện có thể được xác định bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này dựa trên,

ví dụ, chiều dài của ADN. Điều kiện cơ bản được đưa ra bởi Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), và bao gồm việc sử dụng dung dịch rửa trước cho bộ lọc nitrocellulose 5X SSC, 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH 8,0), điều kiện lai 50% formamit, 6X SSC ở 42°C (hoặc các điều kiện lai tương tự, như dung dịch Stark, trong 50% formamit ở 42°C), và điều kiện rửa tại 60°C, 0,5X SSC, 0,1% SDS.

Thuật ngữ “tính tương đồng về trình tự cao” nghĩa là có độ tương đồng ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 75%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 85%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 91%, ít nhất bằng 92%, ít nhất bằng 93%, ít nhất bằng 94%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 96%, ít nhất bằng 97%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99% trình tự axit amin so với trình tự tham chiếu như được xác định bằng chương trình máy tính đã biết, như chương trình Bestfit.

Thuật ngữ “protein dung hợp” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ protein không xuất hiện trong tự nhiên chứa ít nhất hai miền polypeptit.

“Protein dung hợp g3p” chứa ít nhất protein g3p gắn kết với miền thứ hai.

“Protein dung hợp N1-N2” (còn được gọi với thuật ngữ “protein dung hợp N1N2”) chứa miền N1 và N2 (hoặc dạng đột biến, mảnh hoặc biến thể hoặc dạng khác của nó), nhưng không chứa miền N3/CT của protein g3p gắn kết với miền thứ hai. Protein dung hợp N1N2 có thể chứa hoặc không chứa vùng bản lề.

“Protein dung hợp N2” chứa miền N2 (hoặc thể đột biến, mảnh, hoặc biến thể của N2), nhưng không chứa miền N1 và N3/CT, của protein g3p gắn kết với miền thứ hai. Protein dung hợp N2 có thể chứa hoặc không chứa vùng bản lề.

Như được sử dụng theo sáng chế, “cấu trúc 1” có nguồn gốc từ M13 thể đại (xem: tài liệu Genbank: NC_003287.2, phiên bản GI:56718463. Trong cấu trúc 1, khi so sánh với M13 thể đại, Ser378(AGC) được thay bằng Gly(GGC), và Ile87 (ATT) được thay bằng Asn(AAC)). Cấu trúc 1 chứa axit nucleic nêu trong SEQ ID NO.10.

“Cấu trúc 2” là M13 thể đại phân lập được (GenBank JX412914.1). Cấu trúc 2 chứa trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO.12.

“Cấu trúc 3” là mảnh g3p hòa tan tái tổ hợp chứa miền N1 và N2 của g3p (rs-g3p(N1N2)) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.20.

“Cấu trúc 4” là protein dung hợp IgG4 Fc mảnh g3p hòa tan tái tổ hợp (rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc) chứa axit amin of SEQ ID NO.9. Vùng N1N2 của “cấu trúc 4” có nguồn gốc từ vùng N1N2 của “cấu trúc 1.”

“Cấu trúc 5” là protein dung hợp IgG4 Fc mảnh g3p hòa tan tái tổ hợp (rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc) chứa axit amin nêu trong SEQ ID NO.11. Vùng N1N2 của “cấu trúc 5” có nguồn gốc từ vùng N1N2 của “cấu trúc 2.”

“Cấu trúc 6” là protein dung hợp IgG4 Fc mảnh g3p hòa tan tái tổ hợp (rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc) chứa axit amin nêu trong SEQ ID NO.13. Vùng N1N2 của “cấu trúc 6” có nguồn gốc từ vùng N1N2 của “cấu trúc 2.”

Nguồn g3p

Thực khuẩn thể dạng sợi là một nhóm virus liên quan đến sự lây nhiễm vi khuẩn gram âm, như là, ví dụ, *E. coli*. Ví dụ, xem: Rasched and Oberer, *Microbiology Reviews* (1986) Dec:401-427. Các ví dụ về thực khuẩn thể dạng sợi bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, thực khuẩn thể họ Ff (tức là, ít nhất M13, f1 và fd) và thực khuẩn thể họ-I (tức là, ít nhất I22, Ike và If1).

Tất cả thực khuẩn thể dạng sợi chứa g3p này xuất hiện trong tự nhiên như lớp protei vỏ ngoài thứ yếu có từ 3 đến 5 bản sao trong mỗi thực khuẩn thể. Do đó, theo một khía cạnh của sáng chế, g3p phân lập được này có nguồn gốc từ thực khuẩn thể dạng sợi bất kỳ xuất hiện trong tự nhiên. Dạng tái tổ hợp của g3p này cũng có thể được tạo ra. Dạng g3p này có thể tương đương với g3p thể đại xuất hiện trong tự nhiên. Do đó, g3p phân lập được, tái tổ hợp cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Một ví dụ về g3p, từ thực khuẩn thể M13, là trình tự được nêu trong SEQ ID NO.1. Trừ khi có quy định cụ thể khác, thể đột biến g3p bất kỳ được mô tả được tham chiếu đến trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 dưới đây ở dạng bình thường và dạng có chú giải:

1	AETVESCLAK	PHTENSFTNV	WKDDKTLDRY	ANYEGCLWNA	TGVVVCTGDE
TQCYGTWVPI					
61	GLAIPENEGG	GSEGGGSEGG	GSEGGGTKPP	EYGDTPIPGY	TYINPLDGTY
PPGTEQNPNAN					
121	PNPSLEESQP	LNTFMFQNNR	FRNRQGALTV	YTGTVTQGTD	PVKTTYQYTP
VSSKAMYDAY					

181 WNGKFRDCAF HSGFNEDPFV CEYQGQSSDL PQPPVNAGGG SGGGSGGGSE
GGGSEGGGSE

241 GGGSEGGGSG GSGSGGDFDY EKMANANKGA MTENADENAL QSDAKGKLD
VATDYGAAID

301 GFIGDVSGLA NGNGATGDFA GSNSQMAQVG DGDNSPLMNN FRQYLP
SLPQ SV ECRPFVFS

361 AGKPYEFSID CDKINLFRGV FAFLLYVATF MYVFSTFANI LRNKES

SEQ ID NO.1 được chú giải

1 AETVESCLAK PHTENSFTNV WKDDKTLDY ANYEGCLWNA TGVVVCTGDE
TQCYGTWVPI

61 GLAIPENEGG GSEGGGSEGG GSEGGGTKPP EYGDTPIPGY TYINPLDGT
PPGTEQN PAN

121 PNPSLEESQP LNTFMFQNNR FRNRQALTV YTGTVTQGTD PVKTTYQYTP
VSSKAMYDAY

181 WNGKFRDCAF HSGFNEDPFV CEYQGQSSDL PQPPVNAGGG SGGGSGGGSE
GGGSEGGGSE

241 GGGSEGGGSG GSGSGGDFDY EKMANANKGA MTENADENAL QSDAKGKLD
VATDYGAAID

301 GFIGDVSGLA NGNGATGDFA GSNSQMAQVG DGDNSPLMNN FRQYLP
SLPQ SV ECRPFVFS

361 AGKPYEFSID CDKINLFRGV FAFLLYVATF MYVFSTFANI LRNKES

Bảng 1 - Vị trí đánh dấu cho SEQ ID NO.1 được chú giải

Vùng	Gốc	Gốc khi có peptit tín hiệu	Vị trí đánh dấu
N1	1-67	19-85	gạch chân
G1	68-86	86-104	bôi đen
N2	87-217	105-235	Gạch chân và chữ đậm
G2	218-256	236-274	nghiêng
N3	257-406	275-424	bôi đen và gạch chân

SEQ ID NO.1 là trình tự GenBank NP-510891.1 được loại bỏ đoạn peptit tín hiệu gồm 18 axit amin, do đó, axit amin này được đánh số theo g3p trưởng thành. Peptit tín hiệu nói chung chứa cấu trúc biểu hiện bất kỳ, và g3p trưởng thành này chứa peptit tín hiệu trong các phương án khác nhau theo sáng chế trừ khi nêu rõ là nó không chứa peptit

tín hiệu. SEQ ID NO.1 được đề cập đến như là một trình tự tham khảo. Trình tự này không nhằm mục đích hạn chế phạm vi của sáng chế.

Đã biết trình tự g3p từ nhiều nguồn khác nhau. Ví dụ về trình tự axit amin g3p đối với thực khuẩn thể họ Ff bao gồm trình tự được tìm thấy trong UniProt với số truy cập P69169 (thực khuẩn thể f1), P03661 (thực khuẩn thể fd), và P69168 (thực khuẩn thể m13). Ví dụ về trình tự axit amin g3p đối với thực khuẩn thể họ-I bao gồm P15415 (thực khuẩn thể I22), P03663 (thực khuẩn thể Ike), và O80297 (thực khuẩn thể If1). Kết quả so sánh một số trình tự g3p được nêu trong Fig.2.

G3p hữu dụng theo sáng chế cũng chứa mảnh, thể đột biến và/hoặc biến thể của g3p. Thể đột biến hoặc biến thể này có thể được mô tả khi tham chiếu đến g3p hoặc tham chiếu đến mảnh g3p. Mảnh hoặc g3p có chiều dài bất kỳ, kể cả và/hoặc biến thể của nó miễn là duy trì được khả năng gắn kết với amyloid, không xét đến khả năng phân ly amyloid vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế. Protein bất kỳ “chứa” g3p như vậy cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Tương tự, protein “chứa”, “bao gồm”, “về cơ bản bao gồm”, hoặc “có” g3p như vậy cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Mảnh g3p gắn kết với amyloid và phân ly amyloid

Như đã đề cập ở trên, g3p có hai vùng đầu amin, N1 và N2, mà hai vùng này tương tác với với nhau để tạo ra phức hợp N1-N2, và một vùng đầu carboxyl, N3 (còn được gọi là “CT”). Trong thực khuẩn thể Ff, vùng N1 chứa các gốc 1-67 và miền N2 chứa các gốc 87-217 của g3p trưởng thành. Các gốc 87-123 tạo thành bản lề cho phép đóng và mở giữa N1 và N2. Đôi khi, bản lề này được xem như một phần của N2, trái lại, trong trường hợp khác, nó được coi như thành phần riêng biệt. N1 và N2 cũng được liên kết với nhau bằng trình tự liên kết giàu glyxin linh động. Trong N1, có hai cầu disulphua nằm giữa Cys7 và Cys36 và giữa Cys46 và Cys53. Có một cầu disulphua đơn trong N2 giữa Cys188 và Cys201. Miền N3/CT chứa các gốc từ 257 đến 406. Hollinger, 1999; Marvin, 1998. Trong vùng đầu carboxy, có một cầu disulphua nằm giữa Cys354 và Cys371. Marvin, 1998. Không có vùng xen giữa các cầu disulphua trong g3p.

Ví dụ không giới hạn về mảnh gắn kết với amyloid của g3p bao gồm miền N2 hoặc bản lề (ví dụ, ít nhất các gốc 87-217 nêu trong SEQ ID NO.1) hoặc không có bản lề (ví dụ, ít nhất các gốc 124-217 nêu trong SEQ ID NO.1); và miền N1-N2 (ví dụ, ít nhất các gốc 1-67 và 87-217 nêu trong SEQ ID NO.1), có hoặc không có trình tự liên kết (ví

dụ, có hoặc không có các gốc 68-86 nêu trong SEQ ID NO.1), và có hoặc không có bản lề. Trong ví dụ bất kỳ nêu trên, mảnh N2 hoặc N1N2 có thể là N2 hoặc N1N2 được tìm thấy trong thực khuẩn thể dạng sợi thể đại hoặc N2 hoặc N1N2 tái tổ hợp. Trong các ví dụ bất kỳ nêu trên, mảnh N2 hoặc N1N2 có thể là thể đột biến hoặc biến thể của trình tự thực khuẩn thể dạng sợi thể đại.

Mảnh gắn kết với amyloid hữu ích của g3p bao gồm mảnh g3p bất kỳ, kể cả mảnh N2 và N1N2 mà vẫn giữ được khả năng liên kết với amyloid, mà không quan tâm đến khả năng phân ly amyloid của mảnh này. Protein bất kỳ “chứa” mảnh gắn kết với amyloid như vậy (hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó) cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Trái lại, protein “chứa”, “bao gồm”, “về cơ bản bao gồm” hoặc “có” mảnh g3p hoặc biến thể của nó cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Thể đột biến và biến thể của polypeptit N2 và N2

Việc so sánh cấu trúc sơ bộ của N2 từ: fd, f1, M13, Ike, I2-2, và If1 được nêu trong Fig.26. Axit amin của fd được nêu trong SEQ ID NO.14; f1 nêu trong SEQ ID NO.15; M13 nêu trong SEQ ID NO.16; Ike nêu trong SEQ ID NO.17; I2-2 nêu trong SEQ ID NO.18; và If1 nêu trong SEQ ID NO.19. Dựa vào hình vẽ này và kết quả so sánh để định hướng, theo một phương án, sáng chế bao hàm cả polypeptit N2, thể đột biến polypeptit N2, và biến thể polypeptit N2, chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19, kể cả mảnh gắn kết với amyloid bất kỳ của nó.

Theo một phương án khác, polypeptit N2 này là thể đột biến hoặc biến thể của polypeptit N2 mà vẫn giữ được khả năng gắn kết với amyloid và có sự sai khác về trình tự axit amin không quá 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 axit amin khi so sánh với trình tự axit amin bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19. Trong Fig.26, dấu hoa thị “*” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vị trí gốc đơn được bảo toàn hoàn toàn. Dấu hai chấm “:” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự bảo toàn giữa các nhóm có các đặc tính rất giống nhau có điểm số lớn hơn 0,5 trong ma trận Gonnet PAM 250. Dấu chấm “.” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự bảo toàn giữa các nhóm có đặc tính khá giống nhau mà có điểm số trung bình bằng hoặc thấp hơn 0,5 trong ma trận Gonnet PAM 250. Theo một số khía cạnh của phương án này, thể đột biến hoặc biến thể của polypeptit N2 không có sự sai khác về trình tự axit amin ở vị trí bất kỳ được đánh dấu “*” trong Fig.26. Theo khía cạnh cụ thể hơn, thể đột biến hoặc biến thể

của polypeptit N2 không có sự sai khác về trình tự axit amin ở vị trí bất kỳ được đánh dấu “*” và có axit amin giống như axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO.14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19 tại mỗi vị trí được đánh dấu “:” trong Fig.26. Theo khía cạnh cụ thể hơn nữa, thể đột biến hoặc biến thể của polypeptit N2 không có sự sai khác về trình tự axit amin tại vị trí được đánh dấu “*” và có axit amin giống như axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO.14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19 tại mỗi vị trí được đánh dấu “:” và tại mỗi vị trí được đánh dấu “.” trong Fig.26.

Theo phương án khác, biến thể của polypeptit N2 được xác định bằng cách xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng so với trình tự nêu trong SEQ ID NO.14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19 và dự báo được rằng biến thể của polypeptit N2 này có khả năng gắn kết được với amyloid. Theo phương án này, polypeptit N2 có độ tương đồng về trình tự đạt ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 85%, ít nhất bằng 86%, ít nhất bằng 87%, ít nhất bằng 88%, ít nhất bằng 89%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 91%, ít nhất bằng 92%, ít nhất bằng 93%, ít nhất bằng 94%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 96%, ít nhất bằng 97%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99% so với trình tự axit amin tham chiếu nêu trong SEQ ID NO.14, 15, 16, 17, 18 hoặc 19.

Theo phương án khác, polypeptit N2 được xác định bằng cách xác định tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin so với vùng N2 nêu trong SEQ ID NO.1, dự báo trước được rằng biến thể của polypeptit N2 này gắn kết được với amyloid. Theo phương án này, biến thể của polypeptit N2 có độ tương đồng về trình tự đạt ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 85%, ít nhất bằng 86%, ít nhất bằng 87%, ít nhất bằng 88%, ít nhất bằng 89%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 91%, ít nhất bằng 92%, ít nhất bằng 93%, ít nhất bằng 94%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 96%, ít nhất bằng 97%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99% so với vùng N2 nêu trong SEQ ID NO.1.

Theo phương án khác nữa, polypeptit N2 được xác định bởi cấu trúc bậc hai hoặc bậc ba. Đã biết rằng miền fd-N2 và If1-N2 sử dụng phân tương ứng trên bề mặt để liên kết với cùng vị trí trong F-pilus của *E. coli*. Lorenz et al., J Mol Biol. 405:989-1003 (2011) tại vị trí, ví dụ, 990. Các gốc axit amin và cấu trúc bậc hai và bậc ba này gây ra sự gắn kết của N2 với F-pilus đồng thời cũng gây ra sự gắn kết N2 với amyloid. Do đó, các gốc axit amin và cấu trúc bậc hai và bậc ba chịu trách nhiệm đối với sự gắn kết của N2

vào F-pilus cũng chịu trách nhiệm đối với sự gắn kết N2-amyloid. Biến thể của polypeptit N2 chứa trình tự axit amin cần để duy trì cấu trúc bậc hai hoặc bậc ba trong miền gắn kết N2-F-pilus cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Thế đột biến và biến thể của polypeptit N1N2 và N1N2

Kết quả của việc so sánh cấu trúc sơ cấp của fd, fl và M13 được thể hiện trong Fig.2A, và Ike, I2-2, và Ifl được thể hiện trong Fig.2B. Sử dụng kết quả so sánh này làm định hướng, một phương án của sáng chế bao hàm polypeptit N1N2, thế đột biến của polypeptit này, hoặc biến thể của polypeptit này chứa axit amin được bảo toàn giữa fd, fl và M13 hoặc được bảo toàn giữa I2-2, Ide và Ifl, được xác định bằng cách tham chiếu đến trình tự nêu trong Fig.2. Theo phương án khác, polypeptit N1N2 này là thế đột biến hoặc biến thể của polypeptit N1N2, mà chúng vẫn duy trì được khả năng gắn kết với amyloid và có sự sai khác về trình tự axit amin không quá 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 axit amin khi so với trình tự axit amin trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO.1, 2, 3, 5 hoặc 6.

Theo phương án khác, polypeptit N1N2, thế đột biến hoặc biến thể được xác định theo tỷ lệ độ tương đồng về trình tự axit amin với vùng N1N2 của SEQ ID NO.1, dự báo trước được rằng biến thể của polypeptit N1N2 này gắn kết với amyloid. Theo phương án này, biến thể của polypeptit N1N2 này có độ tương đồng về trình tự ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 85%, ít nhất bằng 86%, ít nhất bằng 87%, ít nhất bằng 88%, ít nhất bằng 89%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 91%, ít nhất bằng 92%, ít nhất bằng 93%, ít nhất bằng 94%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 96%, ít nhất bằng 97%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99% so với vùng N1 và N2 nêu trong SEQ ID NO.1.

Protein dung hợp

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein dung hợp. Protein dung hợp này chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p, phân tử gắn kết với TolA, hoặc chất ức chế TolA. Protein dung hợp này chứa thế đột biến hoặc biến thể g3p kể cả mảnh g3p. Protein dung hợp này được liên kết, dung hợp, tiếp hợp, bắt cặp hoặc liên quan đến/với ít nhất một protein bổ sung hoặc miền protein mà thông thường nó không liên quan. Theo một phương án, protein dung hợp này là protein dung hợp g3p chứa protein g3p liên kết với miền thứ hai. Theo một phương án khác, protein dung hợp này là mảnh gắn kết với amyloid của protein protein g3p liên kết với miền thứ hai. Theo một phương án khác,

protein dung hợp này là protein dung hợp N1N2, mà protein này chứa miền N1 và N2, nhưng không chứa miền CT, của protein g3p. Theo một phương án khác nữa, protein dung hợp này protein dung hợp N2, mà protein này chứa miền N2 nhưng không chứa miền N1 cũng như miền CT của protein g3p. Như đã đề cập, một số khía cạnh của sáng chế liên quan đến protein g3p được cải biến hoặc đột biến hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó, và miền gắn kết với miền N2 hoặc N1N2 được cải biến hoặc đột biến mà gắn kết với sợi amyloid. Do đó, protetin dung hợp chứa các dạng được cải biến hoặc đột biến cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

G3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid và phần polypeptit dung hợp có thể là một phần của trình tự axit amin liền kề với phần polypeptit trực tiếp liên kết với phần polypeptit dung hợp được liên kết với nhau một cách trực tiếp hoặc thông qua một cầu nối peptit ngắn hoặc là ở đầu N hoặc là ở đầu C của g3p hoặc mảnh gắn kết với polypeptit amyloid. Trong trường hợp này, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó và phần polypeptit dung hợp có thể được dịch mã như đoạn polypeptit đơn lẻ từ trình tự mang mã mà nó mã hóa cả g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó và phần polypeptit dung hợp này.

Theo một số phương án, protein dung hợp chứa vùng hằng định của globulin miễn dịch làm miền thứ hai. Protetin dung hợp này chứa vùng hằng định của globulin miễn dịch liên kết với protein quan tâm, hoặc mảnh của nó, đã được mô tả (ví dụ, xem: US. 5,480,981 và US 5,808,029; Gascoigne et al. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2936; Capon et al. 1989, *Nature* 337:525; Traunecker et al. 1989, *Nature* 339:68; Zettmeissl et al. 1990, *DNA Cell Biol. USA* 9:347; Byrn et al. 1990, *Nature* 344:667; Watson et al. 1990, *J. Cell. Biol.* 110:2221; Watson et al. 1991, *Nature* 349:164; Aruffo et al. 1990, *Cell* 61:1303; Linsley et al. 1991, *J. Exp. Med.* 173:721; Linsley et al. 1991, *J. Exp. Med.* 174:561; Stamenkovic et al., 1991, *Cell* 66:1133; Ashkenazi et al. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535; Lesslauer et al. 1991, *Eur. J. Immunol.* 27:2883; Peppel et al. 1991, *J. Exp. Med.* 174:1483; Bennett et al. 1991, *J. Biol. Chem.* 266:23060; Kurschner et al. 1992, *J. Biol. Chem.* 267:9354; Chalupny et al. 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10360; Ridgway and Gorman, 1991, *J. Cell. Biol.* 115, Abstract No. 1448; Zheng et al. 1995, *J. Immun.* 154:5590). Các phân tử này thường có cả hoạt tính sinh học liên quan đến phân tử liên kết quan tâm cũng như vai trò chức năng là chất tác động, hoặc một số

đặc tính quan tâm khác được mô tả liên quan đến vùng bảo toàn của globulin miễn dịch (ví dụ, tính ổn định sinh học, sự bài tiết của tế bào).

Theo một số phương án, protein dung hợp này chứa mảnh Fc của vùng globulin bảo toàn. Catxét biểu hiện Fc có thể mua được trên thị trường. Mảnh Fc này có thể chứa miền CH2 và CH3 của globulin miễn dịch và vùng bản lề của globulin miễn dịch. Mảnh Fc này có thể là mảnh Fc của IgG1, IgG2, gG3 hoặc IgG4. Theo một phương án cụ thể, phần vùng hằng định của globulin miễn dịch là mảnh Fc của IgG1. Theo một phương án khác, phần miền globulin miễn dịch là mảnh Fc của IgG4. Cũng theo một phương án khác nữa, phần vùng hằng định của globulin miễn dịch là mảnh Fc của IgM.

Do đó, theo một phương án, g3p hòa tan tái tổ hợp hoặc mảnh gắn kết với amyloid được dung hợp với miền Fc của globulin miễn dịch bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn. G3p hòa tan tái tổ hợp hoặc mảnh gắn kết với amyloid này có thể được cải biến hoặc gây đột biến. Ví dụ, mảnh gắn kết với amyloid của g3p, như miền N1N2 hoặc miền N2, có thể được nhân dòng vào vector biểu hiện dung hợp IgGFC. Ví dụ về vector dung hợp IgGFC bao gồm, ví dụ, vector của pFUSE-Fc của hãng InvivoGen. Theo một số phương án, protein dung hợp dạng tam giá thu được (ví dụ, g3p(N1N2)-IgGFC hoặc g3p(N2)-IgGFC có ái lực gắn kết với amyloid cao hơn ái lực của dạng g3p hòa tan tái tổ hợp khi chúng ở dạng lưỡng giá.

Theo phương án khác, protein dung hợp này chứa protein không phải là Fc gắn kết với g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của g3p.

Theo phương án khác, protein dung hợp này chứa ít nhất hai polypeptit g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó. Theo phương án khác, protein dung hợp này chứa ba polypeptit g3p hoặc nhiều hơn, hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó. Theo phương án khác, protein dung hợp này chứa năm polypeptit g3p, hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó. Protein dung hợp dạng lưỡng thể hoặc dạng đa thể có sự tương tác ái tính cao hơn khi chúng có nhiều hơn một g3p, hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó.

Theo phương án khác, protein dung hợp chứa albumin. Ví dụ, xem: US. 6,686,179 được cấp cho Fleer.

Trong các trường hợp, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của g3p trong protein dung hợp bao hàm cả thể đột biến và biến thể của nó.

Nói chung, protein dung hợp gắn kết với amyloid ít nhất có hiệu lực như g3p không gắn kết hoặc mảnh g3p của nó. Nếu thích hợp, protein dung hợp này ít nhất có hiệu quả gây ra sự phân ly của amyloid, thúc đẩy sự đào thải amyloid, ức chế sự kết tụ amyloid, và/hoặc loại bỏ hoặc ngăn ngừa sự hình thành các oligome độc tương ứng với g3p không gắn kết hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án, protein dung hợp này gắn kết với amyloid và ít nhất có hiệu lực gây ra sự phân ly của amyloid, thúc đẩy sự đào thải amyloid, ức chế sự kết tụ amyloid, và/hoặc loại bỏ hoặc ngăn ngừa sự hình thành các oligome độc như dạng g3p hòa tan, tái tổ hợp được nêu trong SEQ ID NO.1. Theo phương án khác nữa, protein dung hợp này gắn kết với amyloid và ít nhất có hiệu lực gây ra sự phân ly của amyloid, thúc đẩy sự đào thải amyloid, ức chế sự kết tụ amyloid, và/hoặc loại bỏ hoặc ngăn ngừa sự hình thành các oligome độc như thực khuẩn thể M13. Theo phương án khác nữa, protein dung hợp này gắn kết với amyloid và nó hiệu quả hơn trong việc gây ra sự phân ly của amyloid, thúc đẩy sự đào thải amyloid, ức chế sự kết tụ amyloid, và/hoặc loại bỏ hoặc ngăn ngừa sự hình thành các oligome độc hơn thực khuẩn thể M13. Theo một số phương án, protein dung hợp này gắn kết với amyloid và ít nhất có hiệu quả tương đương trong việc làm giảm amyloid trong bệnh do gấp nếp sai protein so với thực khuẩn thể M13. Theo phương án khác nữa, protein dung hợp này gắn kết với amyloid và hiệu quả hơn trong việc làm giảm amyloid đối với bệnh do gấp nếp sai protein so với thực khuẩn thể M13. Theo phương án khác nữa, protein dung hợp này gắn kết với amyloid và ít nhất có hiệu quả hơn trong việc ngăn ngừa sự hình thành amyloid so với thực khuẩn thể M13.

Protetin dung hợp này có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, protein dung hợp theo sáng chế có thể được tổng hợp tái tổ hợp trong tế bào (ví dụ, xem: Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. and Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). Alternatively, Protein dung hợp theo sáng chế có thể tổng hợp được bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp đã biết như là phương pháp tổng hợp thực khuẩn thể pha rắn. Các kỹ thuật tổng hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem: Merrifield, 1973, *Chemical Polypeptides*, (Katsoyannis and Panayotis eds.) pp. 335-61; Merrifield 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Davis et al. 1985, *Biochem. Intl.* 10:394; Finn et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.) 2:105; Erikson et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.)

2:257; U.S. Patent No. 3,941,763. Ngoài ra, cấu trúc cuối cùng, về cơ bản có thể chia sẻ cấu trúc chức năng như protein dung hợp được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, hoặc đơn giản là được tạo ra bằng kỹ thuật không tái tổ hợp, như là kỹ thuật cắt bằng hóa chất. Thành phần của protein dung hợp này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp luận chung được mô tả để biểu hiện g3p và thể đột biến g3p.

Theo một số phương án, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid (hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó) có thể được dung hợp với trình tự đánh dấu, như peptit nhằm thuận lợi trong việc tinh chế polypeptit dung hợp (hoặc là độc lập, hoặc là bổ sung để dung hợp với protein khác hoặc kết hợp với phân tử mang). Trình tự axit amin đánh dấu này có thể là peptit hexa-histidin được đánh dấu trong vector pQE (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), ngoài ra, đã có nhiều trình tự đã được bán trên thị trường. Ví dụ, như mô tả trong ấn phẩm Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 86:821-824, hexa-histidin giúp dễ dàng tinh chế protein dung hợp. Một peptit đánh dấu khác được sử dụng để tinh chế, chất đánh dấu hemagglutinin (HA), tương tự epitop có nguồn gốc từ protein cúm HA. (Wilson et al., (1984) *Cell* 37:767).

Thực khuẩn thể biểu hiện quá mức g3p

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực khuẩn thể được cải biến để làm tăng số lượng bản sao của g3p khi được biểu hiện trong thực khuẩn thể, cao hơn mức 3-5 bản sao thường được tìm thấy trong thực khuẩn thể dạng sợi thể đại. Theo một phương án, thực khuẩn thể mà biểu hiện tăng số lượng g3p này có thể được chọn từ các biến thể xuất hiện trong tự nhiên. Theo một phương án khác, kỹ thuật tái tổ hợp thường được dùng để tăng số lượng bản sao của g3p.

Theo một số phương án, trình mã hóa g3p thể đại hoặc mảnh gắn kết với amyloid của g3p (kể cả thể đột biến hoặc biến thể của nó) có thể được sử dụng để thay thế gen mã hóa protein khác của vỏ thực khuẩn thể. Tùy theo gen của thực khuẩn thể được thay thế, số lượng của g3p có thể tăng đến 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 500, 1000 hoặc thậm chí đến gần 3000 bản sao (ví dụ, nếu trình tự mã hóa gen 3 được sử dụng để thay thế cho trình tự mã hóa gen 8 hoặc được dung hợp vào đầu của trình tự mã hóa gen 8).

Để tạo ra thực khuẩn thể biểu hiện thêm bản sao của g3p, trình tự mã hóa g3p (hoặc biến thể hoặc thể đột biến của nó) được nhân dòng như được mô tả ở phần bên

dưới của bản mô tả. Trình tự mã hóa g3p (hoặc biến thể hoặc thể đột biến của nó) có thể được sử dụng để thay thế và biểu hiện cho gen thực khuẩn thể khác, nếu cần để tiếp hợp với thực khuẩn thể trợ giúp.

Theo cách khác, theo một số phương án trình tự mã hóa g3p (hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó) được sử dụng làm khung cho trình tự mã hóa cho gen thực khuẩn thể khác, cùng với hoặc không cùng với trình tự “không gian” xen giữa. Phương pháp sản xuất protein thực khuẩn thể mà “dung hợp” với protein hoặc peptit khác là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể, và g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó có thể “được biểu hiện” theo cùng cách, ví dụ, chuỗi kháng nguyên hoặc kháng thể. Ví dụ, Scott & Smith, Science (1990) 249:386-90; Devlin et al., Science (1990) 249:404-06. Nếu chỉ mong muốn g3p được biểu hiện, trình tự mã hóa cho mảnh (hoặc biến thể hoặc thể đột biến của nó) có thể được liên kết với gen khác sao cho một trình tự liên kết Ser/Gly tự nhiên có trong g3p và đóng vai trò như cầu liên kết. Theo một số phương án, chỉ có trình tự mã hóa miền N2 hoặc N1N2 (hoặc biến thể hoặc thể đột biến của nó) được dung hợp vào khung của gen khác.

G3P đột biến và mảnh gắn kết với amyloid

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến protein g3p đột biến và mảnh đột biến gắn kết với amyloid của nó. Protetin dung hợp và thực khuẩn thể này chứa protein g3p đột biến và mảnh gắn kết với amyloid của nó cũng là một phần của sáng chế. G3p đột biến và mảnh đột biến gắn kết với amyloid của nó này có thể được sản xuất, lựa chọn theo tính chất mà nó góp phần vào hiệu quả điều trị của dược phẩm theo sáng chế. Ví dụ, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó có thể được gây đột biến tái tổ hợp hoặc mặt khác được chọn lọc để có một hoặc nhiều đặc tính liên quan đến g3p của M13 sau: tăng ái lực gắn kết với amyloid, làm giảm bản lề T_M , tăng ái lực (mức hấp dẫn được tính từ ái tính mà mức hấp dẫn này được sử dụng để làm tăng tổng sự gắn kết với amyloid mà g3p này có hơn là một vị trí gắn kết với amyloid), tăng khả năng để phân ly sự kết tụ của amyloid, hoặc tăng khả năng ngăn ngừa sự kết tụ của sợi amyloid. Theo cách khác, hoặc theo phương án bổ sung, g3p đột biến hoặc mảnh đột biến gắn kết với amyloid của nó có thể kết hợp với các đặc tính hữu ích khác được mô tả trong phần mô tả bên dưới đây.

Protein g3p đột biến có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến gen thực khuẩn thể, hoặc bằng kỹ thuật tái tổ hợp, như đột biến điểm trực tiếp trên cơ sở PCR hoặc đột biến ngẫu nhiên.

Theo một số phương án, thể đột biến có ái lực cao hơn được tạo ra bằng cách đột biến M13 và tiếp đó chọn lọc thực khuẩn thể theo cột ái lực với amyloid cùng với điều kiện lai nghiêm ngặt. Các vòng lặp lại gồm gắn kết, rửa, phân tách và tiếp đó là nhân nhanh làm giàu thực khuẩn thể mà liên kết ái lực cao với amyloid. Sau khi thu được quần thể thực khuẩn thể có ái lực được tăng lên bằng cách sử dụng các dòng đơn lẻ, sàng lọc amyloid thì các dòng đơn có ái lực cao được chọn lọc và phân tích. Bằng cách này, thể đột biến có thể được chọn lọc để gắn kết với amyloid với ái lực cao theo cách đột biến ngẫu nhiên.

G3p, hoặc mảnh gắn kết với amyloid bất kỳ của nó, (ví dụ, miền N1N2 hoặc miền N2) cũng có thể được gây đột biến bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp. Ví dụ, vector theo sáng chế mang g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó (ví dụ, N1N2 hoặc N2) có thể được gây đột biến bằng cách sử dụng phương pháp đột biến gen trên cơ sở PCR. Protein đột biến, mang mã này được biểu hiện và gắn kết với amyloid và ái lực của thể đột biến này cũng được đánh giá theo sáng chế.

Mảnh gắn kết với amyloid của g3p cũng có thể thu được từ g3p đột biến. Ví dụ, bằng cách đột biến g3p và/hoặc chọn lọc g3p đột biến với tính chất mong muốn và tiếp đó thu được mảnh gắn kết với amyloid mong muốn ví dụ, bằng cách thủy phân protein và tiếp đó là tinh chế.

Việc sàng lọc thực khuẩn thể mang g3p đột biến để tăng cường ái lực gắn kết với amyloid, thay đổi tính miễn cảm gắn kết theo nhiệt độ, v.v., có thể được sử dụng để nhận dạng thực khuẩn thể ngoài các đặc trưng khác của g3p của thực khuẩn thể đó. Việc sàng lọc các đặc tính như là tính miễn cảm với nhiệt độ của sự gắn kết có thể được sử dụng trong cột ái lực amyloid với một hoặc nhiều bước gắn kết, rửa, hoặc phân tách được thực hiện theo mô hình phụ thuộc vào nhiệt độ.

Theo một số phương án, g3p đột biến hoặc mảnh gắn kết với amyloid của g3p gắn kết với amyloid với ái lực cao hơn ít nhất 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 hoặc thậm chí 1000 lần so với sự gắn kết của g3p không đột biến hoặc mảnh g3p tương ứng của M13. Theo phương án khác, g3p đột biến hoặc mảnh gắn kết với amyloid của

g3p duy trì được sự gắn kết amyloid bền vững ít nhất bằng 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, hoặc 99% giống như sự gắn kết của g3p không đột biến hoặc mảnh g3p gắn kết với amyloid tương ứng của M13. Theo một số phương án g3p đột biến hoặc mảnh gắn kết với amyloid mà có biểu hiện ái lực gắn kết với amyloid thấp hơn so với dạng không đột biến tương ứng nhưng có đặc tính sinh học mong muốn khác (ví dụ, ái lực để phân ly amyloid; ái lực ngăn ngừa sự kết tụ sợi amyloid lớn hơn) hoặc đặc tính được phẩm (ví dụ, tính ổn định về mặt chuyển hóa tốt hơn, hồ sơ được động học thuận lợi hơn, tính tan tốt hơn) mà chúng được tăng cường khi so với dạng không đột biến tương ứng. Dạng gắn kết với tinh bột có thể đánh giá được bằng phương pháp cộng hưởng bề mặt hạt nhân hoặc bằng phương pháp cạnh tranh ELISA, như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo một số phương án, biến thể và/hoặc thể đột biến của g3p có thể xác định được bằng cách sàng lọc thư viện ADN được sử dụng để lai với g3p của M13 để chọn lọc DNA liên quan lai với g3p trong điều kiện lai hoặc là có tính nghiêm ngặt cao hoặc là có tính nghiêm ngặt trung bình.

Theo một số phương án, g3p đột biến là g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó được tạo ra bằng cách tái tổ hợp mà khác với protein g3p trưởng thành của M13 (SEQ ID NO.1) bởi ít nhất một gốc axit amin nhưng vẫn gắn kết với amyloid. Theo một số phương án, các đột biến điểm riêng lẻ cụ thể được xác định theo axit amin g3p của M13 g3p tại gốc cụ thể của protein trưởng thành và thay thế axit amin tại gốc đó. Ví dụ, "F194A" nghĩa là phenylalanin tại vị trí 194 của trình tự M13 trưởng thành đã được thay bằng alanin. Theo phương án khác, g3p đột biến được xác định theo tỷ lệ tương đồng về trình tự axit amin so với trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, dự báo trước được rằng g3p đột biến này gắn kết với sợi amyloid. Theo phương án này, g3p đột biến có độ tương đồng về trình tự đạt ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng 85%, ít nhất bằng 86%, ít nhất bằng 87%, ít nhất bằng 88%, ít nhất bằng 89%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 91%, ít nhất bằng 92%, ít nhất bằng 93%, ít nhất bằng 94%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 96%, ít nhất bằng 97%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99% so với trình tự có chiều dài đầy đủ nêu trong SEQ ID NO.1. Trong các phương án liên quan đến mảnh gắn kết với amyloid được đột biến của g3p, mảnh gắn kết với amyloid được đột biến này có độ tương đồng về trình tự đạt ít nhất ít nhất bằng 70%, ít nhất bằng 80%, ít nhất bằng

85%, ít nhất bằng 86%, ít nhất bằng 87%, ít nhất bằng 88%, ít nhất bằng 89%, ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 91%, ít nhất bằng 92%, ít nhất bằng 93%, ít nhất bằng 94%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 96%, ít nhất bằng 97%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99% so với mảnh có chiều dài toàn vẹn tương ứng nêu trong SEQ ID NO.1.

Trong thực tế, nếu polypeptit xác định bất kỳ có độ đồng nhất đạt ít nhất bằng 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 thì nó có thể dễ dàng xác định được bằng các chương trình máy tính đã biết, như là chương trình Bestfit. Khi sử dụng Bestfit hoặc chương trình so sánh khác để xác định xem liệu trình tự cụ thể nào đó, ví dụ, có đạt độ tương đồng đạt 95% với trình tự theo sáng chế hay không, thì các thông số sẽ được thiết lập, tất nhiên, tỷ lệ về độ tương đồng sẽ được tính theo chiều dài toàn vẹn của trình tự tham chiếu mà đồng dạng với trình tự truy vấn đó.

Theo một số phương án của các khía cạnh khác nhau, g3p đột biến và mảnh gắn kết với amyloid của nó không có đột biến tại gốc axit amin được bảo toàn trong g3p của họ Ff, họ I, hoặc cả họ Ff và họ I. Theo phương án khác, g3p đột biến và mảnh gắn kết với amyloid của nó đột biến nhiều nhất ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 gốc axit amin, mà các gốc được bảo toàn này thuộc g3p của họ Ff, họ I, hoặc cả họ Ff và họ I. Theo phương án khác nữa, g3p đột biến và mảnh gắn kết với amyloid của nó đột biến nhiều nhất tại 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 gốc axit amin, mà các gốc này không được bảo toàn trong g3p của họ Ff, họ I, hoặc cả họ Ff và họ I. Vẫn theo một phương án khác nữa, g3p đột biến và mảnh gắn kết với amyloid của nó đột biến nhiều nhất tại 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 gốc axit amin mà các gốc không được bảo toàn này nằm giữa một hoặc nhiều đoạn I22, Ike, và If1. Theo các phương án khác nữa, g3p đột biến và mảnh gắn kết với amyloid của nó đột biến nhiều nhất ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 gốc axit amin không được bảo toàn trong g3p của họ Ff, họ I, hoặc cả họ Ff và họ I. Theo một số phương án, nhiều nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 đột biến nằm trong miền N1. Theo một số phương án, nhiều nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 đột biến nằm trong miền N2. Theo một số phương án, nhiều nhất 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 đột biến nằm trong miền N2 nhưng không nằm trong vùng bản lề.

Đột biến điểm trực tiếp có thể có đích là các gốc đã biết giúp cho miền g3p, N1N2, hoặc N2 có độ ổn định cao. Ví dụ, các đột biến thay thế alanin tại D94 và T95;

E115; N122; L125; E126 và E127; E127 và E128; Q129; Q145; T154 và T156; Q157; T159 và D160; K163 và T164; Y166; và E196 và D197 đã cho thấy rằng không có ái lực gắn kết đáng kể với F-pili, Deng & Perham, 2002. Theo đó, các vị trí này chịu được đột biến và đột biến tại một hoặc nhiều vị trí này có thể, có tác dụng tăng cường hoặc trung hòa khả năng gắn kết với amyloid trong g3p và mảnh gắn kết với amyloid của g3p theo sáng chế. Do đó, theo một số phương án, sáng chế bao gồm cả g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của g3p đã được đột biến tại một hoặc nhiều vị trí D94, T95, E115, N122, L125, E126, E127, E128, Q129, Q145, T154, T156, Q157, T159, D160, K163, T164, Y166, E196 hoặc D197 (theo trình tự nêu trong SEQ ID NO.1). Theo một số phương án, việc đột biến này xảy ra tại một hoặc nhiều điểm D94, T95, E115, N122, L125, E126, E127, E128, Q129, Q145, T154, T156, Q157, T159, D160, K163, T164, Y166, E196 hoặc D197 không bị loại trừ thuộc đột biến alanin.

Các đột biến thay thế alanin tại F194; F190 và H191; K184, R186, và D187; R142 và R144 đã cho thấy trước khả năng tăng sự gắn kết với F-pili, Deng & Perham, 2002. Do đó, theo một số phương án, đột biến này được lựa chọn từ đột biến mà không có một hoặc nhiều gốc sau: R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 hoặc F194 (đánh số theo trình tự nêu trong SEQ ID NO.1). Tuy nhiên, việc thay thế R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 hoặc F194 bằng các gốc không phải là alanin có thể làm tăng sự gắn kết với amyloid. Do đó, theo một phương án, đột biến này là đột biến không liên quan đến alanin tại một hoặc nhiều điểm R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 hoặc F194. Theo một phương án, đột biến này là đột biến không liên quan đến alanin tại F194. Theo một phương án khác, đột biến này là đột biến không liên quan đến alanin tại F190 và H191. Theo một phương án khác, đột biến này là đột biến không liên quan đến alanin tại K184, R186 và D187. Theo một phương án khác, đột biến này là đột biến không liên quan đến alanin tại W181. Theo một phương án khác, đột biến này là đột biến không liên quan đến alanin tại R142 và R144. Theo một phương án cụ thể, đột biến này không loại trừ một hoặc toàn bộ các điểm: T13I, T101I, Q129H, G153D, W181A, F190A, F194A và D209Y.

Theo một số phương án, đột biến này xảy ra tại một hoặc nhiều gốc nằm trên bề mặt của miền N2, mà nó là một phần của g3p mà phần này gắn kết với F-pili. Theo một phương án, đột biến này là đột biến tại một hoặc nhiều gốc nằm trên vành ngoài của miền

N2. Theo phương án khác, đột biến này là đột biến tại một hoặc nhiều gốc nằm trên bề mặt của miền N2, là phần g3p gắn kết với TolA. Theo một phương án, đột biến này là đột biến tại một hoặc nhiều gốc nằm trên vành ngoài của miền N1. Theo một phương án khác, đột biến này là đột biến tại một hoặc nhiều gốc được sử dụng để hòa tan các gốc trên g3p. Theo một phương án khác nữa, (các) dạng đột biến cân bằng *cis/trans* tại Pro213 lớn hơn 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 95% *trans*. Do đó, Theo một số phương án, g3p này là g3p đột biến có cân bằng *cis/trans* tại Pro213 mà ít nhất 50, ít nhất 60, ít nhất bằng 70, ít nhất bằng 80, ít nhất bằng 90 hoặc ít nhất bằng 95% *trans*.

Theo một số phương án, thể đột biến g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó không bao gồm các gốc bảo toàn về mặt cấu trúc. Ví dụ về các gốc được bảo toàn về mặt cấu trúc bao gồm các gốc mà, không kể đến đoạn chèn tiềm năng, liên quan đến cấu trúc miền được đề cập trong cả hai thành viên họ Ff và họ I.

Theo một số phương án, đột biến bất kỳ được tạo ra nhằm bảo toàn sự gắn kết với amyloid. Theo phương án khác, đột biến này không thay thế gốc prolin.

Theo một số phương án, dạng đột biến bất kỳ được tạo ra để duy trì sự gắn kết với amyloid và không thay đổi gốc xystein. Theo một số phương án, dạng đột biến này bảo toàn tất cả, ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba trong bốn cầu disulphua có trong g3p. Do đó, theo một phương án, là dạng đột biến bất kỳ nhưng bảo toàn được hai cầu disulphua trong N1 nằm giữa Cys7 và Cys36 và nằm giữa Cys46 và Cys53. Theo một phương án khác, là dạng đột biến bất kỳ nhưng bảo toàn hoặc là, nhưng không phải là cả hai, cầu cầu disulphua trong N1 nằm giữa Cys7 và Cys36 và nằm giữa Cys46 và Cys53. Theo một phương án, cầu disulphua này nằm giữa Cys188 và Cys201 được bảo toàn. Theo một số phương án, mỗi cầu disulphua Cys7 và Cys36, Cys46 và Cys53 và Cys188 và Cys201 được bảo toàn. Theo một phương án, đột biến này bảo toàn cầu disulphua nằm giữa Cys354 and Cys371. Theo một số phương án, the mutations preserve cầu disulphua nằm giữa Cys7 và Cys36, Cys46 và Cys53, Cys188 và Cys201 và Cys354 và Cys371.

Theo một số phương án, dạng đột biến bất kỳ được tạo ra để duy trì sự gắn kết với amyloid và làm giảm nhiệt độ nóng chảy (T_M) của N1N2. T_M có thể xác định được bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Các đột biến mà làm giảm T_M của N1N2 được mong đợi để biểu hiện sự gắn kết tốt hơn với A β , ức chế sự tập hợp của A β để có mức tập trung lớn hơn, và ít nhất là có hiệu quả trong

phân tích sự phân ly g3p của M13. Theo đó, các đột biến như vậy, cũng như protetin dung hợp và thực khuẩn thể khác chứa các đột biến này được mong đợi ít nhất có hiệu quả về mặt trị liệu như trình tự tương ứng trong M13, protetin dung hợp của nó và M13 nguyên thể, một cách tương ứng, khi điều trị một hoặc nhiều bệnh gây ra bởi gấp nếp sai protein.

Các đột biến này cũng có thể được thiết kế chứa trình tự hướng đích. Trình tự hướng đích có thể được chèn vào vùng liên kết linh động nằm giữa N1N2 hoặc nằm giữa N2 và miền khác của trong protein dung hợp N2. Trình tự định vị nhân hướng đích (targeting nuclear localization sequences: NLS) có thể có lợi đối với bệnh Huntington. Hướng đích vào cơ quan nội bào có thể có lợi đối với bệnh Parkinson.

Ngoài việc hướng đích vùng đặc hiệu tế bào, trình tự hướng đích này có thể được sử dụng để nhắm đến các loại khác nhau của amyloid. Trình tự hạt nhân có thể làm tăng ái lực và trực tiếp dẫn protein đột biến hướng đến amyloid cụ thể. Các thể đột biến khác cũng có thể tạo ra được chứa trình tự peptit thực sự kỵ nước mà chúng có khả năng tự kết tủa. Ví dụ, trình tự AVVAI có thể được bổ sung vào g3p và/hoặc mảnh gắn kết với amyloid (ví dụ, N2 và N1N2) và/hoặc protetin dung hợp của nó để tạo ra protein thể khảm có trình tự gắn kết phức tạp được tăng cường. Một số ví dụ về peptit mà gắn kết với amyloid và có thể được kết hợp vào protein đột biến hoặc protein khảm chứa g3p, N2 và N1N2 và/hoặc protetin dung hợp của nó là chất ức chế peptit trên cơ sở khung GxFxGxF (SEQ ID NO.21) được mô tả trong Sato, Biochemistry (2006) 45:5503-16 và peptit KLVFF (SEQ ID NO.22) được mô tả trong Tjernberg et al., J. Biol. Chem. (1996) 271:8545-48. Các gốc hướng đích khác đã biết cũng được sử dụng theo sáng chế. Ví dụ, xem: Sciarretta et al., Methods in Enzymology (2006) 413:273-312.

Chất mang và tá được biểu hiện gắn kết với amyloid

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, g3p và mảnh gắn kết với amyloid của nó (kể cả thể đột biến và biến thể của dạng bất kỳ nêu trên), chứa nhưng không giới hạn ở miền N1N2 và miền N2, cũng như phân tử, polypeptit và protetin dung hợp chứa chúng có thể được kết hợp với các chất mang vô cơ hoặc hữu cơ khác miễn là đưa ra được khung phân tử bảo toàn được sự gắn kết với amyloid mà không có dấu hiệu bổ sung khác.

Theo một số phương án, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó hoặc protein dung hợp g3p và chất mang được gắn kết đồng hóa trị thông qua công cụ không phải là tái tổ hợp, như là, ví dụ, liên kết hóa học khác ngoài liên kết peptit. Liên kết chéo về mặt hóa học thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng. Phương pháp bất kỳ đã biết để liên kết đồng hóa trị polypeptit với phân tử khác (ví dụ, chất mang) cũng có thể được sử dụng. Theo một số phương án, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó hoặc protetin dung hợp g3p và chất mang này có thể được dung hợp với nhau thông qua một liên kết mà liên kết này chứa ít nhất một gốc axit amin hoặc gốc hóa học.

Theo một số phương án, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó hoặc protetin dung hợp g3p và chất mang được liên kết phi đồng hóa trị với nhau. Theo một số phương án này, chúng có thể được liên kết với nhau, ví dụ, bằng cách sử dụng các cặp gắn kết. Ví dụ về cặp gắn kết bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, biotin và avidin hoặc streptavidin, kháng thể và kháng nguyên của nó, v.v..

Ví dụ về chất mang bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, tiểu phân virus (kể cả thực khuẩn thể, xem bên dưới) trong đó protein g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid không cùng nguồn gốc với virus được kết hợp với nhau như một phần của cấu trúc virus đó; các polyme, hoặc là tự nhiên, hoặc là tổng hợp, hoặc là dạng phối hợp của chúng; cấu trúc phủ polyme, như là các hạt (kể cả các hạt dẫn xuất bề mặt); các axit polyamin, các axit nucleic; và các liposom. Chất mang này có thể được liên kết, hoặc là trực tiếp, hoặc là gián tiếp với g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó. Tùy theo chất mang, các liên kết trung gian có thể được sử dụng để tạo ra khoảng cách thích hợp nằm giữa chất mang và vùng gắn kết với amyloid.

Axit polyamin có thể là chất mang protein. Những axit polyamin này có thể được chọn từ albumin (album?) huyết thanh (như là HSA), một kháng thể khác hoặc phần của nó, ví dụ vùng Fc, fetuin A, fetuin B, vùng NFE2 (nuclear factor erythroid derivative-2) khóa leuxin, khóa leuxin vòng mạc trung tính (neuroretinal leucine zipper), tetranectin hoặc các axit polyamin khác, ví dụ, lysin. Vị trí gắn của axit polyamin này có thể là tại đầu N hoặc đầu C hoặc các vị trí khác nằm giữa và cũng có thể được nối với nhau bằng gốc liên kết hóa học với g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó.

Theo một số phương án, chất mang bao gồm các phân tử có miền được oligome hóa. Oligome hóa chỉ lợi thế chức năng khi một trong các chức năng của protein hoặc

mảnh của nó gắn kết với, kể cả đa hóa trị, làm tăng cường độ gắn kết và chức năng kết hợp với các miền khác. Các đặc điểm này được tìm thấy trong protein tự nhiên, tuy nhiên cũng có thể được đưa vào protein bằng kỹ thuật thao tác protein. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến g3p và mảnh gắn kết với amyloid (kể cả thể đột biến và biến thể của nó) như miền N1N2 và miền N2, chứa miền được oligome hóa, ví dụ, miền dime hóa. Các miền oligome hóa thích hợp bao gồm miền cuộn xoắn, kể cả các miền cuộn xoắn alpha; miền collagen; miền giống như collagen và các miền globulin miễn dịch dạng dime. Phần dung hợp polypeptit cuộn xoắn thích hợp theo sáng chế bao gồm miền cuộn xoắn của tetranectin, miền cuộn xoắn protein oligome của sụn; miền cuộn xoắn của angiopoietin; và miền khóa leuxin. Nếu miền collagen hoặc miền oligome hóa giống collagen được sử dụng, chúng có thể chứa, ví dụ, các miền được tìm thấy trong collagen, lectin gắn kết manosa, protein bề mặt phổi A và D, adiponectin, ficolin, conglutinin, thụ thể dọn dẹp của đại thực bào và emilin. Trong khi một số miền có thể được kết hợp với nhau như protein dung hợp, trong một số phương án, chúng được gắn kết không tái tổ hợp vào g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc các mảnh gắn kết với amyloid khác, ví dụ, thông qua gắn kết đồng hóa trị.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó hoặc protein dung hợp g3p, liên kết với polyme. Các polyme được sử dụng theo sáng chế là chất mang được dùng để điều chế sản phẩm hoặc chế phẩm dùng để điều trị bệnh.

Các polyme thường gắn kết với g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó được xem xét các tác động đến miền chức năng hoặc kháng nguyên của polypeptit. Nói chung, dẫn xuất về mặt hóa học có thể thực hiện được theo các điều kiện thích hợp được sử dụng để cho protein phản ứng với phân tử polyme hoạt động. Nhóm hoạt động có thể được sử dụng để liên kết với polyme để hoạt hóa các gốc bao gồm sulfua, maleimide, sulfhydryl, thiol, triflate, tresylate, aziridine, oxiran và 5-pyridyl.

Các polyme thích hợp, được chấp nhận về mặt lâm sàng, hòa tan được trong nước bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), polyetylen glycol propionaldehyt, đồng polyme của etylen glycol/propylen glycol, monomethoxy-polyetylen glycol, carboxymethylxenlulza, dextran, rượu polyvinyl (PVA), polyvinyl pyrrolidon, poly-1,3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, đồng polyme của etylen/maleic anhydrit, poly (β -axit amin) (hoặc là các polyme đơn tính hoặc các đồng polyme ngẫu

nhiên), poly(n-vinyl pyrrolidon) polyetylen glycol, polyme đơn tính polypropylen glycol (PPG) và các oxit polyakylen khác, đồng polyme của polypropylene oxit/etylen oxit, các rượu đa chức được polyoxyetylat hóa (polyoxyethylated polyol: POG) (ví dụ, glycerol) và các rượu đa chức được polyoxyetylat hóa, sorbitol được polyoxyetylat hóa hoặc gluco được polyoxyetylat hóa, axit colonic hoặc các polyme được carbohydrat hóa khác, Ficoll hoặc dextran và phức hợp của nó.

Các gốc PEG theo sáng chế có thể là polyme mạch thẳng hoặc phân nhánh. Theo một phương án, sáng chế đề xuất polyme được dẫn xuất về mặt hóa học chứa các gốc đơn (mono-) hoặc đa (poly-) (ví dụ, từ 2 đến 4) gốc PEG. PEG hóa có thể thực hiện được bằng phương pháp phản ứng PEG hóa đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp để điều chế protein được PEG hóa là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các điều kiện phản ứng tùy ý được xác định theo từng trường hợp, tùy theo các thông số và kết quả mong muốn.

Có một số phương pháp gắn PEG đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, EP 0 401 384; Malik et al., *Exp. Hematol.*, (1992) 20:1028-1035; Francis, *Focus on Growth Factors*, 3:4-10 (1992); EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; và các công bố khác được viện dẫn theo sáng chế mà liên quan đến PEG hóa.

Nếu g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc các mảnh gắn kết với amyloid khác (được biết đến như thể đột biến hoặc biến thể của nó và hợp chất, polypeptit và protein dung hợp chứa dạng bất kỳ nêu trên) được PEG hóa, PEG này có thể được gắn kết hoặc là bằng dẫn xuất hóa học g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc các mảnh gắn kết với amyloid khác. Theo phương án khác, gốc axit amin thích hợp để cải biến bằng phân tử PEG có thể được đưa vào bằng cách tái tổ hợp vào g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc các mảnh gắn kết với amyloid khác.

PEG hóa có thể được thực hiện thông qua một phản ứng axylat hóa hoặc các phản ứng alkyl hóa với phân tử polyetylen glycol. Do đó, sản phẩm protein theo sáng chế chứa protein được PEG hóa, trong đó nhóm PEG này được gắn với nhau thông qua nhóm axyl hoặc alkyl. Các sản phẩm như vậy có thể là dạng mono-PEG hóa hoặc poly-PEG hóa (ví dụ, các sản phẩm chứa từ 2 đến 6 hoặc từ 2 đến 5 nhóm PEG). Ví dụ về este PEG được hoạt hóa là PEG được este hóa thành N-hydroxysuccinimit (NHS).

PEG hóa bởi alkyl hóa liên quan đến phản ứng đầu aldehyt của PEG với polypeptit khi có mặt của chất phản ứng. Ví dụ về phản ứng alkyl hóa hoàn nguyên, (các) polyme được chọn lọc cần có một nhóm aldehyt hoạt động đơn lẻ. Ví dụ về aldehyt PEG hoạt động là polyetylen glycol propionaldehyt, ổn định trong nước hoặc mono C1-C10 alkoxy hoặc dẫn xuất aryloxy của nó, ví dụ, xem, US 5,252,714.

Theo một số phương án, g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc mảnh gắn kết với amyloid được biểu hiện như một phần của thực khuẩn thể và g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc mảnh gắn kết với amyloid được tạo ra bằng cách phân lập từ tiểu phân thực khuẩn thể. Nói chung, kỹ thuật tái tổ hợp thường được sử dụng để tạo ra g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p (kể cả thể đột biến và biến thể của nó). Nói chung, protein thu được này được phân lập trước khi tái tổ hợp với chất mang.

Theo một số phương án, phương tiện biểu hiện là thực khuẩn thể. Theo phương án này, gen mã hóa protein g3p, miền N1N2, miền N2 và mảnh gắn kết với amyloid khác (kể cả thể đột biến và của các dạng nêu trên) được kết hợp vào hệ gen của thực khuẩn thể và biểu hiện như một phần của thực khuẩn thể đó. Ví dụ, theo một phương án, protein g3p đột biến có ái lực gắn kết với amyloid cao hơn g3p của thực khuẩn thể M13 được sử dụng để thay thế cho g3p của thực khuẩn thể M13 thể đại. Thực khuẩn thể thu được này cũng được tăng cường khả năng gắn kết với M13 thể đại. Tuy nhiên, g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid bất kỳ được mô tả có thể được kết hợp vào thực khuẩn thể. Theo phương án này, gen 3 thể đại có thể được thay thế hoàn toàn bằng g3p theo sáng chế. Theo cách khác, như được đề cập đối với thực khuẩn thể cùng với việc tăng số lượng bản sao g3p, phân tử tái tổ hợp này có thể được dung hợp với gen mã hóa protein vỏ của thực khuẩn thể (kể cả g3p thể đại) và được biểu hiện trong thực khuẩn thể đó theo cách tương tự như chuỗi kháng nguyên và kháng thể trong thư viện biểu hiện thực khuẩn thể. Thực khuẩn thể hình sợi bất kỳ có thể được cải biến để biểu hiện g3p theo sáng chế, bao gồm, nhưng không giới hạn ở M13, fd, f1, I22, Ike hoặc If1. Theo một số phương án, thực khuẩn thể trợ giúp có thể được sử dụng để tiếp hợp với thực khuẩn thể cải biến này.

Kỹ thuật tái tổ hợp

Nói chung, ADN mã hóa protein g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó (cũng như thể đột biến và biến thể của nó, và hợp chất, polypeptit và protein dung hợp chứa dạng bất kỳ nêu trên) được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, như là nhân

dòng gen g3p, tổng hợp ADN hoặc bằng cách phân lập ADN tương ứng từ thư viện bằng cách sử dụng, ví dụ, trình tự M13 như trình tự dò. (ví dụ, xem: Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. and Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.).

Đối với sản xuất tái tổ hợp, trình tự axit nucleic mã hóa g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó được chèn vào vector biểu hiện thích hợp, mà vector này chứa thành phần phiên mã và dịch mã cần thiết và dịch mã trình tự chèn vào đó hoặc trong trường hợp đó là vector ARN virus, thành phần cần thiết để tái bản và dịch mã. Axit nucleic được chèn vào vector trong khung thích hợp.

Do đó, sáng chế đề cập đến vector chứa polynucleotit mã hóa g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó (kể cả thể đột biến và biến thể của nó). Sáng chế cũng đề xuất vector chứa polynucleotit mã hóa g3p hoặc phân tử dung hợp g3p. Các vector như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vector ADN, vector thực khuẩn thể, vector virus, vector retrovirus, v.v..

Theo một số phương án, vector này được lựa chọn là sự tối ưu biểu hiện polypeptit trong tế bào CHO hoặc tế bào có nguồn gốc từ tế bào CHO. Ví dụ về các vector như vậy được mô tả, ví dụ, Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.* (2004) 20:880-889.

Theo một số phương án, vector được chọn để biểu hiện *in vivo* g3p, mảnh gắn kết với amyloid của nó và/hoặc phân tử dung hợp g3p trong động vật, kể cả người. Theo một số phương án, biểu hiện của polypeptit này trong điều kiện kiểm soát bởi trình tự khởi đầu phiên mã mà có chức năng theo kiểu đặc hiệu mô.

Vector biểu hiện được chuyển hoặc đồng chuyển vào tế bào đích thích hợp, mà tế bào này biểu hiện polypeptit. Ví dụ không hạn chế về phương pháp chuyển nhiễm đã được mô tả, ví dụ, trong Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Axit nucleic mà có thể được chuyển nhiễm tạm thời hoặc ổn định trong tế bào vật chủ mong muốn theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có nhiều hệ vector biểu hiện của vật chủ có thể hữu ích để biểu hiện protein được mô tả theo sáng chế bao gồm tế bào nhân thực và tế bào tiền nhân. Các vật chủ này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vi sinh vật, như vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*) được chuyển gen bởi vector biểu hiện ADN plasmit hoặc ADN vi khuẩn tái tổ hợp

chứa trình tự mã hóa thích hợp; nấm men hoặc nấm sợi được chuyển gen bằng vector biểu hiện của nấm men hoặc nấm sợi chứa trình tự mã hóa thích hợp; hệ tế bào côn trùng được lây nhiễm vector biểu hiện của virus (ví dụ, baculovirus) chứa trình tự mã hóa thích hợp; hệ tế bào thực vật với vector virus tái tổ hợp (ví dụ, virus khảm súp lơ hoặc virus khảm thuốc lá) hoặc được chuyển gen bằng vector biểu hiện plasmid tái tổ hợp (ví dụ, Ti plasmid) chứa trình tự mã hóa thích hợp; hoặc hệ tế bào động vật, kể cả tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào CHO, Cos, HeLa). Protein này có thể cũng được tạo ra bằng cách tái tổ hợp trong bào tằm. Ví dụ, xem: US 8,022,270.

Vector được sử dụng để chuyển gen thường chứa chất đánh dấu chọn lọc được sử dụng để xác định thể chuyển gen. Trong hệ vi khuẩn, chất đánh dấu có thể gồm gen kháng chất kháng sinh, như ampicilin hoặc kanamycin. Chất đánh dấu chọn lọc được sử dụng trong tế bào động vật được nuôi cấy chứa gen ưu tiên kháng thuốc, như neomycin, hygromycin và methotrexat. Chất đánh dấu chọn lọc có thể là chất đánh dấu chọn lọc khuếch đại. Một chất đánh dấu chọn lọc khuếch đại như vậy là gen DHFR. Ví dụ khác về chất đánh dấu chọn lọc khuếch đại là cADN của DHFR (Simonsen and Levinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, (1983) 80:2495). Các chất đánh dấu chọn lọc đã được nêu tổng quan bởi Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA) và việc lựa chọn các chất đánh dấu thích hợp là đã biết đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các thành phần biểu hiện của các hệ biểu hiện là khác nhau về chiều dài và tính đặc hiệu của chúng. Tùy theo hệ vector/vật chủ được sử dụng, số lượng thành phần phiên mã và dịch mã thích hợp, kể cả các trình tự khởi đầu cơ định và trình tự khởi đầu cảm ứng có thể được sử dụng trong vector biểu hiện. Ví dụ, khi nhân dòng trong hệ vi khuẩn, trình tự khởi đầu cảm ứng như pL của thực khuẩn thể λ , plac, ptrp, ptac (trình tự khởi đầu lại ptrp-lac) và các dạng khác có thể được sử dụng; khi nhân dòng trong hệ tế bào côn trùng, trình tự khởi đầu như trình tự khởi đầu polyhedron của baculovirus có thể được sử dụng; khi nhân dòng trong hệ tế bào thực vật, có thể sử dụng trình tự khởi đầu phiên mã có nguồn gốc từ hệ gen tế bào thực vật (ví dụ, trình tự khởi đầu gen sốc nhiệt; trình tự khởi đầu cho các tiểu đơn vị nhỏ của RUBISCO; trình tự khởi đầu cho protein gắn kết chlorophyll a/b) hoặc từ virus thực vật (ví dụ, trình tự khởi đầu 35S ARN của CaMV; trình tự khởi đầu protein vỏ của TMV) có thể được sử dụng; nếu nhân dòng bằng hệ tế bào

động vật có vú, có thể sử dụng trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ hệ gen của động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu metallothionein) hoặc từ virus động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu muộn của adenovirus; trình tự khởi đầu của virus đậu mùa có kích thước 7,5 K); khi dòng tế bào sản sinh chứa nhiều bản sao của sản phẩm biểu hiện, vector trên cơ sở SV40-, BPV- và EBV có thể được sử dụng cùng với chất đánh dấu chọn lọc thích hợp.

Trong trường hợp, nếu vector biểu hiện được sử dụng, việc biểu hiện trình tự mã hóa dạng không vòng hoặc thẳng từ sản phẩm biểu hiện theo sáng chế có thể được điều khiển bởi số lượng của trình tự khởi đầu đó. Ví dụ, trình tự khởi đầu của virus như trình tự khởi đầu ARN 19S và ARN 35S của CaMV (Brisson et al., *Nature* (1984) 310:511-514) hoặc trình tự khởi đầu của protein vỏ của TMV (Takamatsu et al., *EMBO J.* (1987) 6:307-311) có thể được sử dụng; theo cách khác, trình tự khởi đầu của thực vật như là tiểu đơn vị nhỏ của RUBISCO (Coruzzi et al., *EMBO J.* (1984) 3:1671-1680; Broglie et al., *Science* (1984) 224:838-843) hoặc trình tự khởi đầu sốc nhiệt, ví dụ, hsp17.5-E hoặc hsp17.3-B của đậu tương (Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:559-565) có thể được sử dụng. Các cấu trúc có thể đưa vào tế bào thực vật bằng cách sử dụng Ti plasmit, Ri plasmit, vector virus của thực vật, chuyển ADN trực tiếp, vi tiêm, điện chuyển, v.v.. Tổng quan về các kỹ thuật này, ví dụ, xem: Weissbach & Weissbach 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; và Grierson & Corey 1988, *Plant Molecular Biology*, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9.

Theo hệ biểu hiện của vi khuẩn có thể được sử dụng để tạo ra protein theo sáng chế, virus *Autographa californica* nuclear polyhydrosis (*autographa californica* nuclear polyhydrosis virus: AcNPV) được sử dụng như vector biểu hiện của gen ngoại lai. Virus này sinh trưởng trong tế bào *Spodoptera frugiperda*. Trình tự mang mã cơ được nhân dòng vào vùng không thiết yếu (ví dụ, gen polyhedron) của virus và được đặt dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu AcNPV (ví dụ, trình tự khởi đầu polyhedron). Việc chèn thành công trình tự mang mã sẽ gây ra bất hoạt gen polyhedron và sản sinh ra virus tái tổ hợp không hoàn chỉnh (tức là virus thiếu vỏ protein được mã hóa bởi gen polyhedron). Các virus tái tổ hợp này được sử dụng để lây nhiễm vào tế bào *Spodoptera frugiperda* tại đó gen chèn này được biểu hiện. (ví dụ, xem: Smith et al., *J. Virol.* (1983) 46:584; US 4,215,051). Các ví dụ khác về hệ biểu hiện này có thể tìm thấy được trong ấn phẩm:

Ausubel et al., eds. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Trong tế bào vật chủ là động vật có vú, có nhiều hệ biểu hiện trên cơ sở virus có thể được sử dụng. Trong trường hợp mà adenovirus được sử dụng như vector biểu hiện, trình tự mang mã có thể được gắn vào phức hợp điều khiển phiên mã/dịch mã của adenovirus đó, ví dụ, trình tự dẫn đầu ba phần và trình tự khởi đầu muộn. Gen dung hợp này có thể được chèn vào hệ gen của adenovirus bằng cách tái tổ hợp *in vitro* hoặc *in vivo*. Chèn đoạn vào vùng không thiết yếu của hệ gen virus (ví dụ, vùng E1 hoặc E3) kết quả thu được là virus tái tổ hợp đó có thể sống và biểu hiện peptit trong vật chủ (ví dụ, xem: Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:3655). Ngoài ra, trình tự khởi đầu của virus bệnh đậu mùa có kích thước 7,5 K có thể được sử dụng (ví dụ, xem: Mackett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:7415; Mackett et al., *J. Virol.* (1984) 49:857; Panicali et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:4927). Các hệ biểu hiện khác của virus bao gồm virus liên quan đến adenovirus và lentivirus.

Tế bào vật chủ chứa cấu trúc ADN được sinh trưởng trong môi trường sinh trưởng thích hợp. Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ “môi trường sinh trưởng thích hợp” có nghĩa là môi trường chứa chất dinh dưỡng cần thiết đối với sự phát triển của tế bào đó. Protein được tạo ra bằng phương thức tái tổ hợp theo sáng chế có thể tinh chế từ môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng các kỹ thuật thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phân tích *in vitro*

Theo một số phương án, sự phân ly của amyloid có thể được kiểm soát bằng cách sử dụng phương pháp phân tích huỳnh quang Thioflavin T (ThT).

Theo một số phương án, sự phân ly được thử nghiệm bằng cách kiểm soát sự hòa tan đào thải với sự có mặt hoặc không có mặt của chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, dạng kết tụ α có thể được xử lý bằng chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm phân ly α -synuclein kết tụ sẽ gây ra sợi α -synuclein để hòa tan nhanh hơn chất đào thải như là SDS, khi so với dạng sợi không được xử lý. Sự thay đổi của amyloid dạng sợi này thành dạng hòa tan có thể được kiểm soát bằng cách kết hợp với phần được đánh dấu (ví dụ, bằng Cy5) monome α -synuclein trong quá trình phân ly.

Theo một số phương án, việc ngăn ngừa sự hình thành các oligo amyloid gây độc được kiểm tra bằng phương pháp phân tích độc tính tế bào nuôi cấy trung tính. Trong phương pháp này, tế bào N2a neuroblastoma hoặc dạng tương ứng được ủ cùng với oligome A β 42. Oligome này gắn kết với màng và gây ra yếu màng khiến thất thoát enzym nội bào trong tế bào. Việc ủ kéo dài với oligome với nồng độ cao sẽ gây chết tế bào. Khi các oligome này được tiền xử lý bằng thực khuẩn thể hoặc g3p trước khi ủ cùng với tế bào thì tính gây độc của các oligome này là thấp nhất, đôi khi không gây độc. Hiệu quả trung hòa này có thể được định lượng bằng cách xác định sự giải phóng kinaza được adenyl hóa, một ví dụ về enzym gây độc tế bào được giải phóng bởi tế bào trung tính sau khi màng bị mất ổn định.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế ức chế sự chuyển ngược protein prion hòa tan thành dạng kháng proteaza K trong phương pháp phân tích khuếch đại chu kỳ gấp nếp sai protein (protein misfolding cyclic amplification: PMCA). Wang et al., Science, (2010) 327:1132-35. Trong phương pháp này, PrP tái tổ hợp được trộn với POPG và ARN trong điều kiện hoặc là có mặt hoặc là không có mặt chế phẩm theo sáng chế. Vật liệu này tiếp đó được đưa vào nhiều chu kỳ (ví dụ, 48) trong đó bước siêu âm 30 giây, tiếp đó bước ủ trong 29,5 phút. Phân đoạn phản ứng này được sử dụng để cấy vào cơ chất khác và lặp lại chu kỳ xử lý. Mỗi chu kỳ được kiểm tra sự có mặt của vật liệu kháng proteaza K, vật liệu này chỉ ra dạng lây nhiễm của PrP. Sự suy giảm vật liệu kháng proteaza K khi có mặt chế phẩm theo sáng chế cho thấy rằng chế phẩm theo sáng chế ức chế sự hình thành dạng kháng PK.

Như nêu trên, amyloid của protein prion cụ thể, như là protein NM prion của nấm men có thể được xác định theo phương pháp phân tích bẫy lọc. Vì vậy, tùy vào protein có trước, theo một số phương án, khả năng này phân ly sự kết tụ của protein prion theo sáng chế có thể được kiểm tra bằng phương pháp phân tích bẫy lọc.

Phương pháp phân tích chức năng *in vivo*

Ngoài hoạt tính như tăng cường chức năng gắn kết ái lực hoặc giảm T_M, có thể được chứng minh trong phương pháp phân tích *in vitro*, chế phẩm theo sáng chế cũng có thể làm giảm amyloid theo một hoặc một số phương pháp phân tích *in vivo*. Một phương pháp để xác định sự suy giảm của amyloid *in vivo* là sử dụng phương pháp chụp X quang phát xạ pozitron (PET) với chất hiện hình là florbetapir (F18-AV-45, Eli Lilly) trước và

sau khi xử lý để so sánh lượng hoặc sự phân bố amyloid β . Tất nhiên, một số chất chỉ thị sinh học bổ sung để nhận dạng, các chất này có thể được sử dụng để xác định sự suy giảm về lượng của amyloid.

Một phương pháp nhằm xác định xem liệu chế phẩm làm giảm lượng của amyloid *in vivo* hay không là sử dụng mẫu chuột hAPP. Rockenstein, J Neurosci Res. (2001) 66(4):573-82. Các con chuột này được nuôi trong điều kiện có mức của amyloid β cao khi còn non (3-4 tháng). Khả năng làm giảm lượng của amyloid này được xác định bằng cách tiêm cho chuột chế phẩm theo sáng chế, tiếp đó so sánh mức của amyloid trong các con chuột đó với mẫu đối chứng không được tiêm. Cũng có thể chỉ tiêm chế phẩm theo sáng chế vào một bán cầu não của chuột hAPP này, sau đó so sánh mức của amyloid giữa bán cầu được tiêm và bán cầu không được tiêm trong cùng mẫu chuột.

Trong một ví dụ khác, chế phẩm theo sáng chế được thử nghiệm trên mẫu chuột chuyển gen bị mắc bệnh Alzheimer (TgAD) được mô tả trong US2011/0142803, Hsiao et al., Science (1996) 274:99-102 hoặc Duyckaerts et al., Acta Neuropathol (2008) 115:5-38. Tóm lại, chuột thể đại, cũng như chuột chuyển gen, đều được dùng để thử nghiệm. Để đánh giá khả năng của chế phẩm theo sáng chế hoạt động như chất gây phân ly, chế phẩm theo sáng chế được tiêm vào trong sọ chuột chuyển gen (Taconic, APPSWE(2576), 10 tháng tuổi). Ví dụ, với chế phẩm chứa thực khuẩn thể, tiêm dung dịch 2,5 μ L thực khuẩn thể dạng sợi (10^{14} thực khuẩn thể/mL) trong 10 phút (đỉnh thóp -2,8 mm, cạnh bên 2,5 mm, mặt trước 2,5 mm) vào một bên bán cầu não, trong khi bên đối diện, tiêm muối đệm phosphat (phosphate-buffered-saline: PBS) theo cách tương tự để làm đối chứng. Chuột sau khi điều trị bị giết tại các thời điểm khác nhau và não được cố định qua đêm trong 4% paraformaldehyt và cắt bằng thiết bị vi phẫu. Tiến hành nhuộm Thioflavin-S (ThS) để đánh giá lượng của amyloid. Các phần được nhuộm bằng hematoxylin của hãng Mayer để dập tắt huỳnh quang tự phát từ hạt nhân, tiếp đó rửa lại bằng dung dịch ThS (1%) trong 3 phút. Biệt hóa hoàn thành bằng cách sử dụng axit axetic 1% trong 20 min và tiếp đó rửa các lát này và làm khô và được cố định bằng môi trường cố định chống mất màu. Lượng của amyloid được tính theo chương trình LEICA Qwin. Nói cách khác, lượng của amyloid có thể đánh giá được theo lượng kháng thể kháng amyloid.

Sự phân bố sinh học hoạt tính phóng xạ (ví dụ, I^{125}) hoặc chế phẩm đánh dấu phát quang hoặc chế phẩm không được đánh dấu, kể cả thực khuẩn thể dạng sợi, cũng có thể

xác định được để thấy rằng chế phẩm gắn kết với amyloid *in vivo*. Ví dụ, nếu chế phẩm đó chứa thực khuẩn thể thì thực khuẩn thể dạng sợi này có thể được đánh dấu phóng xạ hoặc đánh dấu huỳnh quang. Chuột BALB/c này được phân ra thành hai nhóm. Tiếp đó, mỗi con chuột này được tiếp nhận vào trong mũi 100 μ L thực khuẩn thể ($1,25 \times 10^{12}$ thực khuẩn thể) trong 1 giờ. Nhóm chuột thứ nhất bị giết sau 1 giờ và ngâm tim bằng 4% paraformaldehyt. Nhóm thứ hai bị giết sau 3 giờ điều trị và nhóm cuối bị giết sau 24 giờ điều trị. Sau khi ngâm, não cũng như các cơ quan ngoại biên được loại bỏ và chất đánh dấu được xác định. Theo cách khác, chế phẩm hoặc thực khuẩn thể không được đánh dấu có thể đánh giá được sự gắn kết bằng cách sử dụng các phương pháp tương tự như phần não được đồng nhuộm màu bằng thuốc nhuộm có thể nhận biết được amyloid và vết nhuộm có thể nhận biết được chế phẩm hoặc thực khuẩn thể.

Việc sử dụng thực khuẩn thể dạng sợi theo đường mũi cũng được dùng để đánh giá chế phẩm chứa thực khuẩn thể, thực khuẩn thể chứa g3p đột biến hoặc mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thực khuẩn thể làm tăng lượng g3p liên quan của thực khuẩn thể thể đại, như được đề cập theo sáng chế. Ví dụ, thực khuẩn thể được sử dụng theo đường mũi cho chuột chuyển gen SWE/APP2576 (Taconic, 10 tháng tuổi), mẫu chuột bị mắc bệnh Alzheimer. 20 μ L dung dịch thực khuẩn thể (5×10^{12} /mL) được dùng cách nhau 2 tuần, trong khoảng thời gian từ 4 đến 12 tháng và đánh giá chức năng liên quan. Sau khi điều trị, một thử nghiệm đánh giá đối tượng được thực hiện để nghiên cứu tác động của việc điều trị của thực khuẩn thể này đến khả năng tăng cường trí nhớ. Trong ngày đầu tiên, chuột được cho tiếp xúc với 20 đối tượng mới trong 20 phút. Ngày tiếp theo, thay thế một đối tượng và một đối tượng được thay thế và kiểm tra sự tò mò khám phá đối tượng mới của chuột. Chỉ số nhận biết được tính cho mỗi con chuột bằng cách chia thời gian mà chúng dành để khám phá gần đối tượng mới trên tổng thời gian chuột dành để khám phá gần cả hai đối tượng. Do đó, giá trị trên 0,5 chỉ ra khả năng nhận biết đối tượng cũ và dành thời gian nhiều hơn để khám phá đối tượng mới.

Các mẫu chuyển gen khác mắc bệnh do gấp nếp sai protein cũng có thể được sử dụng để chứng minh chế phẩm theo sáng chế có khả năng làm giảm amyloid. Các ví dụ không giới hạn bao gồm chuột α -synuclein “dòng D” (mẫu chuột bị mắc bệnh Parkinson, Masliah et al., Science (2000) 287:1265-1269); chuột Tg2576 (mẫu chuột mắc bệnh Alzheimer, Hsiao et al., Science (1996) 274:99-102 và Duyckaerts et al., Acta

Neuropathol (2008) 115:5-38 at 9); các mẫu chuột Jax® Mice khác nhau để nghiên cứu bệnh Parkinson (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME); và mẫu chuột cũng như mẫu chuột cống được bán bởi JSW Lifescience, kể cả mẫu cho bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, bệnh Huntington.

Thực khuẩn thể mà g3p đã được tái bắt hoạt được cho là bị tái bắt hoạt trong các phương pháp này, trái lại thực khuẩn thể thể đại cùng nằm trong khu vực với amyloid, làm giảm lượng của amyloid, ngăn ngừa sự hình thành, và/hoặc loại bỏ các oligo gây độc và kết quả là cải thiện chức năng nhận thức. Do đó, thực khuẩn thể chứa g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó, như được đề cập theo sáng chế, có thể được thử nghiệm hoạt tính *in vivo* so với đối chứng âm và đối chứng dương.

Dược phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm dược dụng chứa các hợp chất theo sáng chế (tức là, (a) g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó; (b) các hợp chất, polypeptit và protetin dung hợp chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó; (c) thực khuẩn thể dạng sợi có mang và tăng số lượng bản sao của g3p so với thực khuẩn thể thể đại; (d) tá dược lỏng biểu hiện gắn kết với amyloid mang g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p, thể đột biến hoặc biến thể của nó hoặc hợp chất, polypeptit và protetin dung hợp chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó; hoặc (e) thực khuẩn thể dạng sợi được cải biến mang biến thể của g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p (không như phần của protein g3p được biểu hiện), thể đột biến hoặc biến thể của các mảnh gắn kết với amyloid hoặc protetin dung hợp hoặc các polypeptit khác loại chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó).

“Dược phẩm” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ lượng có hiệu quả điều trị của chế phẩm được mô tả theo sáng chế với chất mang và/hoặc tá dược thích hợp sinh lý học. Dược phẩm không gây kích thích đáng kể sinh vật được sử dụng. Thuật ngữ “chất mang sinh lý dụng” và “chất mang dược dụng” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích thích đối với sinh vật và không làm mất hoạt tính và đặc tính sinh học của chế phẩm được sử dụng.

Thuật ngữ “tá dược” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ cơ chất trợ được bổ sung cho dược phẩm nhằm dễ dàng sử dụng thành phần hoạt tính. Ví dụ, không nhằm hạn

chế phẩm vi của sáng chế, bao gồm, ví dụ, nước muối sinh lý, canxi cacbonat, canxi phosphat, các loại đường và các loại tinh bột khác nhau, các dẫn xuất xenluloza, gelatin, dầu thực vật, polyetylen glycol và chất hoạt động bề mặt, kể cả, ví dụ, polysorbat 20.

Dược phẩm được sử dụng theo sáng chế có thể được phối trộn theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang được chấp nhận về mặt sinh lý bao gồm tá dược và chất bổ trợ, mà các tá dược này dễ dàng phối hợp cùng thành phần hoạt tính để điều chế thành chế phẩm mà có thể được sử dụng làm dược phẩm. Chế phẩm thích hợp dùng theo đường sử dụng khác nhau được lựa chọn theo bản chất của chế phẩm được phân phối (ví dụ, protein và thực khuẩn thể).

Các đường thích hợp để sử dụng dược phẩm theo sáng chế có thể là, ví dụ, bao gồm, phân phối qua màng nhầy, theo đường mũi; ngoài đường ruột, bao gồm, tiêm bắp, tiêm dưới da, trong tủy xương, nội tủy mạc, trong tâm thất, tiêm tĩnh mạch, trong bụng, trong mũi hoặc trong mắt; theo đường miệng; hoặc phân phối theo đường trực tràng.

Theo một số phương án, dược phẩm được sử dụng theo cách cục bộ hơn là toàn thân, ví dụ, thông qua tiêm dược phẩm trực tiếp vào trong não của đối tượng bị bệnh. Theo một số phương án, kỹ thuật tiêm này là kỹ thuật tiêm bất kỳ mà tránh được hàng rào máu não, ví dụ, bằng cách tiêm trực tiếp vào trong tủy xương, nội tủy mạc hoặc tiêm vào trong tâm thất.

Để dùng theo đường tiêm, thành phần hoạt tính theo sáng chế có thể được phối chế thành dung dịch chứa nước, tốt hơn là ở dạng dung dịch đệm sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer hoặc dung dịch muối đệm. Để sử dụng qua đường màng nhầy, thích hợp để thấm qua hàng rào bảo vệ được sử dụng trong chế phẩm. Các kỹ thuật thấm thấu này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng qua đường mũi. Việc phân phối qua đường mũi đã được thông báo, cho phép phân phối trực tiếp virus và đại phân tử vào dịch não tủy (cerebrospinal fluid: CSF) hoặc CNS. Mathison et al, 1998; Chou et al, 1997; Draghia et al, 1995.

Để sử dụng qua đường mũi, chế phẩm thuận lợi để phân phối ở dạng phun sol khí từ bình áp lực hoặc ống phun thích hợp để xịt, ví dụ, diclorodifluoromethan, trichlorofluoromethan, dicloro-tetrafluoroethan hoặc dioxit cacbon. Trong trường hợp bình

xịt áp suất, đơn vị liều dùng có thể được xác định bằng cách gắn van để phân phối một lượng xác định. Viên nang và viên đạn, ví dụ, gelatin để sử dụng trong bào chế thuốc bằng cách phối trộn phức hợp theo sáng chế và bột thích hợp như lactoza hoặc tinh bột.

Các protein khác nhau được mô tả theo sáng chế đóng vai trò như một thành phần của dược phẩm cũng có thể được phân phối vào não bằng cách sử dụng tế bào thần kinh thụ cảm khứu giác như điểm phân phối. Ví dụ, vector adenovirut chứa gen mã hóa protein bất kỳ nêu trên có thể được phân phối thông qua tế bào thần kinh thụ cảm khứu giác. Draghia et al, 1995.

Chế phẩm được mô tả theo sáng chế có thể được bào chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, bằng cách tiêm hoặc tiêm truyền. Dược phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa chứa chế phẩm dung dịch nước ở dạng chế phẩm tan trong nước. Ngoài ra, huyền phù hóa thành phần hoạt tính có thể điều chế như dạng huyền phù để tiêm trên cơ sở nước hoặc dầu. Các dung môi hoặc tá dược ưa béo thích hợp bao gồm dầu như dầu vừng hoặc axit este béo tổng hợp như ethyl oleat, triglycerit hoặc các liposom. Huyền phù tiêm chứa nước có thể chứa cơ chất, mà các cơ chất này làm tăng độ nhớt của huyền phù đó, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol hoặc dextran. Tùy ý, huyền phù này cũng có thể chứa chất ổn định hoặc các hợp chất thích hợp (ví dụ, chất hoạt động bề mặt như polysorbat (Tween 20)) mà chất này làm tăng tính tan của thành phần hoạt tính cho phép tạo ra được dung dịch có nồng độ cao. Một protein trên cơ sở hợp chất như vậy, ví dụ, albumin có thể được sử dụng để ngăn ngừa sự dính bám của M13 lên bề mặt phân phối (tức là, túi IV, ống thông, kim tiêm, v.v.).

Để sử dụng theo đường miệng, chế phẩm này có thể được bào chế bằng cách gắn kết thành phần hoạt tính với chất mang dược dụng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chế phẩm nay có thể có mặt trong dạng liều dùng đơn vị, ví dụ, trong lọ, ống tiêm hoặc trong vật chứa nhiều liều dùng, tùy chọn, cùng với chất bảo quản bổ sung. Chế phẩm theo sáng chế có thể là dạng huyền phù, dạng hòa tan hoặc nhũ tương trong tá dược chứa dầu hoặc nước và có thể chứa chất phối trộn như chất tạo nhũ, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Dạng liều dùng đơn có thể là dạng rắn hoặc dạng lỏng. Dạng liều dùng đơn này có thể được sử dụng trực tiếp cho đối tượng bị bệnh mà không cần thay đổi hoặc pha loãng hoặc tái phối trộn trước khi sử dụng. Theo một phương án cụ thể, dạng liều dùng đơn có thể được sử dụng ở dạng tiêm nhanh, ví dụ, tiêm một lần, liều dùng đơn dùng qua

đường miệng, bao gồm liều dùng qua đường miệng chứa dạng viên, viên nang, viên nén, v.v.. Theo các phương án khác, dạng liều dùng đơn có thể được sử dụng trong thời hạn nhất định, như là bằng cách truyền hoặc thông qua bơm cấy ghép trên cơ thể, như bơm ICV. Trong phương án sau, dạng liều dùng đơn này có thể là túi truyền dịch hoặc túi truyền dịch kèm bơm được đổ đầy một lượng chỉ định thực khuẩn thể dạng sợi. Theo cách khác, túi truyền dịch túi truyền dịch kèm bơm này được sử dụng cho đối tượng bị bệnh ngay sau khi phối trộn dung dịch liều dùng đơn của thực khuẩn thể dạng sợi với túi truyền dịch kèm bơm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế dược phẩm theo sáng chế. Các kỹ thuật để bào chế thuốc có thể được tìm thấy, ví dụ, trong: “Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, Pa., bản sửa đổi mới nhất, được kết hợp vào đây để tham khảo toàn bộ nội dung.

Dược phẩm thích hợp để sử dụng theo sáng chế chứa chế phẩm, trong đó thành phần hoạt tính chứa một lượng hiệu quả để đạt được mục đích mong đợi.

Việc xác định lượng có hiệu quả về mặt chẩn đoán hoặc điều trị là đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, cụ thể là khi tham khảo những thông tin được bộc lộ theo sáng chế.

Liều lượng và khoảng thời gian sử dụng có thể được điều chỉnh tùy theo mức tá dược biểu hiện thực khuẩn thể có trong não mà đủ để điều trị hoặc chẩn đoán, bệnh rối loạn hoặc bệnh lý cụ thể (nồng độ tối thiểu có hiệu quả: MEC). MEC khác nhau đối với từng loại chế phẩm, nhưng có thể đánh giá được theo dữ liệu *in vitro*. Liều dùng cần thiết để có được MEC phụ thuộc vào các đặc tính riêng.

Khoảng thời gian dùng cũng có thể được xác định theo giá trị MEC. Các chế phẩm cần được dùng theo phác đồ, mà nó duy trì được mức trên MEC từ 10 đến 90% theo thời gian, tốt hơn là 30-90% và tốt hơn nữa là 50-90%.

Tùy theo mức độ và sự đáp ứng đối với bệnh lý được điều trị mà việc sử dụng theo liều dùng có thể là sử dụng một lần hoặc sử dụng nhiều lần, với đợt điều trị kéo dài từ một vài ngày đến một vài tuần cho đến khi việc điều trị có hiệu quả hoặc tình trạng bệnh lý được thuyên giảm.

Lượng của chế phẩm được sử dụng, tất nhiên, sẽ phụ thuộc vào đối tượng được chẩn đoán hoặc điều trị, mức độ nặng của bệnh, sự tuân thủ theo y lệnh của dược sỹ, v.v..

Chế phẩm theo sáng chế, nếu muốn, có thể chứa trong túi hoặc thiết bị phân tán, như kit được FDA chấp thuận, mà kit này có thể chứa một hoặc nhiều dạng đơn vị liều dùng chứa thành phần hoạt tính. Túi này có thể là, ví dụ, chứa chất nền là kim loại hoặc nhựa như được ép lên tấm bìa cứng. Gói hoặc thiết bị pha chế có thể đi kèm với hướng dẫn sử dụng. Bao gói hoặc thiết bị pha chế cũng có thể đi cùng với chỉ dẫn liên quan đến vật chứa theo quy định của cơ quan quản lý đối với việc sản xuất, sử dụng, hoặc buôn bán dược phẩm, mà đã được quy định bởi cơ quan quản lý này đối với thuốc dùng cho người hoặc động vật. Các thông báo này, ví dụ, có thể là việc gắn nhãn được chấp thuận của Cơ quan quản lý dược phẩm Hoa Kỳ cho thuốc kê đơn hoặc các sản phẩm được chấp thuận chứa bên trong. Chế phẩm chứa chế phẩm theo sáng chế mà được bào chế thích hợp với chất mang dược dụng cũng có thể được bào chế, gói trong vật mang thích hợp và gắn nhãn để điều trị các bệnh lý chỉ định, như đã được mô tả chi tiết bên trên.

Cần hiểu rằng phần mô tả ở trên đây hoặc dưới đây được lấy làm ví dụ và chỉ nhằm giải thích chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi của sáng chế, như được yêu cầu bảo hộ.

Sử dụng trong điều trị bệnh

Như đã nêu, thực khuẩn thể dạng sợi M13 và thực khuẩn thể dạng sợi liên quan, cho thấy khả năng ứng dụng trên động vật bị mắc bệnh do gấp nếp protein sai. Xem, US 2011/0142803, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung. Cụ thể, đã phát hiện ra rằng thực khuẩn thể dạng sợi này có khả năng phân ly amyloid hình thành trong não. Việc loại bỏ amyloid được mong đợi là để làm giảm, làm chậm tiến triển của hoặc thậm chí làm đảo ngược các triệu chứng bệnh lý khác nhau có cùng điểm khác biệt là kết tụ và/hoặc cuộn xoắn protein sai trong não. Ví dụ, xem: WO2006083795 và WO2010060073, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Hơn thế nữa, M13 đã cho thấy khả năng phân ly ít nhất bốn dạng sợi của các amyloid khác nhau: dạng sợi 1-42 của amyloid β (fA β 42), dạng sợi α -synuclein (f α syn), dạng sợi NM của prion nấm men (fNM) và dạng sợi tau (ftau).

Theo đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm bất kỳ theo sáng chế, như chế phẩm chứa g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc các mảnh gắn kết với amyloid khác (kể cả thể đột biến hoặc biến thể của các dạng nêu trên) hoặc protein dung hợp g3p, tá được biểu hiện hoặc thực khuẩn thể chứa dạng bất kỳ nêu trên, để điều trị bệnh do gấp nếp protein sai, nhưng không giới hạn ở, bệnh bất kỳ liên quan đến fA β 42, fasyn, fNM hoặc ftau.

Trong ngữ cảnh điều trị bệnh, các thuật ngữ “đối tượng bị bệnh”, “đối tượng” và “người nhận” được sử dụng thay thế cho nhau bao gồm người cũng như các loài động vật khác. Theo một số phương án, đối tượng bị bệnh là người dương tính với chất chỉ thị sinh học liên quan đến bệnh do gấp nếp protein sai. Theo một phương án, đối tượng bị bệnh này có biểu hiện sự tích tụ amyloid β như được phát hiện bởi chất hiện hình florbetapir.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng với nghĩa làm giảm, làm chậm hoặc đảo ngược sự tiến triển của bệnh ở đối tượng bị bệnh có biểu hiện một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng của bệnh. “Điều trị” cũng có nghĩa là làm giảm, làm chậm hoặc đảo ngược các triệu chứng của bệnh ở đối tượng bị bệnh có biểu hiện một hoặc nhiều triệu chứng lâm sàng. Theo một phương án, đối tượng bị bệnh có biểu hiện sự tích tụ amyloid β được phát hiện bởi chất hiện hình PET bằng florbetapir và lượng tích lũy amyloid β được giảm đi do điều trị. Theo một phương án, đối tượng bị bệnh có biểu hiện sự tích tụ amyloid β như được phát hiện bởi chế phẩm g3p theo sáng chế và lượng tích tụ amyloid β được giảm đi hoặc giữ nguyên do điều trị. Theo một phương án khác, đối tượng bị bệnh có biểu hiện sự tích tụ amyloid typ bất kỳ được phát hiện bởi chất hiện hình PET và chức năng liên quan đến nhận thức của đối tượng bị bệnh được cải thiện bởi sự điều trị đó. Việc cải thiện về chức năng nhận thức có thể đánh giá được bằng các phương pháp và thử nghiệm nêu trong McKhann et al., *Alzheimer's & Dementia* (2011) May;7(3):263-9.

“Việc ngăn ngừa bệnh” khác với việc điều trị, chỉ việc sử dụng chế phẩm cho cá thể trước khi xuất hiện triệu chứng mắc bệnh bất kỳ. Việc ngăn ngừa bệnh cũng bao hàm cả việc sử dụng chế phẩm g3p và/hoặc ToLA bất kỳ theo sáng chế. Việc ngăn ngừa bệnh cũng có thể liên quan đến cá thể, người mà đã biết là bị tăng nguy cơ mắc bệnh hoặc người đã bị phát bệnh, độc lập với nhau trên cơ sở một hoặc nhiều chất chỉ thị di truyền. Có nhiều chất chỉ thị di truyền đã được nhận biết đối với các bệnh do gấp nếp protein sai khác nhau. Ví dụ, cá thể bị một hoặc nhiều đột biến của người Thụy Điển, người Ấn Độ

hoặc người Luân Đôn trong protein tiền chất amyloid của người (human amyloid precursor protein: hAPP) làm tăng nguy cơ mắc phát triển bệnh Alzheimer khởi phát sớm cũng là ứng viên để ngăn ngừa bệnh. Tương tự, cá thể có bộ ba nucleotit CAG lặp lại trong gen huntingtin, cụ thể là người có 36 hoặc nhiều hơn bộ ba nucleotit lặp lại, mà cuối cùng sẽ phát triển bệnh Huntington cũng là đối tượng để phòng bệnh.

Theo một số phương án, protein hoặc mảnh của nó được sử dụng trực tiếp làm thuốc chữa bệnh. Theo phương án này, g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc các mảnh gắn kết với amyloid khác (kể cả thể đột biến hoặc biến thể của dạng bất kỳ nêu trên) được phối trộn trực tiếp vào dược phẩm hoặc chế phẩm. Theo phương án khác, g3p, miền N1N2, miền N2 hoặc các mảnh gắn kết với amyloid khác (kể cả thể đột biến hoặc biến thể của dạng bất kỳ nêu trên) là một phần của protetin dung hợp hoặc tá được biểu hiện như thực khuẩn thể và theo phương án này, đó là protein dung hợp hoặc tá được biểu hiện mà được kết hợp vào dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế. Theo phương án khác, chế phẩm này chứa thực khuẩn thể có g3p hoặc mảnh gắn kết với amyloid của nó mà có hiệu quả hơn g3p của thực khuẩn thể M13 thể đại trong việc làm giảm hoặc giữ nguyên được mức của amyloid có trong não. Theo một số phương án, thực khuẩn thể này có hiệu quả cao hơn trong việc làm giảm hoặc duy trì mức của amyloid so với hiệu quả của M13 có biểu hiện nhiều hơn 5 bản sao của g3p.

Thuật ngữ “gấp nếp protein sai” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bệnh đặc trưng ở chỗ hình thành protein amyloid bởi protein kết tụ (peptit hình thành amyloid), như là, nhưng không giới hạn ở, amyloid β , amyloid A huyết thanh, xystatin C, IgG kappa chuỗi nhẹ hoặc protein prion. Các bệnh đã biết liên quan đến kết tụ protein và/hoặc gấp nếp sai bao gồm bệnh Alzheimer, bao gồm bệnh Alzheimer khởi phát sớm, bệnh Alzheimer khởi phát muộn, và bệnh Alzheimer tiền phát, bệnh Parkinson, thoái hóa amyloid SAA, cystatin C, triệu chứng Aixolen di truyền, lão suy, bệnh đa u tủy xương, bệnh do prion bao gồm nhưng không giới hạn ở kuru, bệnh Creutzfeldt-Jakob (CJD), bệnh Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), chứng mất ngủ di truyền gây chết (FFI), bệnh cừu điên và viêm não bò dạng xóp (BSE); bệnh xơ cứng teo cơ một bên (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) (ALS), bệnh thoái hóa tiểu não (spinocerebellar ataxia: SCA) (SCA1), (SCA3), (SCA6), (SCA7), bệnh Huntington, bệnh DRPLA (dentatorubral-pallidoluysian atrophy: DRPLA), bệnh teo cơ hành tủy, bệnh mạch máu não amyloid di

truyền, thoái hóa amyloid, mất trí do tổn thương thùy trán-thái dương, mất trí Anh/Đan Mạch và bệnh não di truyền. Chế phẩm chứa g3p theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh do “gấp nếp protein sai”.

Có nhiều bệnh do gấp nếp sai và/hoặc kết tụ protein amyloid xuất hiện trong hệ thần kinh trung ương (central nervous system: CNS). Một số ví dụ về các bệnh xuất hiện trong CNS là bệnh Parkinson; bệnh Alzheimer; bệnh mất trí do tổn thương thùy trán-thái dương (FTD) kể cả những đối tượng bị bệnh có các hội chứng lâm sàng sau: thay đổi hành vi FTD (behavioral variant FTD: bvFTD), chứng mất ngôn ngữ do diễn đạt không trôi chảy (progressive non-fluent aphasia: PNFA) và chứng mất ngôn ngữ (semantic dementia: SD); bệnh suy thoái thùy trán-thái dương (frontotemporal lobar degeneration: FTLTD); và bệnh Huntington. Chế phẩm g3p theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh đặc trưng bởi protein amyloid kết tụ và/hoặc gấp nếp sai mà xuất hiện trong hệ thần kinh trung ương (central nervous system: CNS).

Việc gấp nếp sai và/hoặc kết tụ protein cũng có thể xuất hiện bên ngoài CNS. Thoái hóa amyloid A (AA) (mà protein tiền chất là apolipoprotein huyết thanh pha cấp tính (serum acute phase apolipoprotein: SAA) và bệnh đa u tủy xương (chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ globulin miễn dịch tiền chất protein) là hai bệnh đã biết rõ liên quan đến việc protein kết tụ và/hoặc gấp nếp sai mà chúng xuất hiện trong hệ thần kinh trung ương (CNS). Các ví dụ khác về bệnh này liên quan đến amyloid gây ra bởi β_2 -microglobulin, transthyretin (bệnh viêm đa dây thần kinh amyloid di truyền [FAP], Familial Amyloidotic Cardiomyopathy [FAC] và thoái hóa amyloid hệ thống lão hóa (Senile Systemic Amyloidosis: SSA), (apo)serum AA, các apolipoprotein AI, AII và AIV, gelsolin (dạng cuối cùng của bệnh viêm đa dây thần kinh amyloid di truyền), lysozym, fibrinogen, cystatin C (bệnh mạch máu não amyloid, xuất huyết não di truyền cùng với thoái hóa amyloid, typ người Aixolen), (pro)calcitonin, polypeptit amyloid hạt (IAPP thoái hóa amyloid), yếu tố natriuretic của tâm nhĩ, prolactin, insulin, lactadherin, kerato-epithelin, lactoferin, protein liên quan đến việc phát sinh tế bào răng (odontogenic ameloblast-associated protein) và semenogelin I. Chế phẩm g3p theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị bệnh liên quan đến gấp nếp sai và/hoặc kết tụ protein mà xuất hiện bên ngoài hệ thần kinh trung ương CNS.

Bệnh thoái hóa thần kinh có thể liên quan đến thương tổn tau. (Reviewed in Lee et al. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1121-159). Protein tau là một protein liên quan đến vi ống được biểu hiện trong sợi trục thần kinh của cả hệ thần kinh trung ương lẫn hệ thần kinh ngoại biên. Bệnh này còn bao hàm cả bệnh do protein Tau gây thoái hóa thần kinh (đôi khi còn được đề cập đến như là bệnh lý protein tau). Ví dụ về bệnh lý protein tau bao gồm bệnh Alzheimer, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên (amyotrophic lateral sclerosis: ALS)/mất trí Parkinson, chứng mất trí Argyrophilic dạng hạt, thoái hóa Corticobasal, bệnh Creutzfeldt-Jakob, mất trí do chấn thương, lan truyền mớ rối sợi thần kinh và vôi hóa, hội chứng Down, sa sút trí tuệ trán-thái dương kể cả bệnh mất trí do tổn thương trán-thái dương kể cả bệnh bất trí do tổn thương trán-thái dương do bệnh Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, loạn dưỡng trương cơ, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh tế bào thần kinh vận động không phải người đảo Guam do có mớ rối sợi thần kinh, bệnh Pick, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh mạch máu não amyloid do protein prion, chứng tăng thần kinh đệm tiến triển dưới vỏ não, chứng tê liệt trên nhân tiến triển, viêm não xơ hóa bán cấp tiến triển và mất trí do rối loạn. Một số bệnh này cũng bao hàm cả sự tích lũy của peptit amyloid β hình sợi. Ví dụ, bệnh Alzheimer biểu hiện cả mức tích tụ amyloid β và tổn thương tau. Tương tự, các bệnh do prion như bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh mạch máu não amyloid do protein prion và hội chứng Gerstmann-Sträussler-Scheinker cũng có thể có tổn thương tau. Do đó, khi một bệnh được nêu là “bệnh lý protein tau” thì không cần phải nhắc lại là ngoại trừ các bệnh thuộc nhóm hoặc phân loại bệnh thoái hóa thần kinh, mà thuật ngữ này được sử dụng theo cách thông thường. Chế phẩm chứa g3p theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh thoái hóa thần kinh cũng như các bệnh liên quan đến tổn thương tau.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp làm giảm lượng của amyloid ở đối tượng bị bệnh có triệu chứng biểu hiện liên quan đến sự có mặt của amyloid hoặc tương tính với chất chỉ thị sinh học liên quan đến bệnh do gấp nếp protein sai, như là florbetapir (AV-45, Eli Lilly), bao gồm bước cho đối tượng bị bệnh sử dụng một lượng có hiệu quả dược phẩm hoặc chế phẩm được mô tả theo sáng chế. Theo một phương án, đường sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp vào trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp duy trì mức của amyloid ở đối tượng bị bệnh có triệu chứng biểu hiện liên quan đến sự xuất hiện của amyloid, mà đối tượng bị bệnh này dương tính với chất chỉ thị sinh học liên quan đến bệnh do gấp nếp protein sai, như florbetapir (AV-45, Eli Lilly), bao gồm bước sử dụng cho đối tượng bị bệnh một lượng có hiệu quả của dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án, đường sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm vào trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp phân ly amyloid ở đối tượng bị bệnh bao gồm bước sử dụng cho đối tượng bị bệnh có amyloid một lượng có hiệu quả điều trị dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án, đường sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp vào trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc trong phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp làm phân ly mảng tích tụ của amyloid β trong não, bao gồm bước tiêm trực tiếp vào trong não của đối tượng bị bệnh có nhu cầu một lượng dược phẩm có hiệu quả điều trị bệnh theo sáng chế, do đó làm giảm sự tích tụ của amyloid β trong não.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp làm giảm lượng của amyloid hình thành trong não. Việc làm giảm sự hình thành amyloid trong não có thể ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm các triệu chứng hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh do gấp nếp sai protein hoặc bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một phương án, đường sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế theo sáng chế để sử dụng trong phương pháp để thúc đẩy sự đào thải amyloid trong não. Việc thúc đẩy sự đào thải amyloid có thể ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm triệu chứng hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh gấp nếp sai protein hoặc bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một phương án, đường sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường

tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp vào trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được dùng trong phương pháp nhằm ức chế sự kết tụ amyloid trong não. Việc ức chế sự kết tụ amyloid trong não có thể ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm triệu chứng của một số bệnh thoái hóa thần kinh hoặc bệnh liên quan đến một số bệnh do gấp nếp sai protein. Theo một phương án, đường sử dụng được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp vào trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được dùng trong phương pháp để thanh thải các oligome amyloid gây độc có trong não. Việc thanh thải các oligome amyloid gây độc trong não có thể ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm triệu chứng hoặc mức độ của bệnh thoái hóa thần kinh hoặc bệnh do gấp nếp sai protein gây ra. Theo một phương án, đường dùng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp vào trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được dùng trong phương pháp để ngăn ngừa sự hình thành các oligome amyloid gây độc trong não. Việc ngăn ngừa sự hình thành các oligome gây độc trong não có thể ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm các triệu chứng hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh do gấp nếp sai protein hoặc bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một phương án, đường sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp vào trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối qua đường mũi.

Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được dùng trong phương pháp để bảo vệ tế bào thần kinh khỏi sự gây hại của amyloid. Việc tế bào thần kinh được bảo vệ khỏi sự gây hại bởi amyloid có thể ngăn ngừa, điều trị hoặc làm giảm các triệu chứng hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh do gấp nếp sai protein hoặc bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một phương án, đường sử dụng dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế được chọn từ đường tiêm nội tủy mạc, tiêm trực tiếp trong tâm thất, tiêm trong nhu mô hoặc phân phối theo đường mũi. Theo một phương án, dược phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng để bảo vệ tế bào thần kinh khỏi sự gây hại của amyloid được xác định như phương pháp phòng bệnh.

Theo một số phương án, đối tượng bị bệnh này dương tính với chất chỉ thị sinh học liên quan đến bệnh do kết tụ và/hoặc gấp nếp protein sai. Theo một phương án, chất chỉ thị sinh học này là florbetapir (AV45, Eli Lilly).

Theo một số phương án, đối tượng bị bệnh này biểu hiện triệu chứng của bệnh thoái hóa thần kinh mà bệnh này liên quan đến sự có mặt của amyloid. Trong các phương án khác nhau, amyloid này là dạng bất kỳ của $\text{fA}\beta 42$, $\text{f}\alpha\text{syn}$, fNM , hoặc ftau .

Theo một phương án cụ thể, bệnh thoái hóa thần kinh là bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, hoặc bệnh Huntington. Theo một phương án, bệnh thoái hóa thần kinh là bệnh Alzheimer. Theo một phương án, bệnh thoái hóa thần kinh là bệnh Alzheimer và đối tượng bị bệnh có biểu hiện amyloid β như được phát hiện bởi chất hiện hình florbetapir (AV-45, Eli Lilly).

Theo một số phương án, đối tượng bị bệnh này có triệu chứng biểu hiện bệnh do prion gây ra.

Theo một phương án cụ thể, bệnh do prion gây ra được chọn từ bệnh Creutzfeldt-Jakob disease, kuru, chứng mất ngủ di truyền gây chết, hoặc triệu chứng Gerstmann-Sträussler-Scheinker.

Theo một số phương án, đối tượng bị bệnh có triệu chứng biểu hiện bệnh thoái hóa thần kinh do protein tau ngoài bệnh Alzheimer. Theo một phương án cụ thể, bệnh được điều trị này là bệnh được chọn từ bệnh mất trí Argyrophilic dạng hạt (Argyrophilic grain dementia: AGD), thoái hóa Corticobasal, mất trí do chấn thương, lan truyền mớ rối sợi thần kinh và vôi hóa, hội chứng Down, mất trí do tổn thương trán-thái dương bao gồm mất trí trán-thái dương do bệnh Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh Hallervorden-Spatz, loạn dưỡng trương cơ, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh tế bào thần kinh vận động không phải người đảo Guam do có mớ rối sợi thần kinh, bệnh Pick, hội chứng Parkinson sau viêm não, chứng tăng thần kinh đệm tiền triển dưới vỏ não, chứng tê liệt trên nhân tiền triển, viêm não xơ hóa bán cấp tiền triển và mất trí do rối loạn.

Chẩn đoán

Theo một khía cạnh khác theo sáng chế, chế phẩm chứa g3p và TolA, kể cả protein dung hợp 3gp, được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán bệnh liên quan đến các bệnh khác nhau như được đề cập theo sáng chế. Ví dụ, gắn kết với chế phẩm theo

sáng chế khi được sử dụng như chất hiện hình hoặc là *in vivo* hoặc là *in vitro* như một phần của phương pháp chẩn đoán bệnh do gấp nếp protein sai như được mô tả theo sáng chế.

Các chất dùng để chẩn đoán bệnh, còn được đề cập đến như chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh, cũng thuộc phạm vi sáng chế và có thể chứa các chất bất kỳ được mô tả ở trên theo sáng chế (tức là, (a) g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó; (b) các hợp chất, polypeptit và protetin dung hợp chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó; (c) thực khuẩn thể dạng sợi được tăng số lượng bản sao của g3p khi so với thực khuẩn khi so với thực khuẩn thể thể đại; (d) tá được biểu hiện liên kết với amyloid chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p, thể đột biến hoặc variant biến thể của nó hoặc chế phẩm, polypeptit và protetin dung hợp chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó; hoặc (e) thực khuẩn thể dạng sợi được cải biến mang biến thể của g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p (không như phần protein g3p biểu hiện), thể đột biến hoặc biến thể của mảnh hoặc protein dung hợp gắn kết như vậy hoặc polypeptit khác loại chứa g3p, mảnh gắn kết với amyloid của g3p hoặc thể đột biến hoặc biến thể của nó). Các chất dùng để chẩn đoán bệnh có thể còn chứa thêm chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc có thể phát hiện *in vivo* theo cách khác.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế, như chế phẩm chứa g3p hòa tan hoặc mảnh gắn kết với amyloid (kể cả thể đột biến và biến thể của nó) hoặc protein g3p dung hợp, được sử dụng như chất hiện hình amyloid. Chất hiện hình này có thể phát hiện và amyloid và chẩn đoán các bệnh liên quan đến amyloid. Do chế phẩm theo sáng chế gắn kết với amyloid bất chấp loại sợi, nên chúng thích hợp, trong đó chúng có thể hiện hình mảng kết tụ của amyloid ($A\beta$, tau, α -synuclein, v.v..) - các chất này đóng vai trò là chất hiện hình đơn lẻ. Hiện không có chất hiện hình/phương pháp được chấp nhận để phát hiện sự kết tụ của tau hoặc alpha synuclein trong hệ thần kinh trung ương (CNS). Trong khi đã có các chất hiện hình đối với amyloid β , nhưng vẫn còn nhu cầu cần thêm các chất mà có thể tăng cường mối tương quan giữa chức năng liên quan và hình ảnh thu được và/hoặc có thể dự đoán tốt hơn khi nào bệnh tình sẽ trở nên xấu đi so với mức độ ổn định hiện có. Để có tổng quan, xem: Resnick & Sojkova, *Alzheimer's Res Ther.* (2011) 3(1):3.

Chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh theo sáng chế có thể được sử dụng như chất hiện hình kết hợp với chất hiện hình mà đặc hiệu với amyloid β như, ví dụ, F18-AV-45, Eli Lilly. Nếu không có chất hiện hình đã biết gây kết tụ không phải amyloid β , việc sử dụng chế phẩm dùng để chẩn đoán theo sáng chế đồng thời với chất hiện hình đặc hiệu với amyloid β sẽ phát hiện được dạng kết tụ không phải là amyloid β trên cơ sở phát hiện sự khác biệt. Do đó, theo một phương án, chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh theo sáng chế được sử dụng như chất hiện hình khi kết hợp với chất hiện hình amyloid β để phát hiện sự kết tụ không phải là amyloid β .

Theo một phương án khác, chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh theo sáng chế được sử dụng như chất hiện hình để phát hiện amyloid β trong CNS, kể cả trong não.

Chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh theo sáng chế thường cần có thành phần gắn kết với amyloid gắn với một hoặc nhiều chất đánh dấu có thể phát hiện được khi nó được sử dụng như chất hiện hình. Có nhiều chất đánh dấu có thể được gắn với chế phẩm gắn kết với amyloid của chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn để đánh dấu protein. Ví dụ về các chất đánh dấu này bao gồm chất đánh dấu huỳnh quang và chất đánh dấu phóng xạ. Có nhiều chất đánh dấu phóng xạ có thể sử dụng, nhưng thường dùng chất đánh dấu được lựa chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ^{18}F , ^{11}C và ^{123}I . Các chất đánh dấu đồng phân phóng xạ khác có thể được gắn vào protein bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này khi sử dụng hóa chất đã biết. Theo một phương án, chất đánh dấu này được phát hiện bằng cách chụp X quang phát xạ pozitron (PET). Tuy nhiên, các kỹ thuật thích hợp khác để phát hiện đồng phân phóng xạ có thể cũng được sử dụng để phát hiện các dấu phóng xạ.

Chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh theo sáng chế có thể được sử dụng theo đường giống như đã được mô tả cho chế phẩm dùng để điều trị bệnh. Theo một phương án, việc dùng theo đường nội tủy mạc là một đường dùng chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh. Theo một phương án khác, việc sử dụng tiêm tĩnh mạch là một đường dùng để sử dụng chế phẩm dùng để chẩn đoán bệnh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mặc dù đã chứng minh được hiệu quả của thực khuẩn thể dạng sợi như chất gắn kết chống lại sự kết tụ là phụ thuộc vào cơ chế hoạt động, việc hiểu cơ chế này cho phép

thiết kế thực khuẩn thể với hiệu quả điều trị tốt hơn. Ngoài ra, điều này còn đóng vai trò như cơ sở để điều chế hợp chất kháng lại sự kết tụ bổ sung.

Như đã đề cập ở trên, M13 cho thấy khả năng gắn kết và phân ly ít nhất bốn loại sợi amyloid khác nhau: dạng sợi 1-42 của amyloid β (fA β 42), dạng sợi α -synuclein (f α syn), dạng sợi NM prion của nấm men (fNM) và dạng sợi tau (ftau). Bốn loại protein này tạo ra các sợi amyloid mà không liên quan đến trình tự axit amin sơ cấp, nhưng cả bốn dạng đều bị gấp nếp sai thành dạng gấp nếp của amyloid chuẩn. Eichner & Radford, 2011. Khả năng của M13 gắn kết và gây ra sự phân ly của các protein trên đã chỉ ra rằng M13 nhận dạng ra được cấu trúc chính, như là dạng tấm gấp nếp beta hoặc đặc tính hình thể như các cụm kỵ nước, mà cả hai đặc tính này tạo nên đặc tính của sợi amyloid.

Mặc dù sự phân ly của amyloid không phải là đặc tính chung đối với tất cả các loại thực khuẩn thể. Ví dụ, cấu trúc đặc trưng hai mươi mặt của thực khuẩn thể T7 không gây ra sự phân ly của fA β 42, ngay cả khi T7 được ủ cùng fA β 42 trong 3 ngày ở 37°C. Thực khuẩn thể T7 không thể hiện bất kỳ hoạt tính phân tách ngay cả khi nồng độ của M13 phân ly trên 70% sợi amyloid cùng được ủ. Trái lại, thực khuẩn thể fd, mà mang axit amin tích điện âm trong g8p của nó khi so với M13 (và do đó biểu hiện nhiều hơn 2800 điểm tích điện âm/thực khuẩn thể so với M13 có trong số bản sao của g8p), việc gắn kết và phân ly fA β 42 thành M13. Các nghiên cứu ban đầu này, cùng với việc tìm ra virus khảm thuốc lá (TMV) có thể phân ly amyloid (TMV), lông mao và ống đuôi T4 của *E. coli*, tất cả đều có hình dạng trụ xoắn và có các đơn vị lặp lại (xem US 2011/0182948), cho thấy rằng, hình dạng của thực khuẩn thể mang tính chất quyết định đối với hoạt tính phân ly sợi amyloid.

Tuy nhiên, các ví dụ dưới đây được mô tả một cách lần lượt cơ chế (mặc dù không nhằm loại trừ lẫn nhau) đối với tính chất của thực khuẩn thể dạng sợi gắn kết và chống lại sự kết tụ đã được thông báo. Các ví dụ và cơ chế hoạt động hỗ trợ, thực khuẩn thể cải biến nhằm tăng cường sự gắn kết với amyloid dựa trên cơ sở này được đề xuất cùng với các hợp chất gắn kết với amyloid.

Ví dụ 1: Thực khuẩn thể M13 ưu tiên gắn kết với dạng sợi A β

Việc gắn kết M13 với dạng sợi A β so với dạng đơn thể A β được xác định bằng cộng hưởng bề mặt hạt nhân (SPR).

Thực khuẩn thể M13 ưu tiên gắn kết với sợi A β ; không gắn kết với monome A β . Nghiên cứu cộng hưởng bề mặt hạt nhân được thực hiện bằng cách sử dụng 10^{14} thực khuẩn thể/mL cho qua chip cảm biến sinh học với fA β được cố định được báo cáo trong Fig.3. Fig.3 cho thấy K_D gắn kết M13 vào khoảng 4 nM, khi so với sự gắn kết bởi kháng thể đơn dòng. Phản ứng tương tác ái lực cao này cho thấy rằng quá trình gắn kết đặc hiệu xảy ra giữa thực khuẩn thể và sợi amyloid.

Ví dụ 2: Gắn kết của M13 với dạng sợi Ab phụ thuộc vào liều dùng

M13 gắn kết với fA β 42 cũng phụ thuộc vào liều dùng. Trong Fig.4A, sự gắn kết của hai liều dùng thực khuẩn thể với số mol fA β 42 tăng đã được so sánh. Trong phương pháp phân tích gắn kết tinh sợi amyloid-M13, M13-Alexa488 được trộn với A β (fA β) trong 2-3 giờ cho phép tạo ra phức hợp, tiếp đó, phức hợp này được để lắng bằng cách ly tâm với tốc độ 7500 vòng/phút, trong thời gian 10 phút. Sự phát huỳnh quang trong các hạt cặn lắng tương ứng với M13 gắn kết với amyloid. Phương pháp phân tích này cho phép định lượng sự gắn kết của thực khuẩn thể liên kết với fA β đồng thời đưa ra hệ đánh giá khả năng của các hợp chất khác liên kết cạnh tranh với thực khuẩn thể. Fig.4B cho thấy K_D đối với gắn kết cạnh tranh M13 tương ứng với giá trị quan sát được đối với gắn kết được phân tích trong phương pháp cộng hưởng bề mặt hạt nhân.

Ví dụ 3: Hình thể nguyên dạng để gắn kết M13 với dạng sợi A β

Khi gia nhiệt thực khuẩn thể M13 đến 90°C trong 10 phút, khả năng cạnh tranh để gắn kết của chúng về cơ bản bị mất hoàn toàn. Fig.5 thể hiện kết quả cạnh tranh liên kết bằng cách xử lý nhiệt (đóng khung) so với dạng M13 ban đầu (khoanh tròn) trong phương pháp phân tích gắn kết cạnh tranh với sợi amyloid.

Ví dụ 4: Nhiệt độ tương ứng cho phản ứng M13-amyloid

M13 có khả năng phân ly sợi amyloid. Fig.6 thể hiện kết quả phân tích huỳnh quang Thioflavin T (ThT) sử dụng fA β . Khi có mặt của M13, fA β 42 bị phân ly.

Fig.7A thể hiện sự thay đổi của nồng độ muối trong kết quả phân tích huỳnh quang ThT 10 lần (từ 0,15 đến 1,5 M), trong đó chỉ có 2-3 lần khác biệt trong tỷ lệ phần trăm của fA β bị phân ly. Điều này cho thấy rằng, phản ứng kỵ nước chịu trách nhiệm đối với phần lớn sự phân ly quan sát được.

Ngược với hiệu quả nhỏ tương ứng với nồng độ của muối, Fig.7B cho thấy rằng sự thay đổi về nhiệt độ từ 4°C đến 37°C dẫn đến sự khác biệt về sự phân ly từ 8 đến 10 lần.

Các kết quả này cho thấy rằng sự phân ly M13 phụ thuộc vào protein mà có chúng hoạt động mạnh hơn ở nhiệt độ cao hơn và vô tình tương ứng với hiệu quả của muối trong phương pháp phân tích đó, gián tiếp qua phản ứng kỵ nước. Thực khuẩn thể g3p phù hợp với mục đích này. Các miền N1 và miền N2 được liên kết với nhau bằng liên kết giàu glyxin, mà liên kết này “mở” theo sự gắn kết của N2 với lông F của vi khuẩn Tiếp đó N1 này có khả năng gắn kết với đồng thụ thể của vi khuẩn, mà đồng thụ thể này đóng vai trò như một phần của quá trình phản ứng. Việc làm tăng nhiệt độ trong phương pháp phân tích sự phân ly được hy vọng là “mở” các miền N2 và N1 của g3p.

Trong khi làm bất hoạt M13 ở nhiệt độ cao (90°C, 10 phút, xem Fig.5) để hủy bỏ gắn kết, làm tăng nhiệt độ ủ trong phương pháp phân tích gắn kết M13-amyloid có tác dụng dương tính đối với gắn kết đó. Fig.8A cho thấy khi tăng nhiệt độ 18°C đến 58°C thì gắn kết tăng dần lên đến khi T_M bản lẻ không gấp nếp khoảng 50°C, mà tại đó, sự gắn kết bắt đầu giảm. Nhiệt độ gắn kết tối ưu này là thích hợp với nhiệt độ không gấp nếp N1-N2 (còn gọi là nhiệt độ nóng chảy hoặc T_M) trong g3p, đó là 48,1°C. Việc tăng nhiệt độ ủ lên đến 50°C thay vì 37°C cũng làm cho sự gắn kết của M13 với fA β 42 xảy ra nhanh hơn. Fig.8B.

Ví dụ 5: g3p cần thiết để cho phản ứng M13-amyloid β

Để trực tiếp kiểm tra xem liệu g3p có cần thiết đối với sự gắn kết của M13-amyloid β hay không, g3p được lấy ra khỏi thực khuẩn thể bằng xử lý bằng ArgC (M13 Δ g3p) để thủy phân protein và thực khuẩn thể M13 Δ g3p được so sánh với thực khuẩn thể tái gấp nếp đối với gắn kết A β . Khi xử lý bằng ArgC, proteaza của *Bacillus*, sẽ phân tách một cách chọn lọc tiểu đơn vị g3p ra khỏi thực khuẩn thể. Kết quả được thể hiện trên Fig.9A. M13 được tái cuộn xoắn sẽ cạnh tranh với M13 thể đại trong phương pháp phân tích liên kết cạnh tranh, mặc dù ở mức cao. Tuy nhiên, ngay cả khi tăng M13 Δ g3p lên gấp 15 lần thì sự cạnh tranh này vẫn kém, nếu toàn bộ là M13 thể đại. Việc không thể cạnh tranh được với M13 thể đại tương ứng với việc mất khả năng lây nhiễm trong thực khuẩn thể M13 Δ g3p. Fig.9B. Khi xử lý bằng ArgC cũng khiến mất hoạt tính phân ly. Fig.9C.

Nếu g3p gây ra sự gắn kết theo cách tương đồng với vai trò của nó trong khi lây nhiễm, thì miền N1 và N2 vẫn đóng vai trò quan trọng trong việc lây nhiễm mà cạnh tranh với M13 để gắn kết. Để kiểm tra điều này, N1N2 hòa tan tái tổ hợp (“rs-g3p(N1N2)”); “cấu trúc 3”) được tạo ra và thử nghiệm trong phân tích cạnh tranh. Theo Fig.10A và Fig.10B, M13 cạnh tranh với M13 được đánh dấu để gắn kết với fA β 42, trong khi M13 Δ g3p lại không. Trái lại, rs-g3p(N1N2) có khả năng cạnh tranh với M13, cho thấy rằng miền N1 và miền N2 của g3p đủ để gắn kết với amyloid β . Thu được kết quả tương ứng khi lặp lại đối với phân tích cạnh tranh. Fig.10B.

Ví dụ 6: Các đột biến không gấp nếp bản lề g3p điều hòa sự gắn kết của amyloid

Các đột biến mà tác động đến khả năng của bản lề nằm giữa miền N1 và miền N2 của g3p để mở ra cũng tác động đến khả năng của thực khuẩn thể có các đột biến mà cạnh tranh với M13 thể đại để gắn kết với A β . Eckert & Schmid, 2007, đã mô tả một số biến thể của thực khuẩn thể được sử dụng để thử nghiệm cho giả thuyết này. Các biến thể “AAA” (còn được gọi là “3A”) làm yếu sự gắn kết của lông và làm tăng tính ổn định của miền N2. AAA mang các đột biến sau trong g3p: W181A, F190A và F194A. Các đột biến IIHY bao gồm T13I, T101I, Q129H và D209Y, mà chúng được làm ổn định miền N2 và làm tăng T_M .

Cạnh tranh liên kết được đánh giá đối với thực khuẩn thể fd, thực khuẩn thể này có trình tự axit amin g3p trong miền N1 và miền N2 giống như của M13 (Fig.2); IIHY, có T_m bản lề và AAA cao hơn M13. Đối với thực khuẩn thể fd, AAA và IIHY được ủ trước tại 50°C trong 1,5 giờ, tiếp đến là Fd, AAA, và IIHY hoạt hóa và bất hoạt được so sánh về khả năng cạnh tranh với M13 được đánh dấu. Fig.11 thể hiện kết quả thu được. fd thể đại là chất cạnh tranh tốt hơn khi được hoạt hóa bằng nhiệt. Trái lại, sự gia nhiệt này có hiệu quả rất thấp đối với IIHY, mà có T_m bản lề cao hơn. AAA, mà có độ ổn định của miền N2 bị suy giảm so với M13, là chất cạnh tranh tốt hơn khi được hoặc không được xử lý nhiệt.

Các dữ liệu này trợ giúp cho kết luận, đó là sự tác động của M13 với amyloid β cùng cơ chế mà cơ chế này được M13 dùng để lây nhiễm vi khuẩn. Trước hết, nó chỉ ra rằng phản ứng kỵ nước là rất quan trọng đối với phản ứng M13-amyloid β . Thứ hai, hoạt tính gắn kết và phân ly của M13 phụ thuộc vào nhiệt độ phản ánh T_m không gây gấp nếp

bản lẻ N1-N2. Thứ ba, sự thủy phân chọn lọc g3p sẽ làm mất mối tương tác giữa M13-amyloid β .

Ví dụ 7: Mảnh g3p được lựa chọn và có khả năng gắn kết với amyloid, nhưng không phải là dạng đơn thể

Để đánh giá xem liệu mảnh g3p có duy trì khả năng gắn kết với amyloid hay không, điều chế mảnh g3p chứa N1 và N2 và đánh giá khả năng gắn kết của A β dạng sợi so với A β dạng monome bằng cộng hưởng bề mặt hạt nhân (SPR). Kết quả cho thấy rs-g3p(N1N2) được ưu tiên gắn kết với dạng sợi A β ; mà không gắn kết với A β dạng monome. Nghiên cứu cộng hưởng bề mặt hạt nhân bằng cách sử dụng 4 μ M rs-g3p(N1N2) được báo cáo trong Fig.13, nghiên cứu này cũng cho thấy kết quả K_D gắn kết rs-g3p(N1N2) là khoảng 160 nM. Ái lực liên kết cao này chỉ ra rằng quá trình gắn kết đặc hiệu xuất hiện giữa rs-g3p(N1N2) và sợi của amyloid.

Cấu trúc bổ sung được đánh giá bằng SPR. Bảng dưới đây tóm lược kết quả đánh giá.

Mẫu phân tích	k_a (1/M·giây)	k_d (1/giây)	K_D
Cấu trúc 1 M13	2,6e3	9,2e-6	3,59nM
Cấu trúc 3 rs-G3P(N1N2), 25°C	1,5e3	2,4e-4	0,15 μ M
Cấu trúc 3 rs-G3P(N1N2), gia nhiệt trước tại 37°C	4,1e3	2e-4	0,05 μ M
Cấu trúc 4	1,75e4	1,28e-4	7,32nM
Protein dung hợp rs-g3p (N1N2)-hIgG4Fc, 25°C			
Cấu trúc 5	1,52e4	1,66e-4	10,9nM
Protein dung hợp rs-g3p (N1N2)-hIgG4Fc, 25°C			
Cấu trúc 6	1,71e4	1,58e-4	9,2nM
Protein dung hợp N1N2-IgG1Fc, 25°C			

Ví dụ 8: Mảnh g3p có khả năng phân ly sợi A β 42

Để kiểm tra xem liệu mảnh g3p có thể phân ly sợi amyloid hay không, rs-g3p(N1N2) được thử nghiệm trong phương pháp phân tích huỳnh quang ThT đối với khả năng thoái hóa sợi fA β 42 được tạo ra trước đó. Kết quả cho thấy rằng rs-g3p(N1N2) có khả năng phân ly fA β 42. Fig.14A thể hiện kết quả của thí nghiệm này, mà trong đó rs-g3p(N1N2) phân ly fA β 42 trong mô hình phụ thuộc theo liều dùng. Fig.14B thể hiện IC₅₀ là khoảng 20 nM.

Theo một thử nghiệm độc lập, A β 42 được ủ cùng với hoặc không cùng với rs-g3p(N1N2) tại nồng độ 2 μ M trong vài ngày ở 37°C và sự toàn vẹn của sợi A β 42 được

đánh giá bằng kính hiển vi điện tử truyền qua. Fig.15A thể hiện kết quả của thí nghiệm này, mà rs-g3p(N1N2) phân ly sợi A β 42. Fig.15B báo cáo kết quả phân tích ThT đối với các mẫu tương tự. Rs-g3p(N1N2) gây biến tính đối với sợi sợi A β 42 trong phương pháp phân tích ThT này.

Ví dụ 9: rs-g3p(N1N2) phong bế α -synuclein và sự tập hợp A β và rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc phong bế sự tập hợp và ức chế sự kết tụ của A β

Để xác định xem liệu g3p có khả năng phong bế sự tập hợp sợi α -synuclein đồng thời xác định xem liệu chúng có đóng vai trò đồng giá hay không (tức là, số lượng bản sao của g3p), tiến hành thử nghiệm đánh giá khả năng của g3p ngũ liên (5 bản sao của g3p) và g3p đơn thể (một bản sao của g3p) để chặn hoạt tính của α -synuclein. Kết quả cho thấy rằng, đối với hoạt tính này, g3p phong bế sự tập hợp sợi α -synuclein và thể g3p ngũ liên có hiệu quả cao hơn so với g3p đơn thể. Xem Fig.16.

Khả năng của rs-g3p(N1N2) (cấu trúc 3) và rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) để ức chế sự tập hợp của A β 42 cũng được đánh giá. Theo Fig.30 và Fig.31, cấu trúc 3 và cấu trúc 6 có khả năng ức chế sự tập hợp của fA β 42 ở dạng phụ thuộc vào liều lượng sử dụng. Theo Fig.37, cấu trúc 3 và cấu trúc 6 có khả năng ức chế sự kết tụ của fA β 42.

Ví dụ 10: Protein dung hợp rs-g3p(N1N2)-Ig gắn kết và phân ly A β

Để đánh giá xem liệu g3p có đóng vai trò đồng hóa trị đối với khả năng gắn kết của g3p với amyloid hay không, protein dung hợp Ig liên kết đôi với rs-g3p(N1N2) (“dung hợp rs-g3p(N1N2)-Ig”) được tạo ra và so sánh với M13 liên kết năm về khả năng gắn kết với sợi A β của chúng. Theo Fig.17, thể dung hợp rs-g3p(N1N2)-Ig gắn kết với A β có cùng ái lực như M13 và có khả năng gắn kết tốt hơn so với rs-g3p(N1N2) đơn lẻ, điều này cho thấy rằng hóa trị của g3p đóng vai trò quan trọng. Khi lặp lại phương pháp phân tích cạnh tranh cũng thu được kết quả tương ứng. Fig.18. Theo Fig.18, hình vuông đại diện cho thấy cấu trúc 2 (M13); hình tam giác đại diện cho cấu trúc 3 (rs-g3p(N1N2)); hình tam giác ngược đại diện cho cấu trúc 4 (dung hợp rs-g3p(N1N2)-Ig); và hình thoi đại diện cho đối chứng âm r-IgG4 Fc.

Để đánh giá xem liệu hóa trị có đóng vai trò quan trọng trong việc phân ly amyloid hay không, dạng dung hợp rs-g3p(N1N2)-Ig hóa trị hai (“cấu trúc 4”) được so sánh với dạng M13 hóa trị năm trong phương pháp phân tích bẫy lọc. Fig.19. Kết quả cho thấy

rằng cả dạng dung hợp rs-g3p(N1N2)-Ig và M13 hóa trị năm đều có khả năng phân ly sợi của amyloid β . Thử nghiệm cũng cho thấy rằng hóa trị có thể đóng vai trò quan trọng đối với khả năng phân ly, khoảng 1,7nM M13 hóa trị ba có tác dụng làm giảm sự kết tụ với mức tương đương của dạng dung hợp 40 nM rs-g3p(N1N2)-Ig. Fig.19.

Theo phương án phân tích tương tự, 1×10^{12} /mL M13 (cấu trúc 2); 80 nm và 800 nM rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 5); và 80 nm và 800 nM của rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) được thử nghiệm về khả năng phân ly của sợi A β 42 trong phương pháp phân tích bẫy lọc. Cấu trúc 2, 5 và 6 có khả năng phân ly sợi của amyloid β . Fig.33.

Ví dụ 11: Protein dạng tứ liên streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] gắn kết và phân ly fA β

Để đánh giá xem liệu hóa trị của g3p có khả năng gắn kết và phân ly amyloid hay không, streptavidin dạng tứ liên được tiếp hợp với g3p(N1N2) được tạo ra bằng cách kết hợp rs-g3p(N1N2) với Biotin-Lys-NTA trong điều kiện có mặt của NiSO₄. Phối tử dư được loại bỏ bằng cách lọc qua màng 3KDa MWCO. Streptavidin được bổ sung và rs-g3p(N1N2)-Biotin dư được loại bỏ bằng cách lọc qua màng 100 KDa MWCO. Cấu trúc g3p thu được, streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)], chỉ thấy có bốn gốc rs-g3p(N1N2). Streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] được so sánh với rs-g3p(N1N2) (“cấu trúc 3”) trong phương pháp phân tích gắn kết. Fig.20. Dạng tứ liên streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] có khả năng gắn kết với fA β tốt hơn dạng rs-g3p(N1N2) đơn thể, điều này đã chỉ ra rằng hóa trị đóng vai trò quan trọng đối với khả năng gắn kết. Fig.20. Thậm chí, chúng cũng đóng vai trò quan trọng ngay cả khi rs-g3p(N1N2) dạng đơn thể gắn kết với fA β ở mức được dùng.

Để đánh giá xem liệu hóa trị có đóng vai trò quan trọng trong việc phân ly hay không, rs-g3p(N1N2) dạng đơn thể đã được tạo ra để so sánh với dạng tứ liên streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] phương pháp phân tích bẫy lọc. Fig.21. Kết quả cho thấy rằng cả dạng rs-g3p(N1N2) đơn thể và dạng tứ liên streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] đều có khả năng phân ly sợi fA β . Kết quả cũng chỉ ra rằng hóa trị có thể đóng vai trò quan trọng trong việc phân ly, như được chỉ ra bởi khả năng vượt trội của 360 nM dạng tứ liên streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] trong việc loại bỏ 200 ng fA β kết tụ, khi so với sự phân ly A β bằng 2,5 μ M rs-g3p(N1N2) dạng đơn thể. Fig.21, hàng2 so với hàng 4, ví dụ.

Sự phân ly của A β bằng streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] cũng có thể đánh giá được bằng TEM. Streptavidin-[biotin-g3p(N1N2)] phân ly hoàn toàn fA β 42 sau khi ủ 3 ngày. Fig.22.

Ví dụ 12: Protein dung hợp N1N2-Ig làm giảm đáng kể A β trong mẫu chuột mắc bệnh Alzheimer

Sử dụng mẫu chuột được dùng trong nghiên cứu bệnh Alzheimer (Hsiao et al., Science (1996) 274:99-102; Duyckaerts et al., Acta Neuropathol (2008) 115:5-38), chuột đực Tg2576 có độ tuổi trên 500 ngày, được tiêm (2 μ L/lần tiêm) tiêm lần lượt vào thùy cá ngựa hai chế phẩm là N1N2-Ig fusions (cấu trúc 5 với liều lượng 7,8 μ g/lần tiêm và cấu trúc 6 với liều lượng 8,2 μ g/lần tiêm) và nước muối sinh lý được dùng làm đối chứng âm và giết sau 7 ngày. Thu mô não, cắt và nhuộm mà để định lượng bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng kháng amyloid β (82E1; cat. # MBS490005-IJ10323 from MyBioSource). Theo Fig.28, cả hai protein dung hợp N1N2-Ig đều có tác dụng làm giảm đáng kể lượng mảng tích tụ được xác định trên thùy cá ngựa khi so với mẫu chuột được điều trị bằng nước muối sinh lý. Theo Fig.29, cả hai protein dung hợp N1N2-Ig đều làm giảm đáng kể lượng mảng tích tụ xác định được trong vỏ não khi so với chuột được điều trị bằng nước muối sinh lý.

Ví dụ 13: Protein dung hợp N1N2-Ig phong bế A β dạng oligome gây độc tế bào

A β dạng oligome do sự giải phóng enzym gây độc cụ thể trong tế bào thần kinh. Enzym này có thể được phân tích nhằm xác định xem liệu một hợp chất cụ thể có thể ức chế A β dạng oligome gây độc tế bào hay không. Fig.32 cho thấy dữ liệu tiêu biểu, trong đó M13 (cấu trúc 2) và rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (cấu trúc 6) phong bế độc tính gây ra bởi oligome đối với tế bào N2a. Do đó, các mảnh g3p là các chất ức chế tiềm năng đối với oligo A β gây độc tế bào.

Ví dụ 14: Protein dung hợp N1N2-Ig gắn kết và phân ly tau

Để đánh giá xem liệu mảnh g3p gắn kết với tau, mảnh protein dung hợp g3p-Ig chứa N1 và N2 được tạo ra và đánh giá khả năng gắn kết với ftau của nó bằng cộng hưởng bề mặt hạt nhân (SPR). Fig.35 thể hiện kết quả của phương pháp phân tích SPR điển hình cho thấy rằng rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (cấu trúc 4) có tiềm năng liên kết với ftau.

Để kiểm tra xem liệu mảnh g3p có thể phân ly tau hay không, mảnh protein dung hợp g3p-Ig chứa N1 và N2 được thử nghiệm bằng phương pháp phân tích huỳnh quang ThT về khả năng biến tính tau có trước. Kết quả này chỉ ra rằng protein dung hợp N1N2-Ig có khả năng phân ly tau. Xem, Fig.36A và Fig.36B.

Ví dụ 15: Protein dung hợp N1N2-Ig ức chế sự tích lũy, kết tụ PrP^{Sc} và hình thành PrP^{Sc} trong mẫu nuôi cấy tế bào của bệnh do prion (N2a22L^{Sc})

Bệnh do prion đặc trưng bởi sự nghịch chuyển protein prion của tế bào thông thường (PrP^C) thành dạng bệnh lý kháng proteaza PrP^{Sc}. PrP^{Sc} có đặc tính từ PrP^C trên cơ sở kháng proteaza: dạng biến tính một phần PrP^{Sc} bởi proteaza tạo thành mảnh có lõi đầu C kháng proteaza (PrPres), mà dạng này là dạng không được glycosyl hóa với trọng lượng phân tử khoảng 19-21 kDa. Sự ức chế, nghịch chuyển và tái sinh PrP^{Sc} tạo ra cơ chế tiếp cận về khả năng trị liệu để điều trị một số bệnh thoái hóa.

Để xác định xem liệu mảnh protein dung hợp g3p-Ig chứa N1 và N2 (cấu trúc 6) có can thiệp vào dạng chuẩn prion gây bệnh (PrP^{Sc}) in vitro trong mẫu mắc bệnh do prion hay không đồng thời cũng xác định xem liệu có sự phân ly hoặc sự thay đổi về tính hòa tan của PrP trong tế bào N2a22L^{Sc} khi có hoặc không có mặt của cấu trúc 6 hay không, tế bào được nuôi cấy trong 24 giờ trong điều kiện có hoặc không có 1 ug/mL cấu trúc 6 hoặc IgG và sau đó được thu hoạch trong dung dịch đệm thủy phân. 100µg protein tổng số được siêu ly tâm ở 4°C trong 90 phút với tốc độ 55,000 vòng/phút trong rôto TLA 100.1 trong thiết bị siêu ly tâm Beckman Optima TL. 25µl mẫu chứa hạt và dịch nổi hòa tan được đưa lên cột SDS-PAGE và phân tích dòng bằng kháng thể 6D11 mAb kháng PrP. Việc tăng cường loại bỏ các chất không hòa tan dự báo trước của proteaza K (PK) kháng bởi thể đột biến PrP^{Sc} hoặc PrP, nên đánh giá được khả năng của cấu trúc 6 thay đổi về tính hòa tan của PrP. Tế bào được xử lý bằng cấu trúc 6 biểu hiện sự suy giảm đáng kể về lượng PrP kết tụ/hòa tan khi so với tế bào N2a22L^{Sc} được xử lý bằng IgG. Xem: Fig.38A và Fig.38B.

Theo Fig.38A và Fig.38B, tế bào N2a22L^{Sc} được tạo ra theo tài liệu Pankiewicz et al., Eur. J. Neurosci. (2006) 23:2635-2647. Tóm lại, não của chuột bị bệnh CD-1 giai đoạn cuối được cho lây nhiễm vào loại prion 22L phù hợp với chuột được làm đồng nhất với dung dịch nước muối đệm phosphat lạnh và 5% dextroza trong điều kiện vô trùng bằng siêu âm (10% khối lượng/thể tích). Để lây nhiễm, thể đồng nhất chứa não chuột này

được pha loãng tiếp đến 2% trong Opti-MEM và được bổ sung vào rãnh phụ trên đĩa sáu giếng (Corning, Acton, MA, USA), 1 mL/giếng 10-cm². Sau 5 giờ, 1 mL MEM chuẩn được bổ sung vào tế bào và ủ cùng với thể đồng nhất chứa não chuột ở trên, thời gian ủ bổ sung là 12 giờ. Tế bào được rửa sạch và được cho vào môi trường nuôi cấy MEM chuẩn. Tế bào được phát triển cho đến khi giao nhau và tiếp đó được chia theo tỷ lệ pha loãng 1:2 và được chuyển vào ống nghiệm 25-cm² (Corning). Tế bào được phát triển trong ống nghiệm được chia theo tỷ lệ 1:2 sau chu kỳ 4 ngày cho phép phát triển trong lần cấy chuyển tiếp theo, tế bào phát triển trong ống nghiệm được thu hoạch và được đồng nhất để kiểm tra mức PrP^{Sc}. Theo nghiên cứu trên, sự xuất hiện của chất dùng để tiêm có nguồn gốc từ PrP^{Sc} chỉ được phát hiện đối với lần cấy chuyển thứ nhất và thứ hai, nên tế bào lần cấy chuyển thứ 4 (P4) được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Tế bào được phân giải bằng dung dịch đệm đồng nhất chứa (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM axit etylen glycol tetraaxetic (EGTA), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 2,5 mM Na₄P₂O₇, 1 mM β-glyxerophosphat, 1% NP-40, 0,25% natri deoxycholat, 0,5 mM phenylmetylsulfonylfluorua (PMSF), 1 mM leupeptin, 1 mM pepstatin A, 1 mM) hoặc không có PMSF để phân cắt bằng PK) trong 5 phút tại 4 °C và phần không hòa tan được loại bỏ bằng cách ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Để tách phân đoạn tế bào, 100μg protein được ly tâm với tốc độ 55.000 vòng/phút trong 90 phút, sau đó các hạt này được tái tạo lại về thể tích ban đầu. 20% của cả phần hạt và dịch nổi được phân giải và xác định về mặt hóa sinh.

Để chỉ ra xem liệu có sự thay đổi phụ thuộc vào liều dùng của cấu trúc 6 đối với sự lây lan PrP^{Sc}, sự phân ly hoặc thay đổi các đặc tính sinh lý của nó hay không, tế bào N2a22L^{Sc} được nuôi cấy trong 24h đồng thời với việc có hoặc không có cấu trúc 6 hoặc với IgG với nồng độ tăng và được thu hồi trong dung dịch đệm thủy phân. Từng phần tế bào được thủy phân khi được xử lý hoặc không được xử lý bằng PK được đưa lên SDS-PAGE và phân tích dòng chảy bằng kháng thể 6D11 kháng PrP và 6H4 mAb. Phản ứng miễn dịch sinh hóa đáp ứng PK được phân cắt và không được phân cắt thu được từ tế bào IgG đối chứng và tế bào được xử lý bằng cấu trúc 6 được đánh giá. Việc xử lý này bao gồm: N2a22L^{Sc} + 10μg/mL, 3μg/mL, 1μg/mL, 0,333μg/mL, 0,111μg/mL, 0,037μg/mL, 0,012μg/mL và 0,004μg/mL cấu trúc 6 hoặc N2a22L^{Sc} + 1μg/mL mIgG.

Kết quả trên cũng chỉ ra rằng có một sự suy giảm đáng kể theo liều dùng trong PrP^{Sc} khi có mặt của cấu trúc 6, với ít hơn 50% PrP^{Sc} được tạo ra khi có 0,08ug/mL cấu trúc 6 so với 1ug/mL IgG. Xem Fig.39A và Fig.39B. Các thí nghiệm lặp lại cũng xác nhận kết quả này.

Để đánh dạng PrP kháng proteinaza K (PK), các phần của tế bào thủy phân được xử lý bằng PK (1ug/ug) pha loãng theo tỷ lệ 1:50 ở 37°C trong 30 phút, theo các phương pháp đã biết (Perrier et al., J. Neurochem (2004) 84:454-463, Pankiewicz et al., 2006). Sau khi ủ, sự phân cắt được dừng bằng cách bổ sung PMSF đến 4 mM.

Nồng độ protein xác định được bằng cách sử dụng kit phân tích protein BCA (Pierce). Mẫu được pha loãng trong đệm mẫu (250 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 5 mM β -mercaptoethanol, 50% glyxerol, 0,02% xanh comassie G250) và được đun sôi trong 5 phút. Mẫu được xử lý này được rửa giải bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử.

Kháng thể đơn dòng 6D11 kháng PrP (See Sadowski et al., Neurobiol Dis. (2009) 34(2): 267-278) và 6H4 (Xem: Cordes et al., J Immunol Methods (2008) 337:106-120) cũng như các dạng kháng actin được sử dụng để xác định đặc tính cầu mẫu. Phức hợp kháng nguyên-kháng thể này được xác định bằng cách sử dụng IgG kháng chuột tiếp hợp với peroxidaza của cây cải ngựa (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) được nhận biết bằng hệ thống ECL (GE Healthcare UK Limited) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc định lượng các dải protein được thực hiện bằng cách phân tích mật độ của màng (Image J, NIH).

Fig.38A và Fig.38B và Fig.39A và Fig.39B đã đồng thời chứng tỏ khả năng của mảnh protein dung hợp g3p Ig ức chế trực tiếp sự tạo thành PrP^{Sc} trong điều kiện *in vitro*.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein dung hợp chứa polypeptit gắn kết với amyloid và ít nhất một polypeptit bổ sung thường không gắn kết với polypeptit gắn kết với amyloid, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có khả năng gắn kết với protein amyloid gấp nếp sai và/hoặc kết tụ và được chọn từ:

(a) g3p thể đại,

(b) mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại chứa miền N2 có chiều dài đầy đủ,

(c) g3p đột biến vẫn có khả năng gắn kết với amyloid và khác với g3p kiểu đại (a) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin, và

(d) mảnh gắn kết amyloid đột biến của g3p vẫn có khả năng gắn kết với dạng tinh bột và khác với mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại (b) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin, và

trong đó polypeptit gắn kết với amyloid hoặc protein dung hợp này không bao gồm thực khuẩn thể.

2. Protein dung hợp theo điểm 1, trong đó polypeptit là ít nhất một polypeptit bổ sung chứa vùng hằng định của globulin miễn dịch.

3. Protein dung hợp theo điểm 2, trong đó vùng hằng định của globulin miễn dịch là mảnh Fc của globulin miễn dịch.

4. Protein dung hợp theo điểm 3, trong đó mảnh Fc của globulin miễn dịch là mảnh Fc của IgG1.

5. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này là mảnh N1-N2 của g3p thể đại hoặc mảnh tương ứng của g3p đột biến.

6. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này là g3p thể đại hoặc đột biến có chiều dài đầy đủ.

7. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó g3p thể đại hoặc mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại có trình tự tương tự như SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.

8. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.

9. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.

10. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.

11. Protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 98% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.

12. Protein dung hợp theo điểm 5, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với mảnh N1-N2 của SEQ ID NO.1.

13. Protein dung hợp theo điểm 5, trong đó vùng bản lề của N2 được gây đột biến để tạo ra polypeptit với nhiệt độ nóng chảy vùng bản lề giảm và ái lực cao hơn đối với amyloid so với polypeptit thể đại tương ứng.

14. Polypeptit gắn kết với amyloid, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có khả năng gắn kết với protein amyloid gấp nếp sai và/hoặc kết tụ và được chọn từ:

- (a) g3p thể đại,
- (b) mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại chứa miền N2 có chiều dài đầy đủ,
- (c) g3p đột biến vẫn có khả năng gắn kết với amyloid và khác với g3p kiểu đại
- (a) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin, và
- (d) mảnh gắn kết amyloid đột biến của g3p vẫn có khả năng gắn kết với dạng tinh bột và khác với mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại (b) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin, và

trong đó polypeptit gắn kết với amyloid hoặc protein dung hợp này không bao gồm thực khuẩn thể.

15. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm 14, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này là mảnh N1-N2 của g3p thể đại hoặc mảnh tương ứng của g3p đột biến.
16. Polypeptit gắn kết với amyloid theo 14 hoặc 15, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này là g3p thể đại hoặc đột biến có chiều dài đầy đủ.
17. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó g3p thể đại hoặc mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại có trình tự tương tự như SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.
18. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 85% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.
19. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 90% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.
20. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.
21. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 16, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 98% so với SEQ ID NO.1 hoặc mảnh gắn kết amyloid của SEQ ID NO.1.
22. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm 15, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid này có độ tương đồng trình tự ít nhất bằng 95% so với mảnh N1-N2 của SEQ ID NO.1.
23. Polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm 15, trong đó vùng bản lề của N2 được gây đột biến để tạo ra polypeptit với nhiệt độ nóng chảy vùng bản lề giảm và ái lực cao hơn đối với amyloid so với polypeptit thể đại tương ứng.
24. Dược phẩm chứa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 và chất mang dược dụng.
25. Dược phẩm theo điểm 24, trong đó dược phẩm này ở dạng phân liều đơn vị.

26. Dược phẩm chứa polypeptit gắn kết với amyloid theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 23 và chất mang dược dụng.

27. Dược phẩm theo điểm 26, trong đó dược phẩm này ở dạng phân liều đơn vị.

28. Chế phẩm chứa nhãn đánh dấu có thể phát hiện được gắn kết với protein dung hợp chứa polypeptit gắn kết với amyloid và polypeptit bổ sung thường không gắn kết với polypeptit gắn kết với amyloid, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid có khả năng gắn kết với protein amyloid gấp nếp sai và/hoặc kết tụ và được chọn từ:

(a) g3p thể đại,

(b) mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại chứa miền N2 có chiều dài đầy đủ,

(c) g3p đột biến vẫn có khả năng gắn kết với amyloid và khác với g3p thể đại (a) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin, và

(d) đoạn đột biến gắn kết amyloid của g3p vẫn giữ khả năng gắn kết với amyloid và khác với mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại (b) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin,

trong đó polypeptit gắn kết với amyloid hoặc protein dung hợp này không bao gồm thực khuẩn thể.

29. Chế phẩm chứa nhãn đánh dấu có thể phát hiện được gắn kết với polypeptit gắn kết với amyloid, trong đó polypeptit gắn kết với amyloid có khả năng gắn kết với protein amyloid gấp nếp sai và/hoặc kết tụ và được chọn từ:

(a) g3p thể đại,

(b) mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại chứa miền N2 có chiều dài đầy đủ,

(c) g3p đột biến vẫn có khả năng gắn kết với amyloid và khác với g3p thể đại (a) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin, và

(d) đoạn đột biến gắn kết amyloid của g3p vẫn giữ khả năng gắn kết với amyloid và khác với mảnh gắn kết amyloid của g3p thể đại (b) chỉ bằng cách thay thế và/hoặc chèn đoạn axit amin,

trong đó polypeptit gắn kết với amyloid hoặc protein dung hợp này không bao gồm thực khuẩn thể.

30. Trình tự axit nucleic mã hóa protein dung hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13.
31. Vector chứa axit nucleic theo điểm 30.
32. Tế bào vật chủ phân lập chứa vector theo điểm 31.
33. Tế bào vật chủ theo điểm 32, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào côn trùng, tế bào nấm, tế bào thực vật, tế bào vi khuẩn, dòng tế bào động vật, hoặc tế bào động vật chuyển gen.
34. Tế bào vật chủ theo điểm 32, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào *Spodoptera frugiperda*, tế bào *E. coli*, tế bào CHO, tế bào có nguồn gốc từ tế bào CHO, tế bào COS, hoặc tế bào HeLa.
35. Tế bào vật chủ theo điểm 32, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào CHO hoặc tế bào có nguồn gốc từ tế bào CHO.
36. Phương pháp sản xuất protein dung hợp được mã hóa bởi axit nucleic theo điểm 30, bao gồm bước biểu hiện vector theo điểm 31 và phân lập protein dung hợp được biểu hiện.

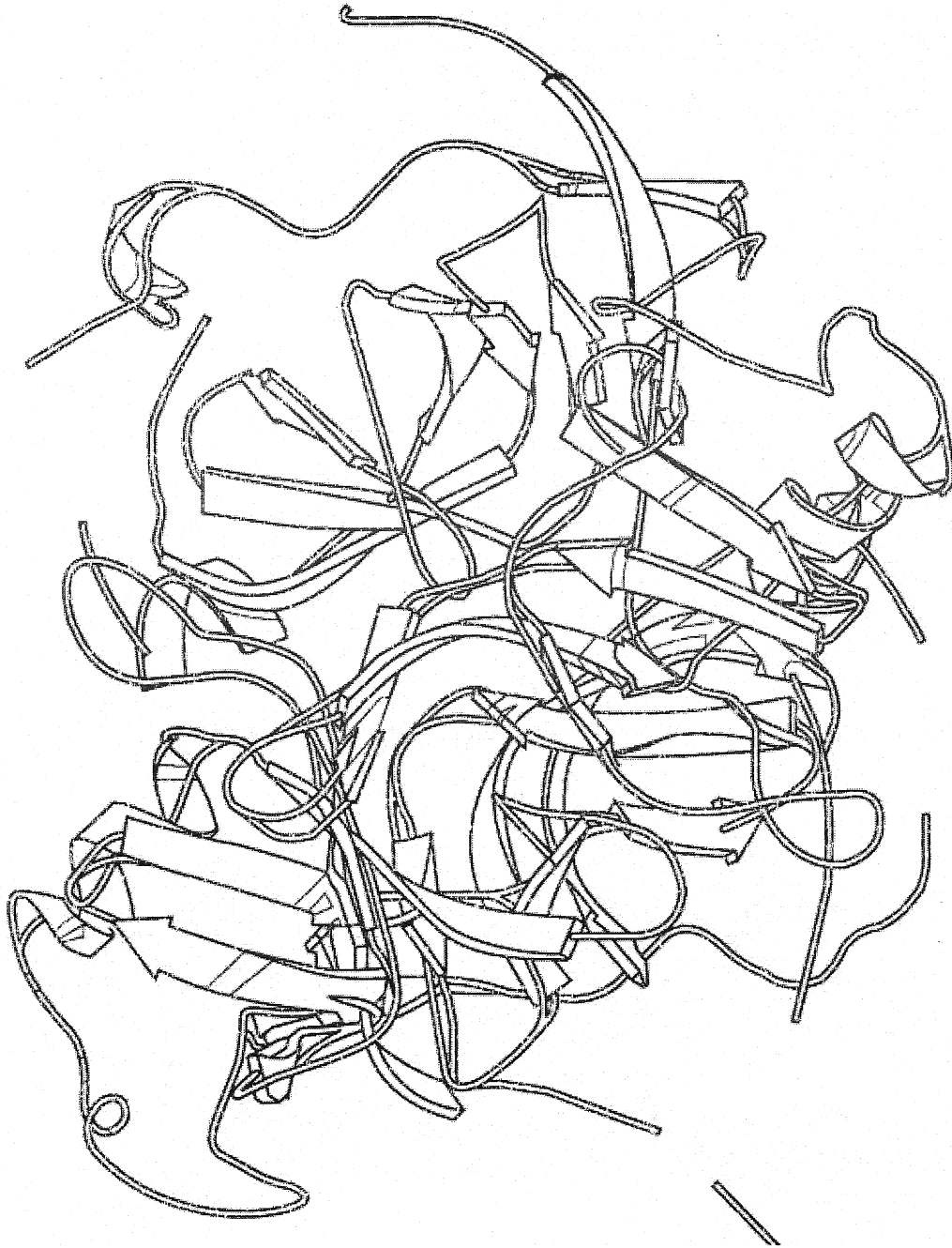


Fig.1

2/52

```

M13-MKKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRIYANYEGCLWNATG 60
Fd- ----- 60
Fl- ----- 60
Con MKKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRIYANYEGCLWNATG

M13-VVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTY 120
Fd- ----- 120
Fl- ----- 120
Con VVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTY

M13-INPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTIVYTGTVTQGTDPV 180
Fd- ----- 180
Fl- ----- 180
Con INPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTIVYTGTVTQGTDPV

M13-KTTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPVNAGGGSG 240
Fd- ----- 240
Fl- ----- 240
Con KTTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPVNAGGGSG

M13-GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYKMANANKGAMTENADENALQS 300
Fd- ----- 300
Fl- ----- 300
Con GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYKMANANKGAMTENADENALQS

M13-DAKGKLDVATDYGAIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFR 360
Fd- ----- 360
Fl- ----- 360
Con DAKGKLDVATDYGAIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFR

M13-QYLP SLPQSVECRPFVFSAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILR 420
Fd- -----Y--G----- 420
Fl- -----G----- 420
Con QYLP SLPQSVECRPX--XAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILR

M13-NKES 424 (SEQ ID NO:1)
Fd- ---- 424 (SEQ ID NO:2)
Fl- ---- 424 (SEQ ID NO:3)
Con NKES (SEQ ID NO:4)

```

Fig.2A

3/52

```

I2-2MKRKIIAISLFLYIPLSNADNWESITKSYYTGAFAMSKTVESKDQDGKTVRKEVITQADLT 60
Ike -----I-----R---P----- 60
Con MKRKIIAISLFLYIPLSNADNWESITKSYYTGAFAMSKTVESKDQDGKXVRKEVITQADLT

I2-2TACNDAKASAQDVFNQMKLTFSGIWPDSQFRLVTGDTVCVYNGSPSEKTESWSIRAQVEGD 120
Ike -----N---I---L---T-N-----G----- 120
Con TACNDAKASAQXVFNQXKLTXSGXWXSQFRLVTGDTVCVYNGSPXEKTESWSIRAQVEGD

I2-2MQRSVPDEEPSEQTPPEEICEAKPPIDGVFNNVSKGDEGGFYINYNGCEYEATGVTVCQND 180
Ike I-----F----- 180
Con XQRSVPDEEPSEQTPPEEICEAKPPIDGVFNNVXKGDGEGFYINYNGCEYEATGVTVCQND

I2-2GTVCASSAWKPTGYVPESGESSSSPVKDGDTGGTGEGGSDTGGDTGGGDTGGGSTGGDTG 240
Ike ----S-----P---L----- 240
Con GTVCXSSAWKPTGYVPESGEXSSSPXKDGDTGGTGEGGSDTGGDTGGGDTGGGSTGGDTG

I2-2GSTGGGSTGGGSTGGSTGKSLTKEDVTAAIHDASPSIGDAVKDSLTEDNDQNDNQKKADE 300
Ike --S---S-----V-----Y----- 300
Con GSXGGGSXGGGSXGGSTGKSLTKEDVTAAIHXASPSIGDAVKDSLTEDNDQXDNQKKADE

I2-2QSAKASASVSDAISDGMRGVGNFVDDLGGESSQYGIGNSEMDLSVSLAKGQLGIDLEGHG 360
Ike -----F-----T-----R--- 360
Con QSAKASASVSDAISDGMRGVGNFVDDXGGESSQYGXGNSEMDLSVSLAKGQLGIDXEGHG

I2-2SAWESFLNDGALRPSIPSGHGCTDFVMFQGSVYQLDIGCDKLGDIKSVLSWVMYCLTFWY 420
Ike -----T-----N---Y-----IE-----NDIKSVLSWVMYCLTFWY 420
Con SAWESFLNDGALRPSIPXGHGCTXFVMXQGSVYQXXIGCDKLXDIKSVLSWVMYCLTFWY

I2-2VFQSATSLLRKGEQ 434 (SEQ ID NO:5)
Ike ----V----- 434 (SEQ ID NO:6)
Con VFQSXTSLLRKGEQ (SEQ ID NO:7)

```

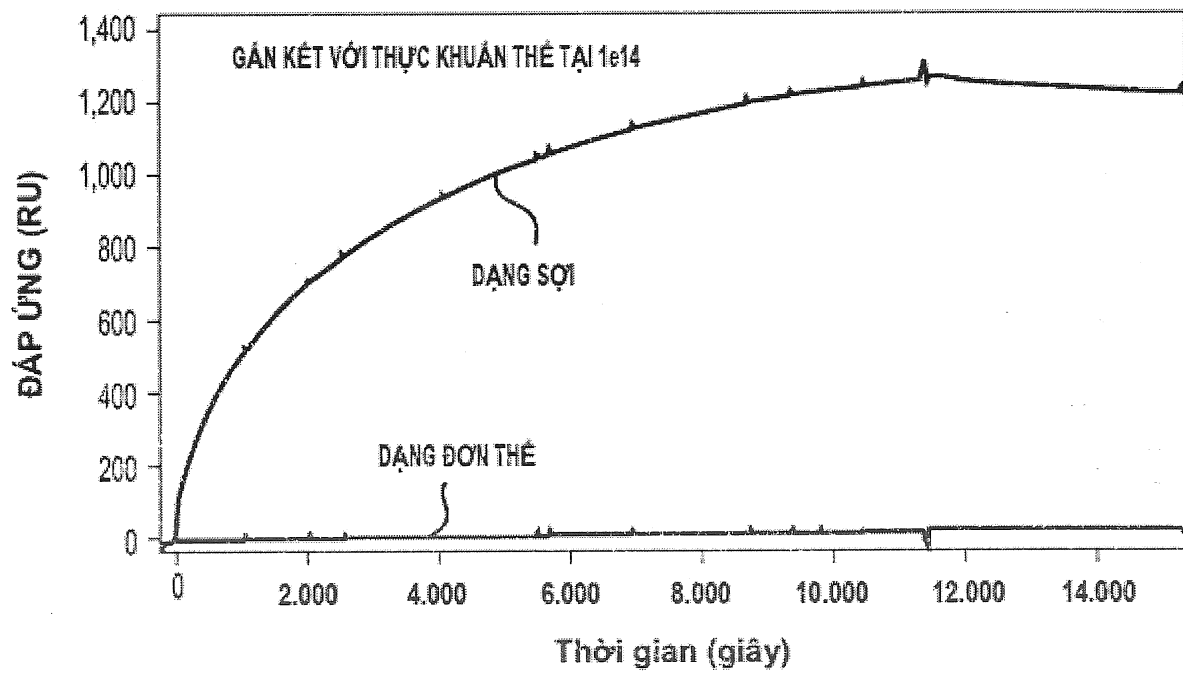
Fig.2B

4/52

MKKIIIALFFAPFFTHATDAECLSKPAFDGTLNWNKEGDSRYANFENCIYELSGIGIG 60
YDNDTSCNGHWTPVRAADGSGNGGDDNSSGGGSNGDSGNNSTPDTVTPGQTVNLPSDLST 120
LSIPANVVKSDSIGSQFSLYTNASCTMCSGYLSNNADSLAIANITETVKADYNQPDMMF 180
EQTDSDGNHVKILQNSYKAVSYNVEKQSDVNNPTYINYSYSVNVKQVSYDTSNVCIMNW 240
ETFQNKCDASRAVLITDTVTPSYSRNITIQSNINYQGSNGSGSGSGSGSGNDGGGTGN 300
GNGTGDEFDYVKMANANKDALTESFDLSALQADTGASLDGSVQGTLDLSLGFSDSIGGLVG 360
NGSAISGEFAGSSAAMNAIGEGDKSPLLDLSLFLKDGLFPALPEFKQCTPFVFAPGKEYE 420
FIIECKYIDMFKGIFAFILYFWTFVTVYDSFSGILREGRG (SEQ ID NO:8) 460

Fig.2C

5/52

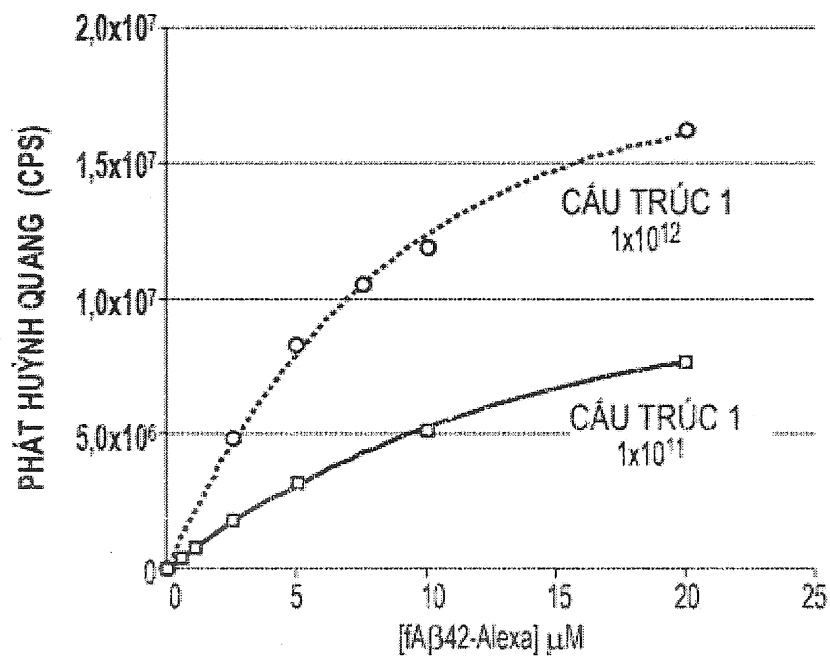
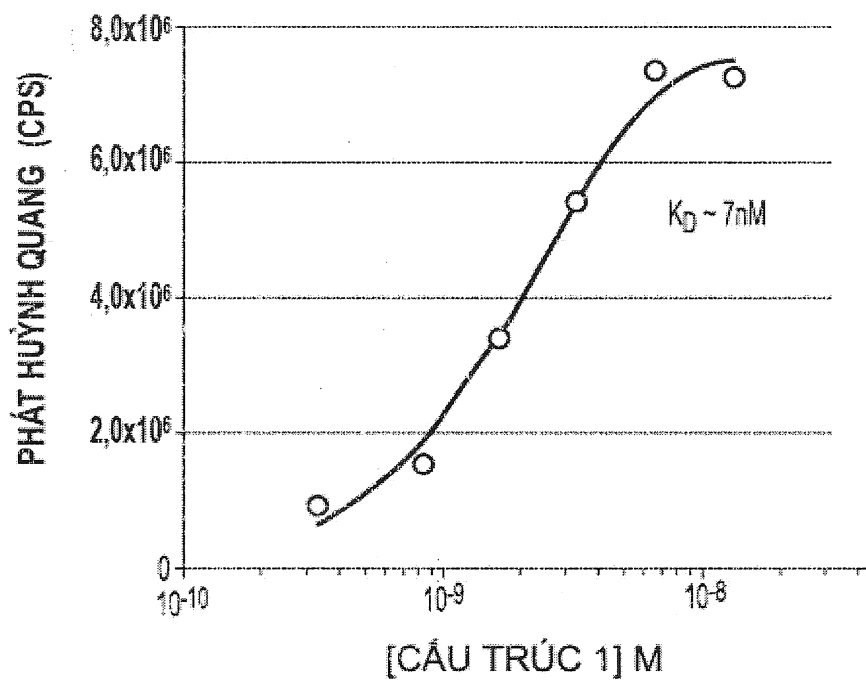
**Fig.3A**

THÔNG SỐ	TRỊ SỐ
K_a	2572 (6)
K_d	9,234E-6
K_D	3,589 (8) nM

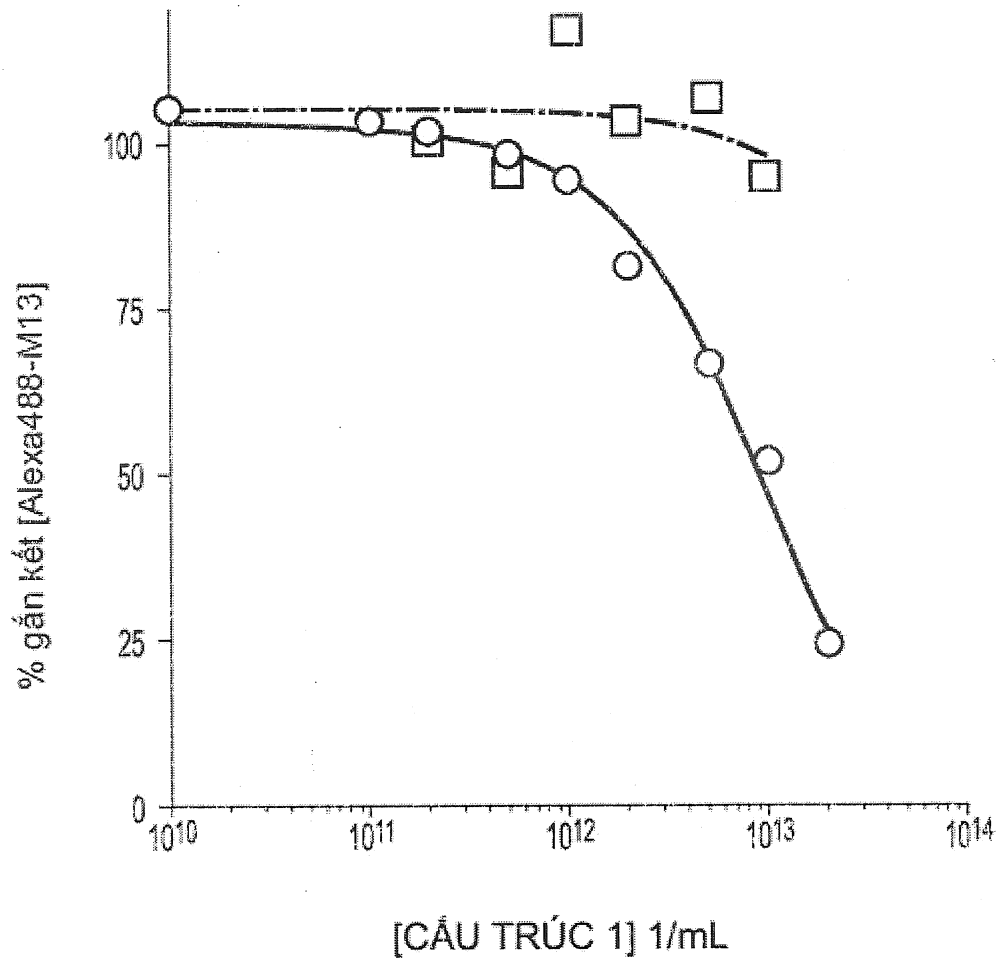
Fig.3B

6/52

GẮN KẾT PHỤ THUỘC VÀO NỒNG ĐỘ

**Fig.4A**GẮN KẾT K_D ~SPRK_D**Fig.4B**

7/52

**Fig.5**

8/52

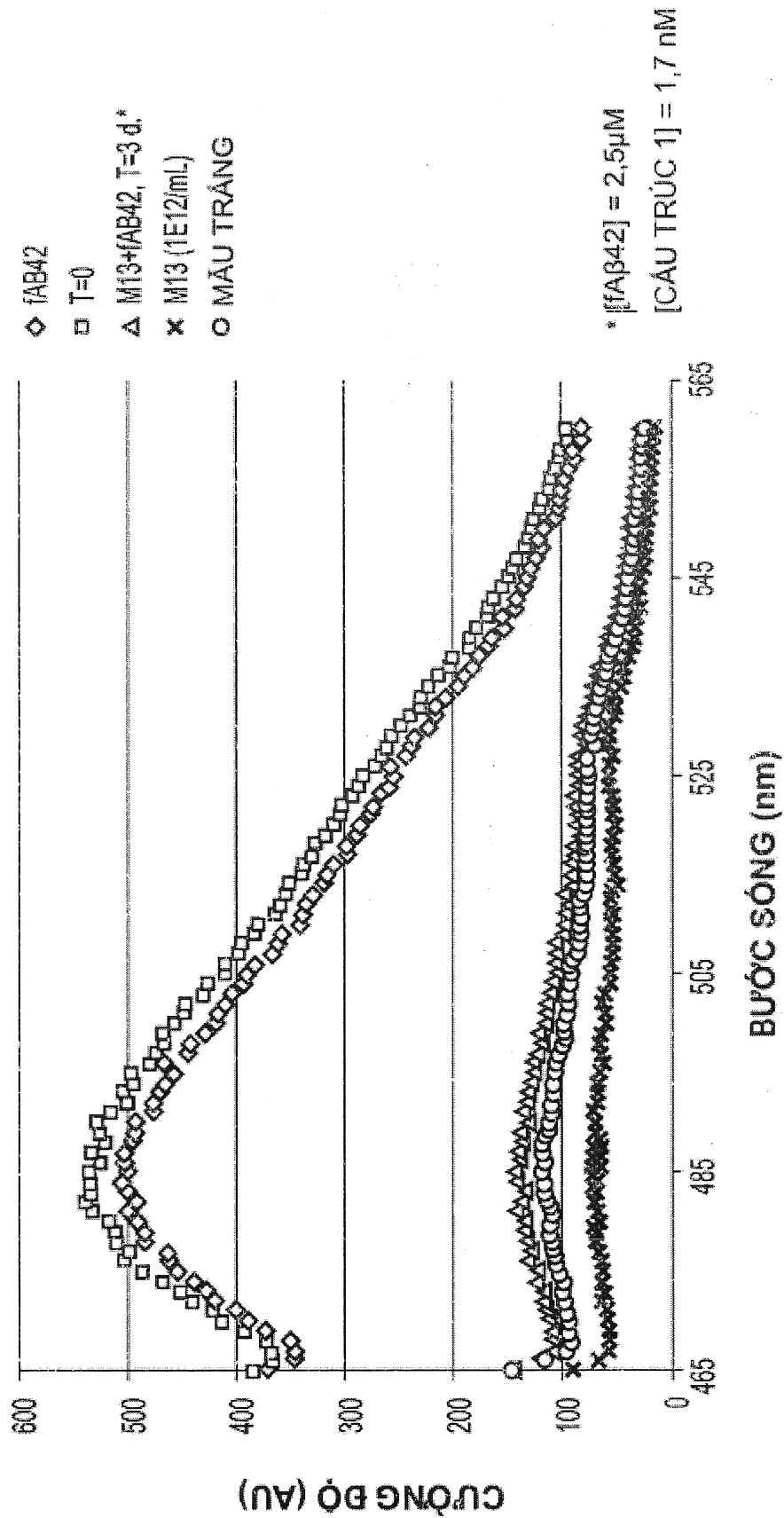


Fig.6

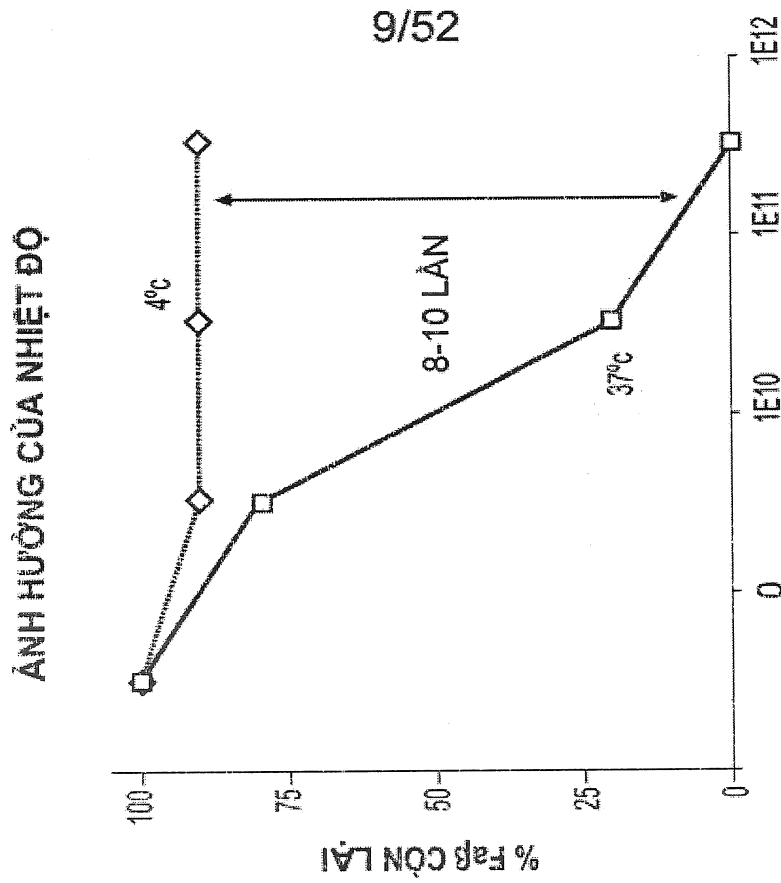


Fig.7B

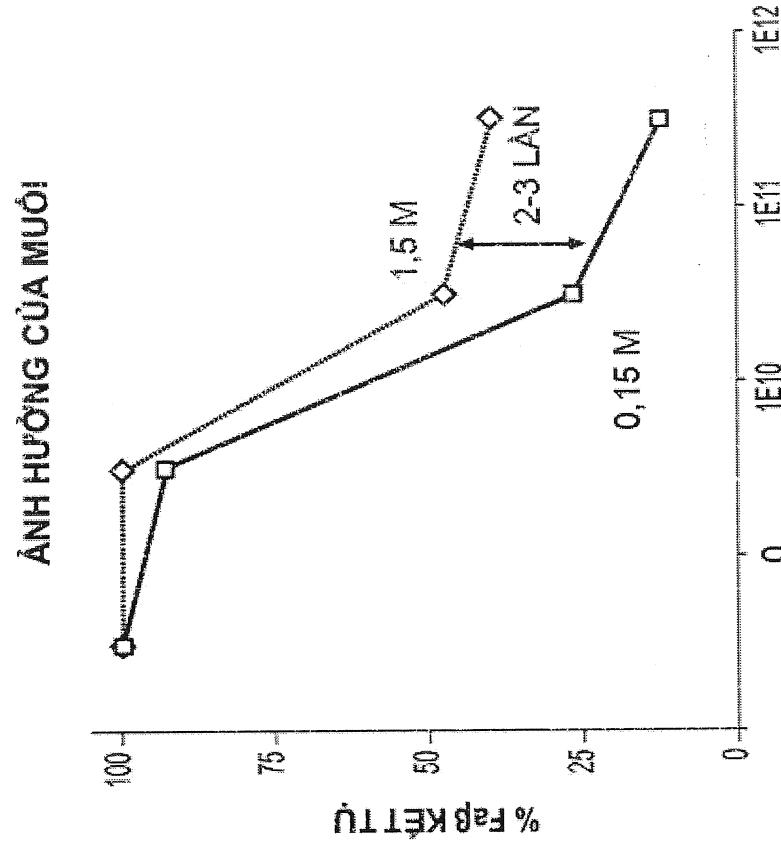
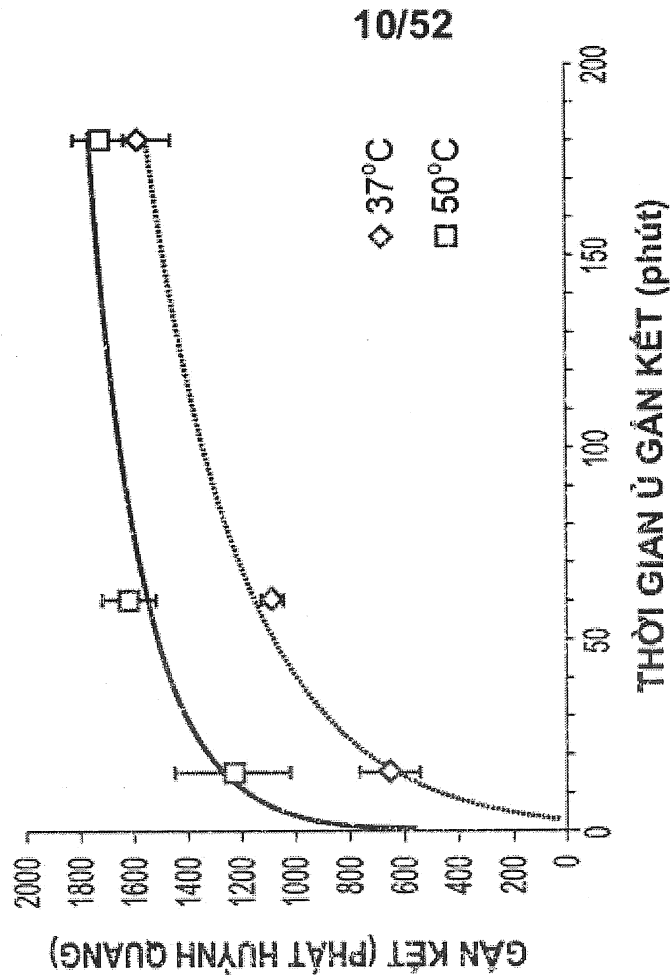
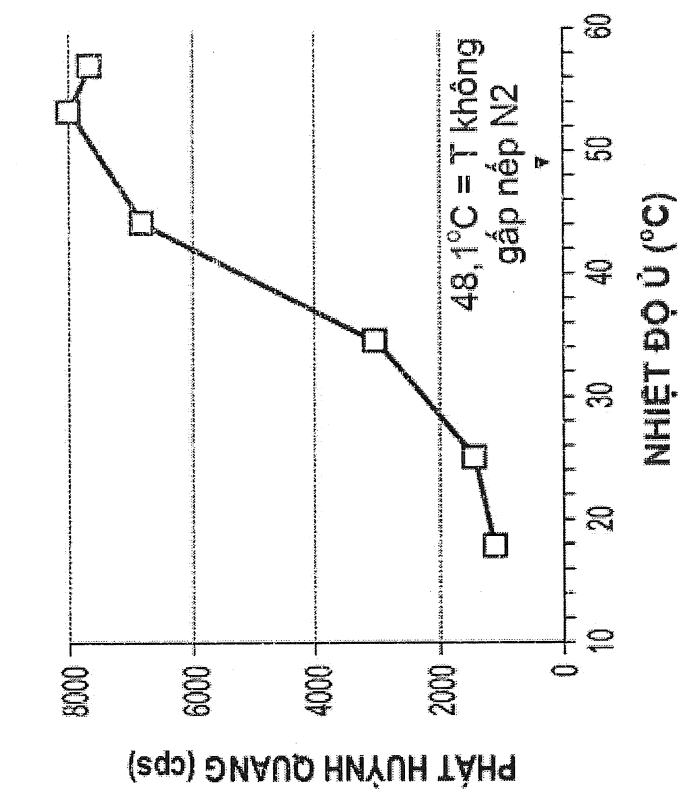


Fig.7A



11/52

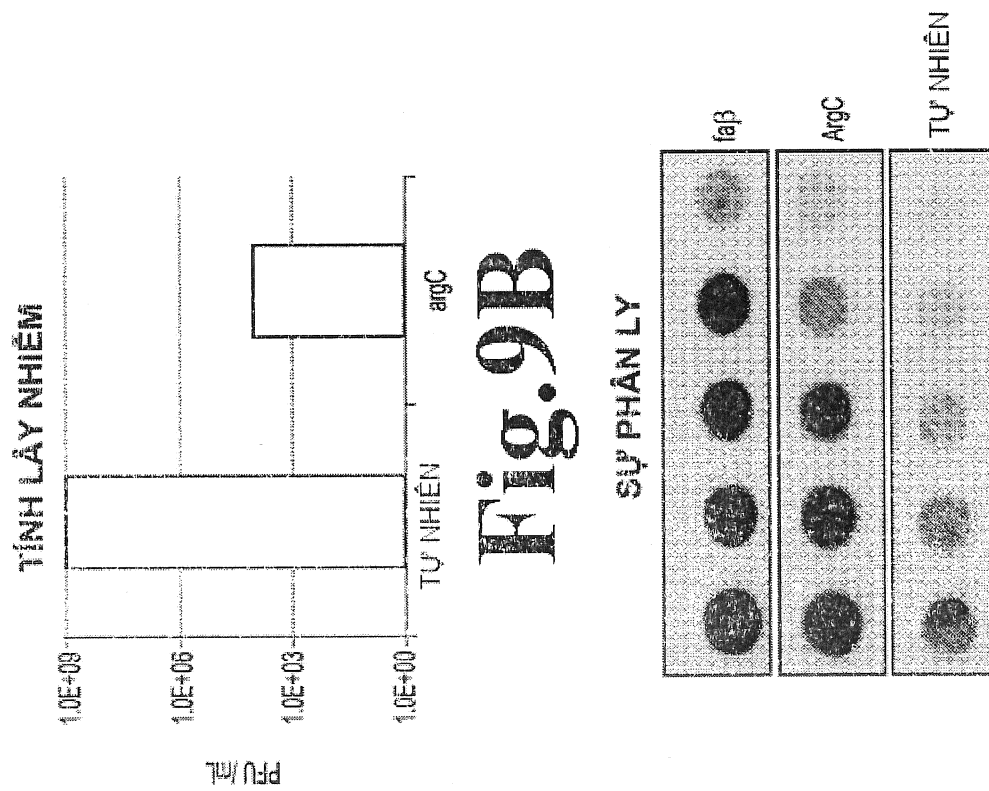
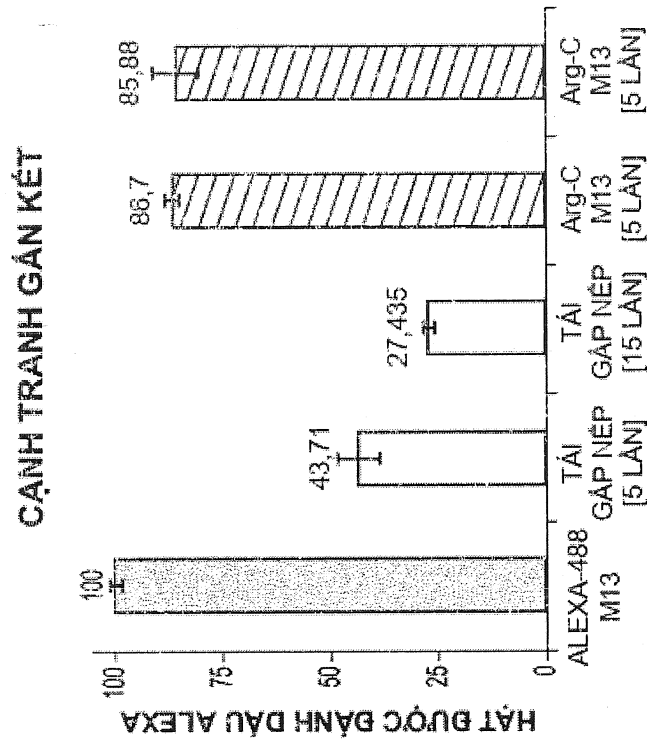


Fig.9C



12/52

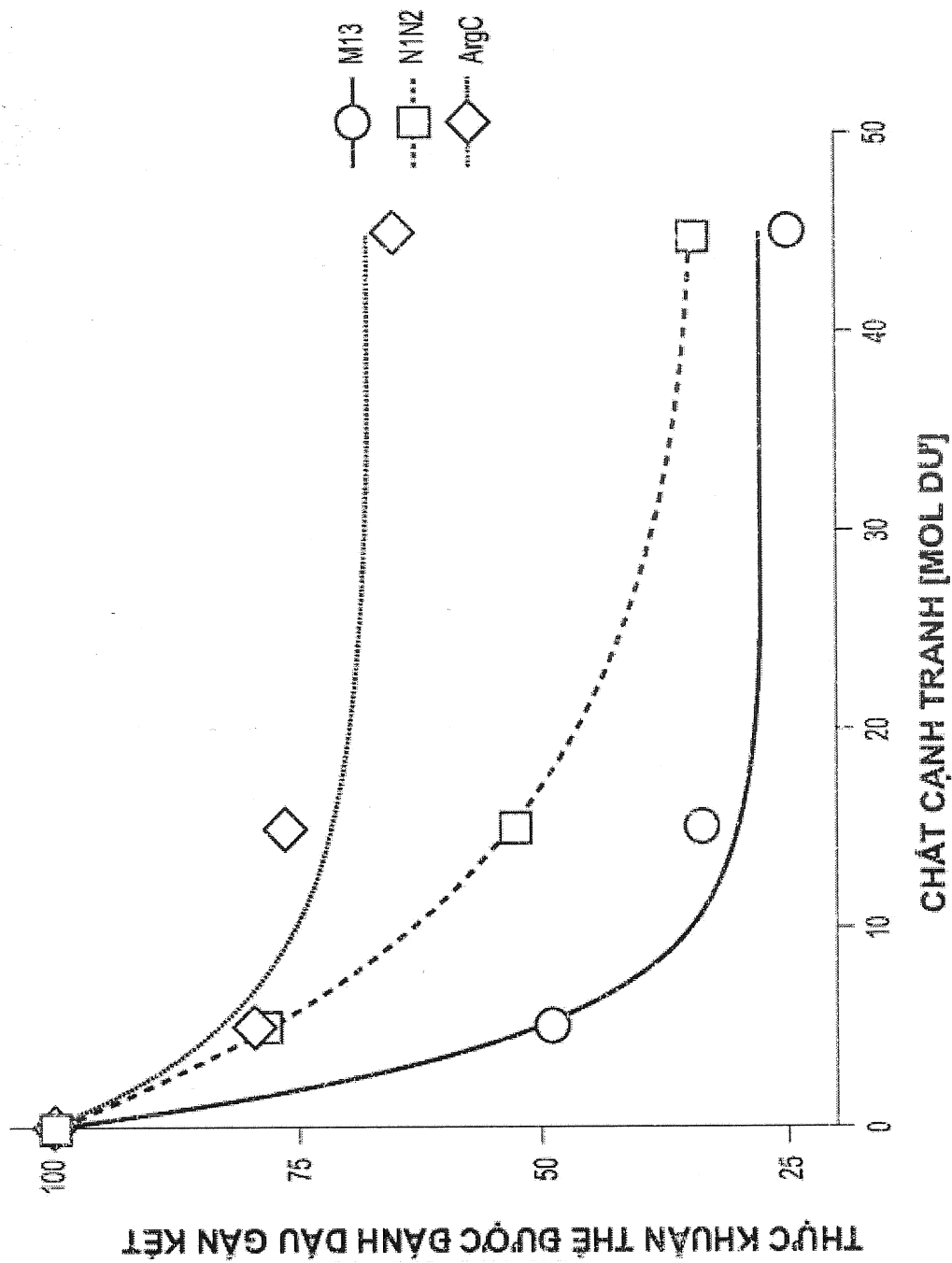
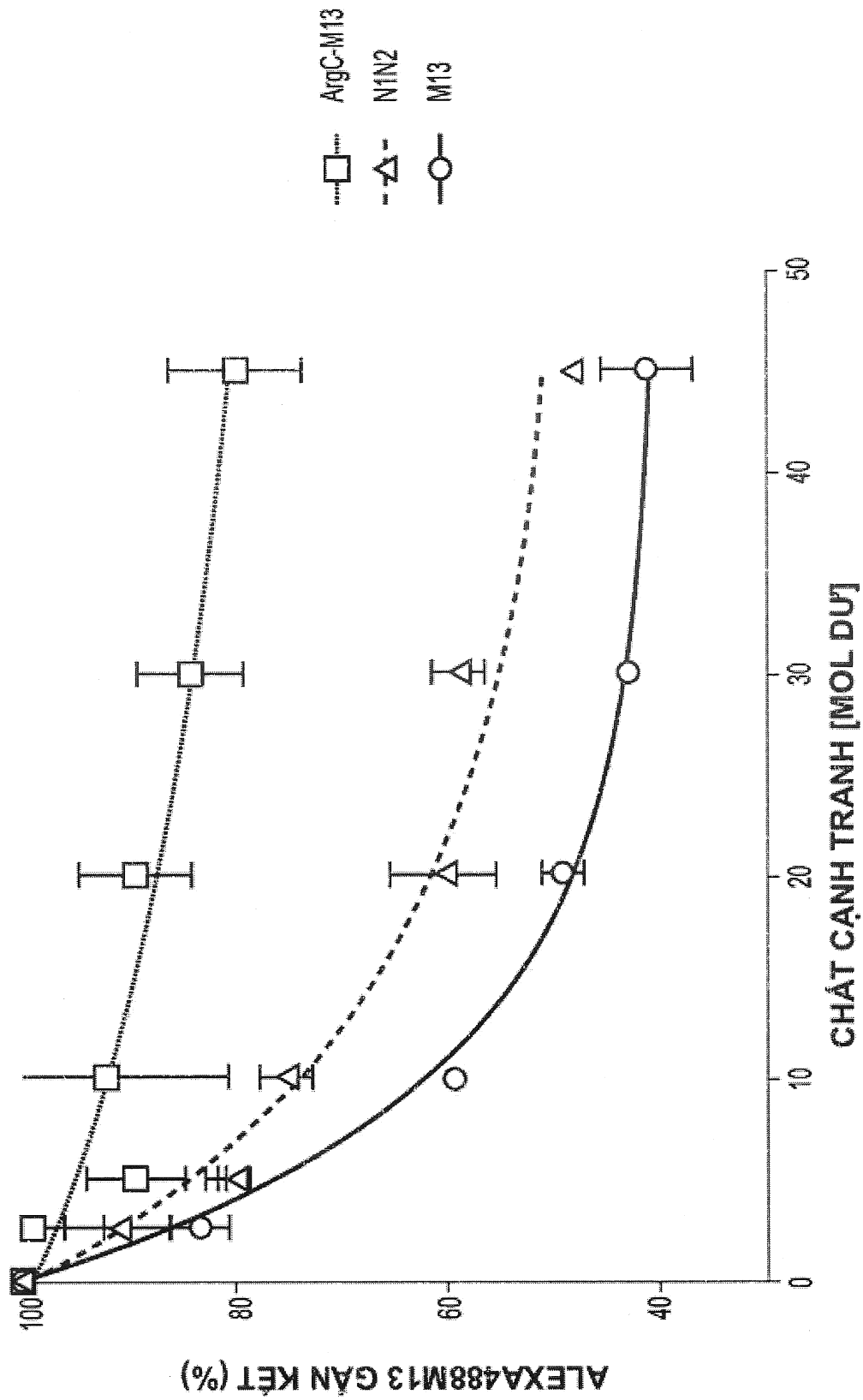


Fig.10A

13/52

**Fig.10B**

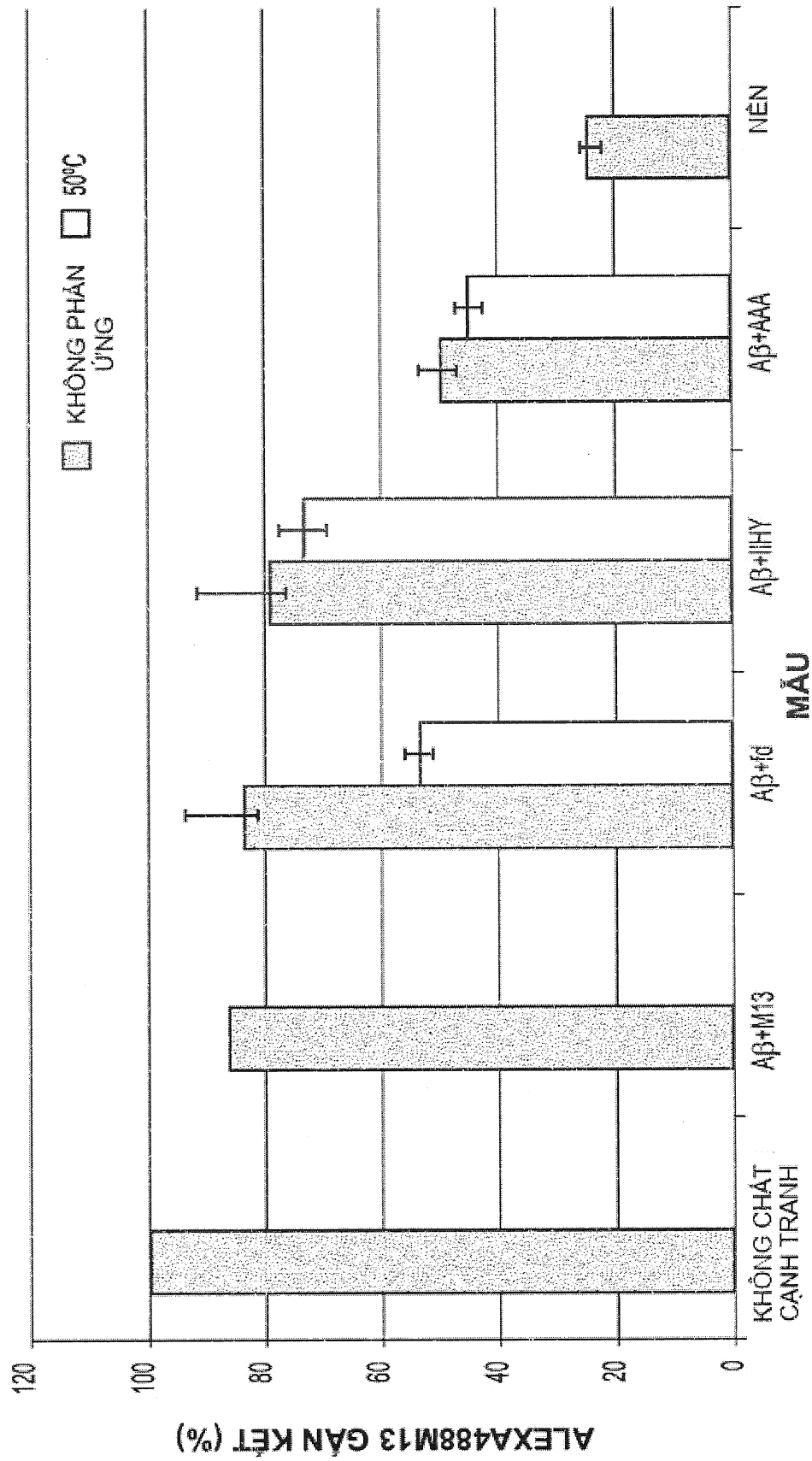


Fig.11

15/52

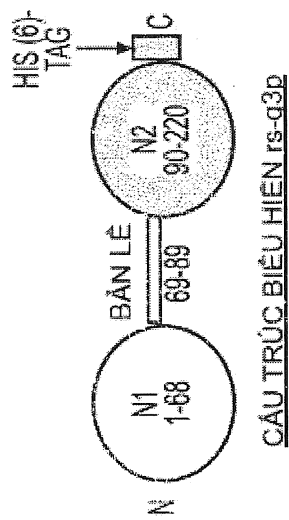


Fig.12A

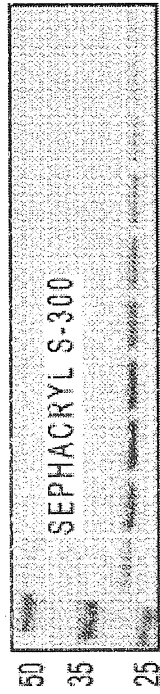


Fig.12C

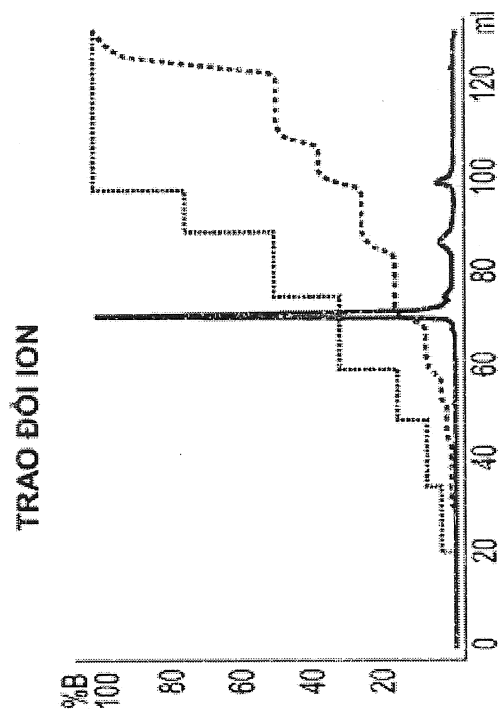


Fig.12B

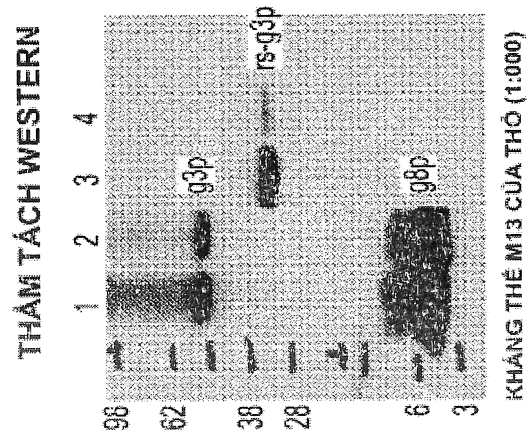
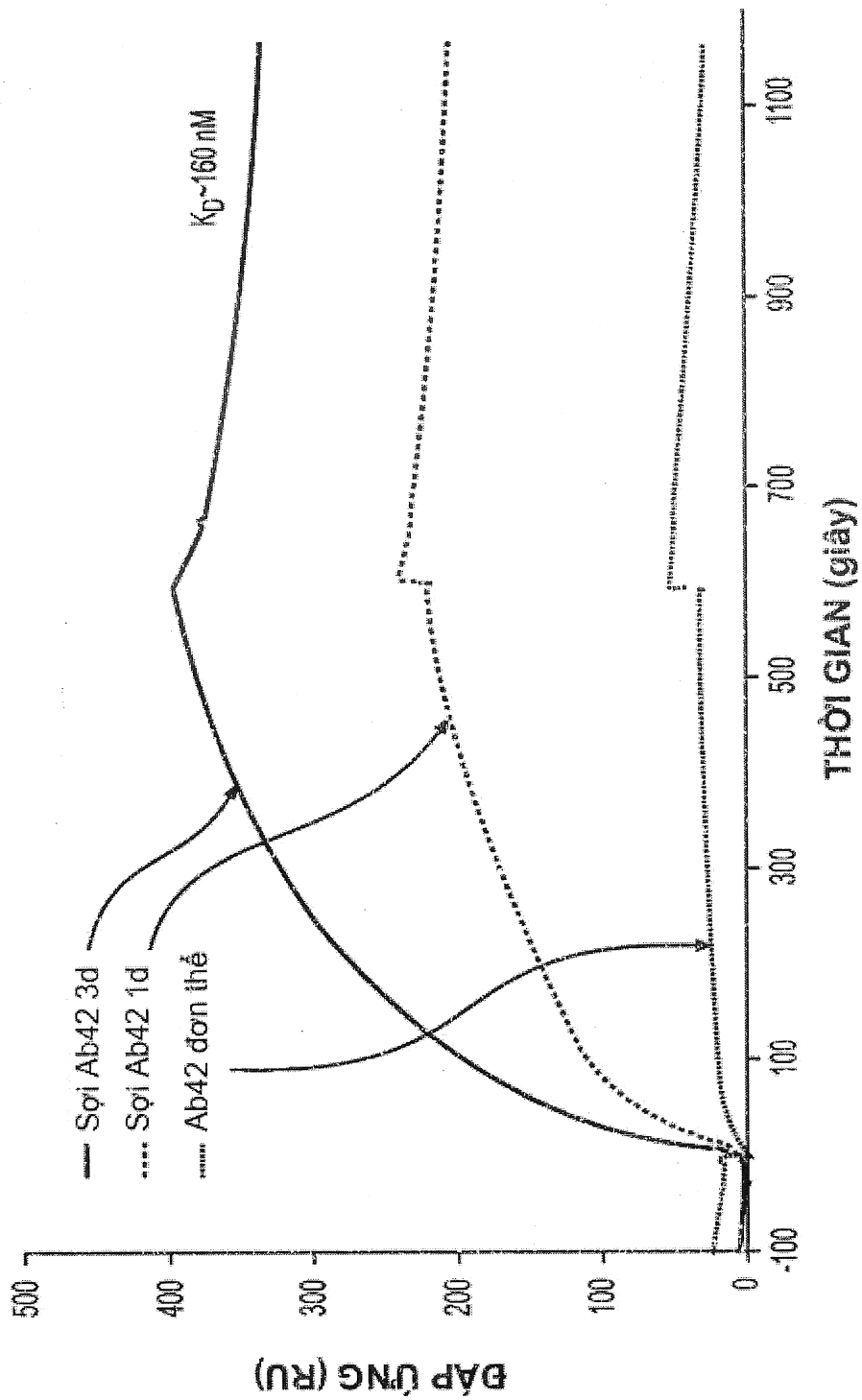


Fig.12D

**Fig.13**

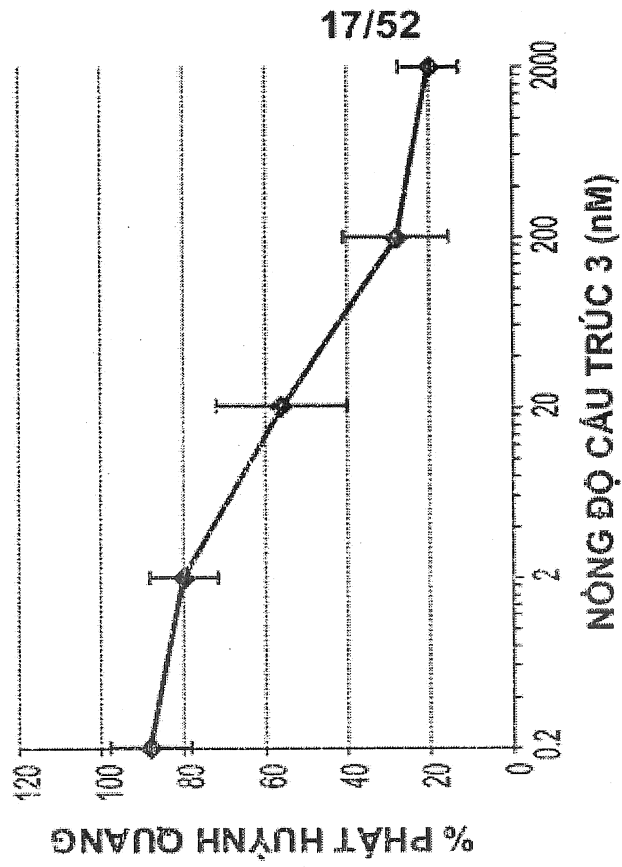


Fig.14B

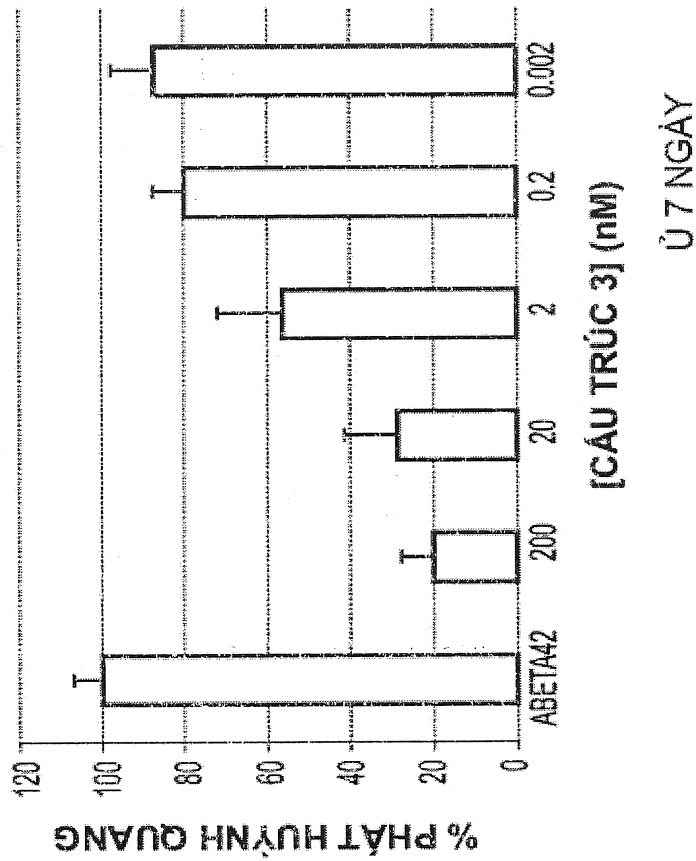
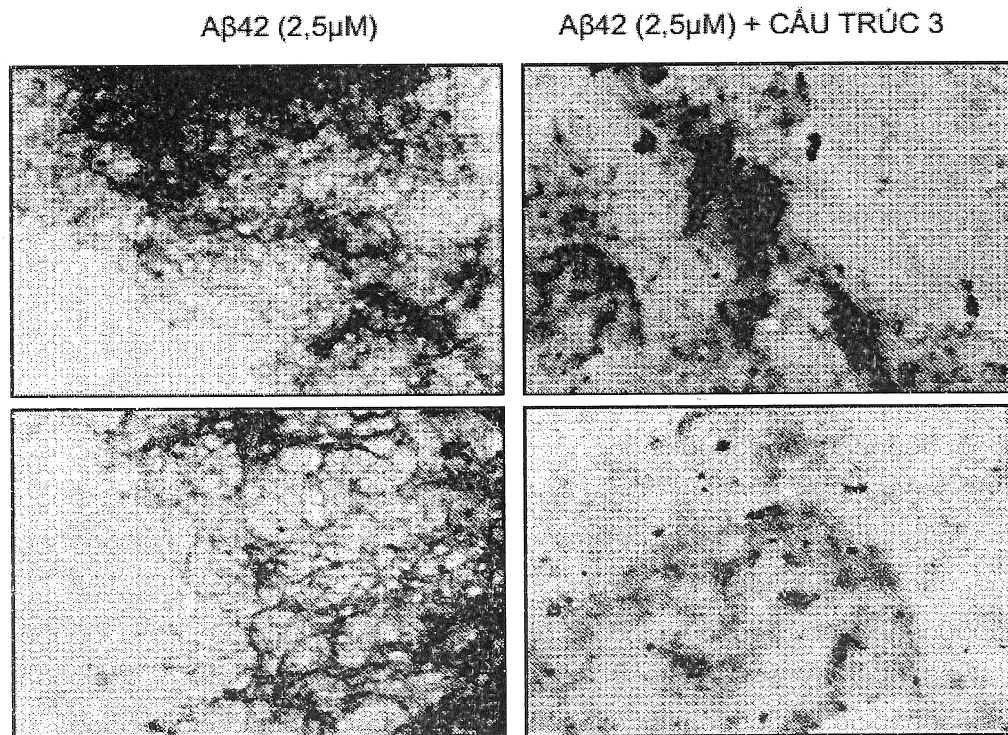
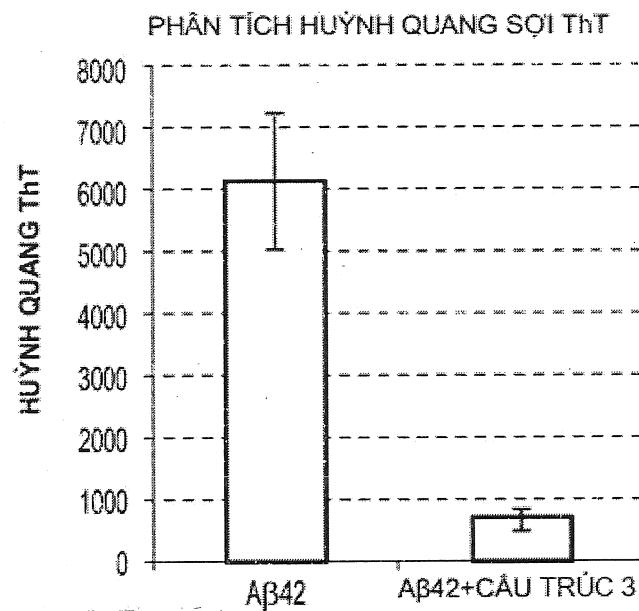


Fig.14A

18/52

**Fig.15A****Fig.15B**

19/52

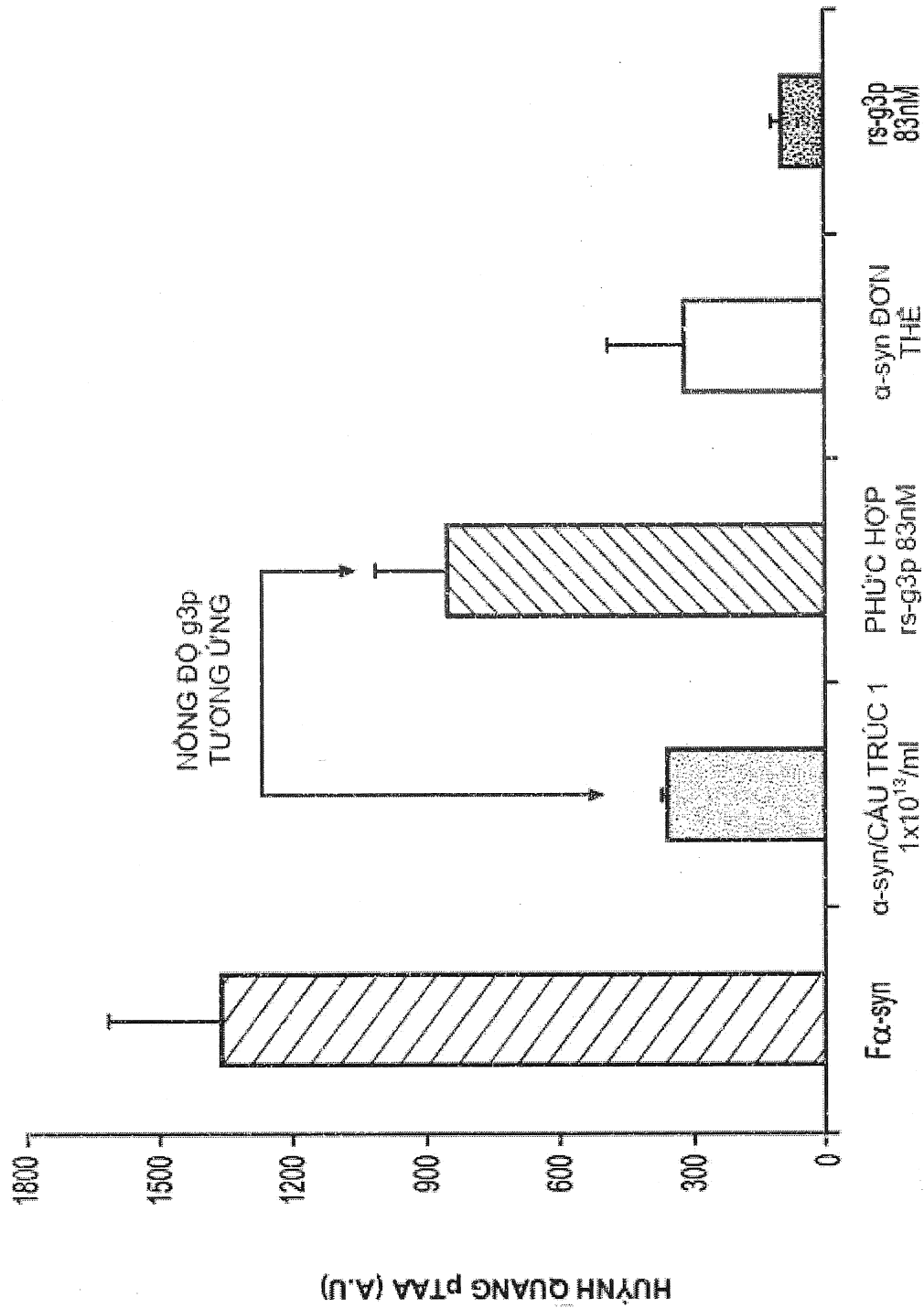
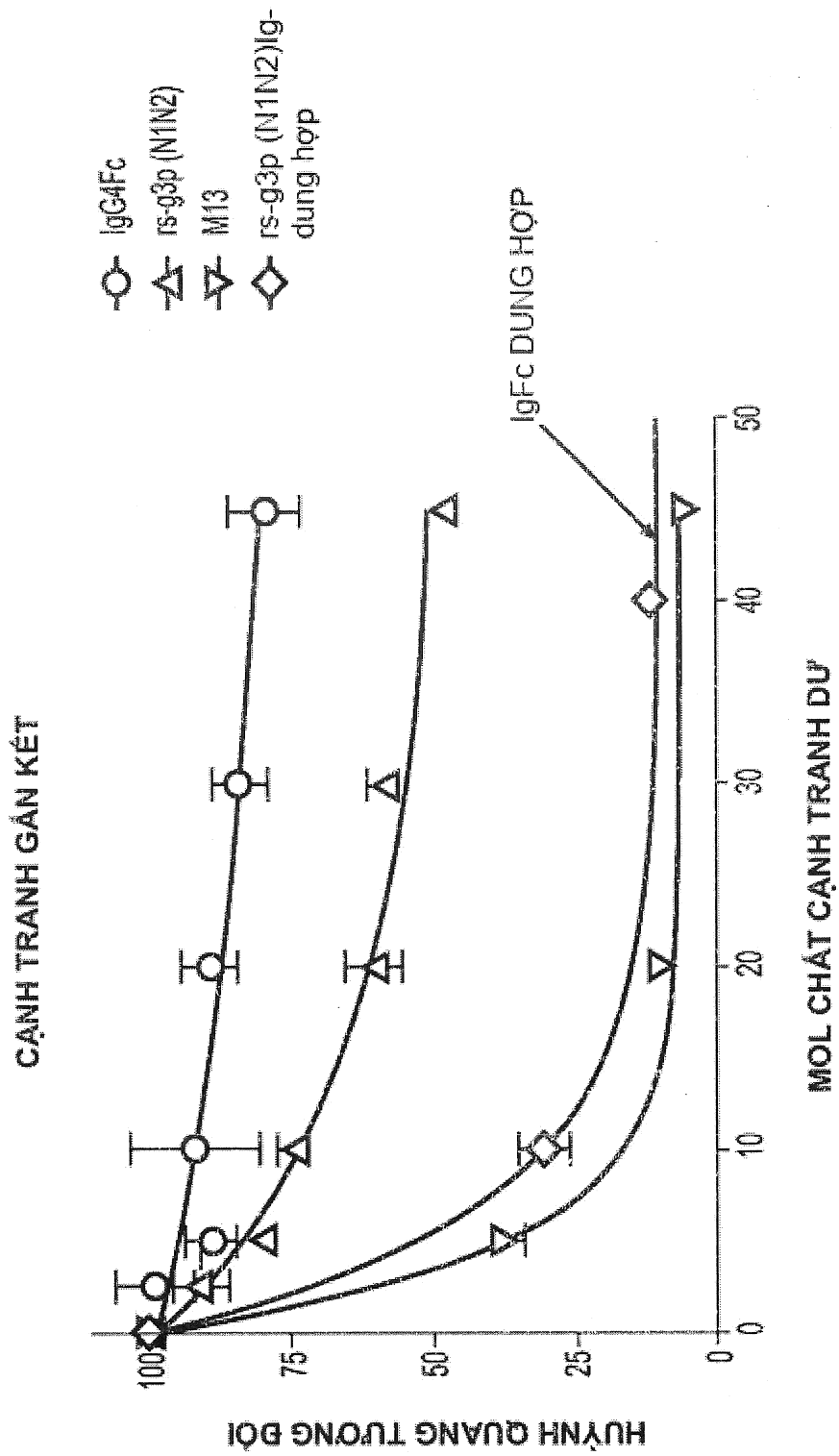
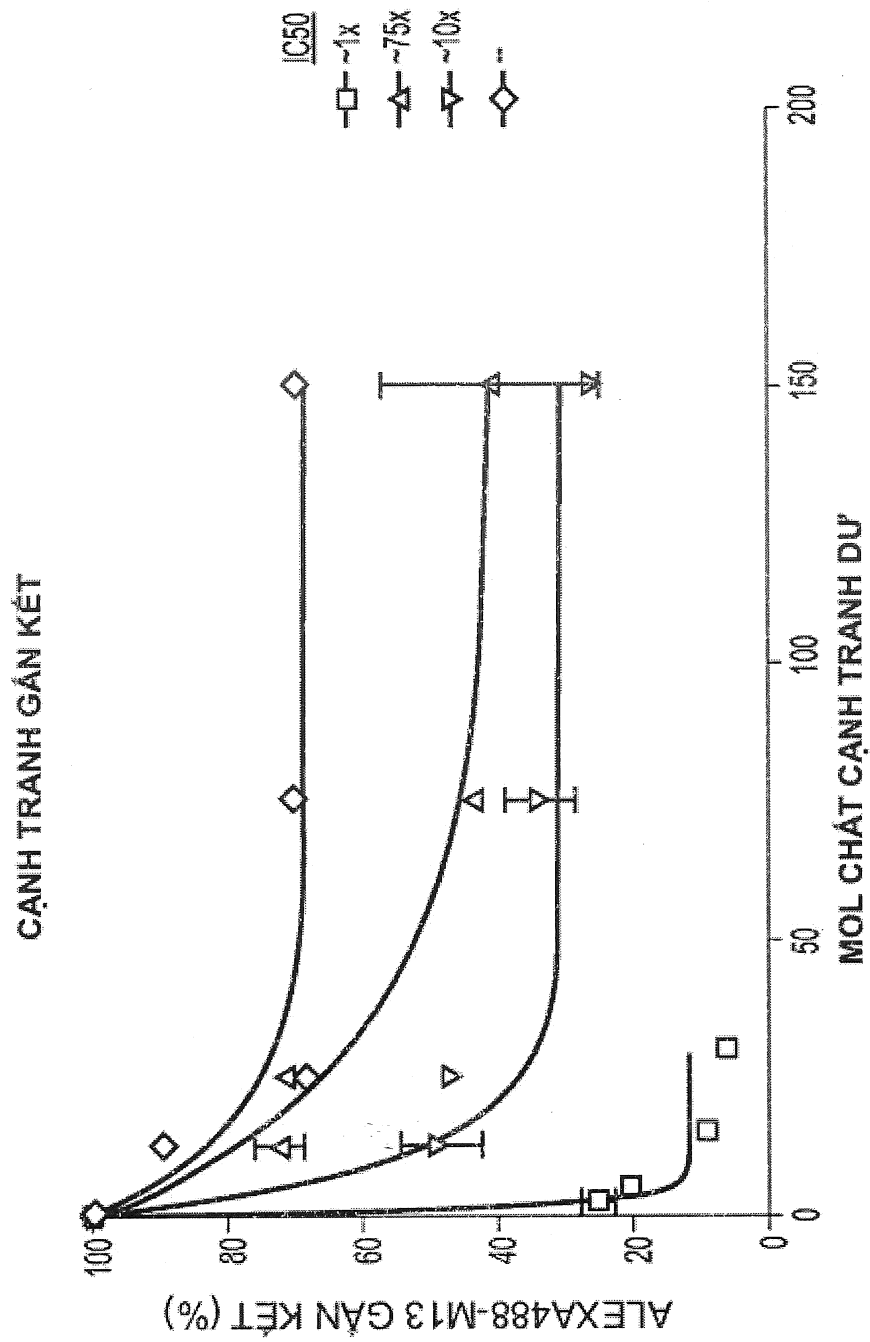


Fig.16

20/52

**Fig.17**

21/52

**Fig.18**

22/52

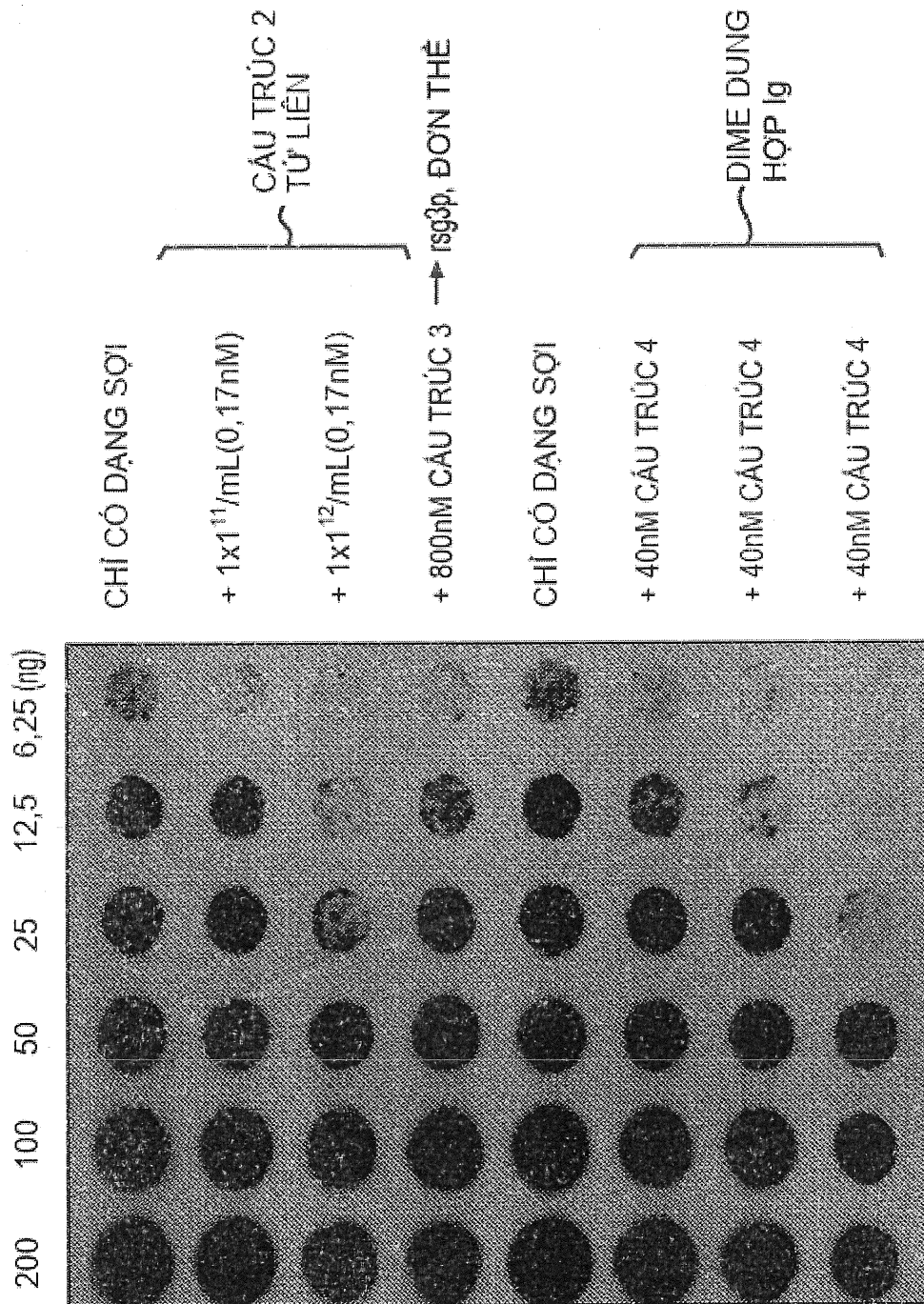


Fig.19

23/52

PHÂN TÍCH GẮN KẾT CẠNH TRANH

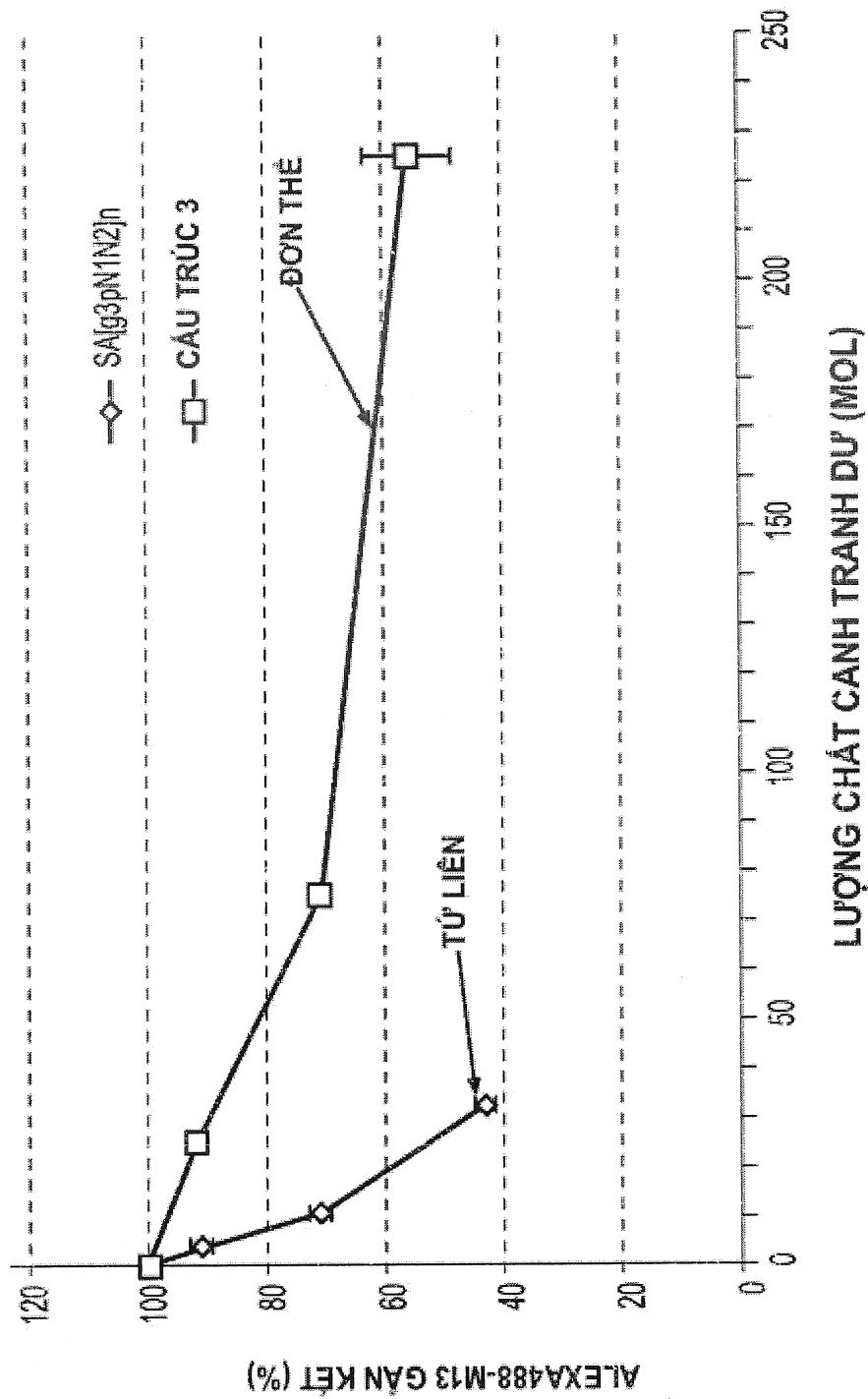


Fig.20

24/52

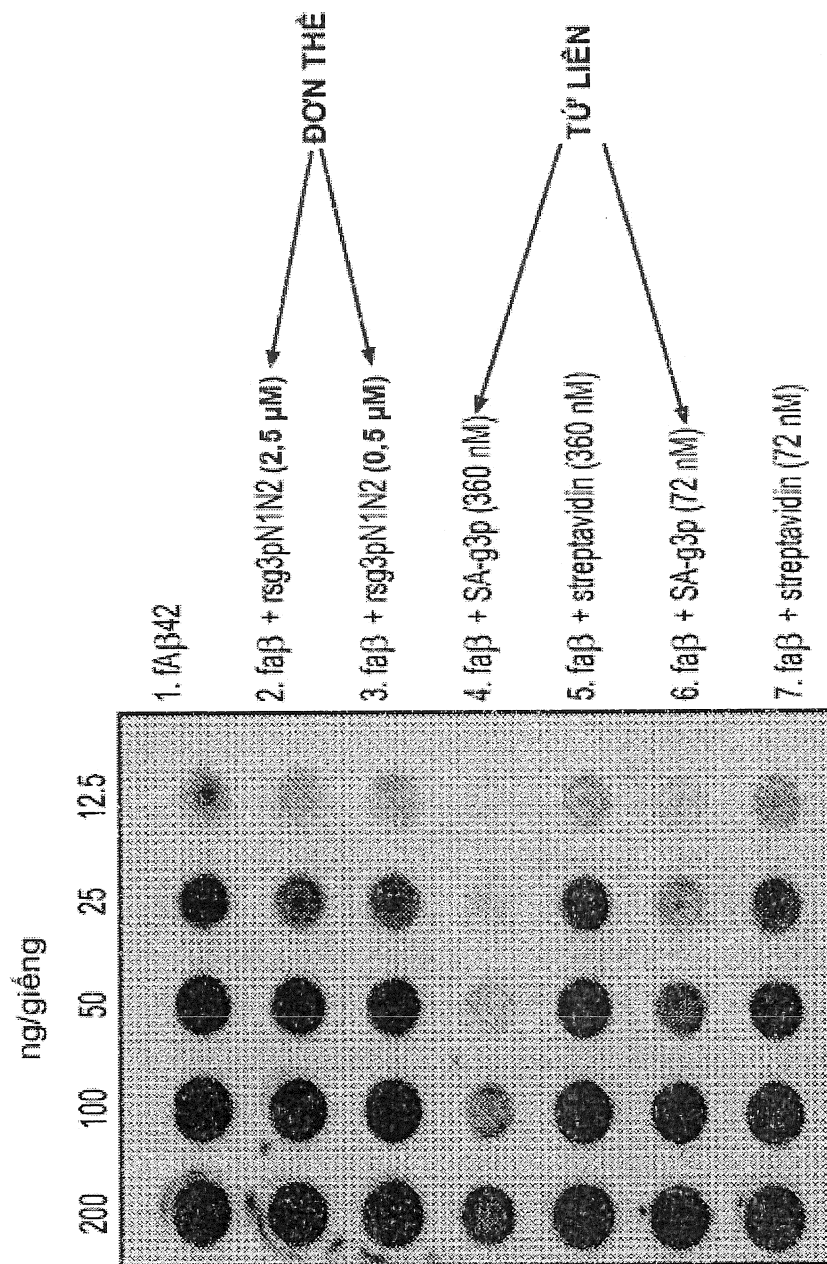
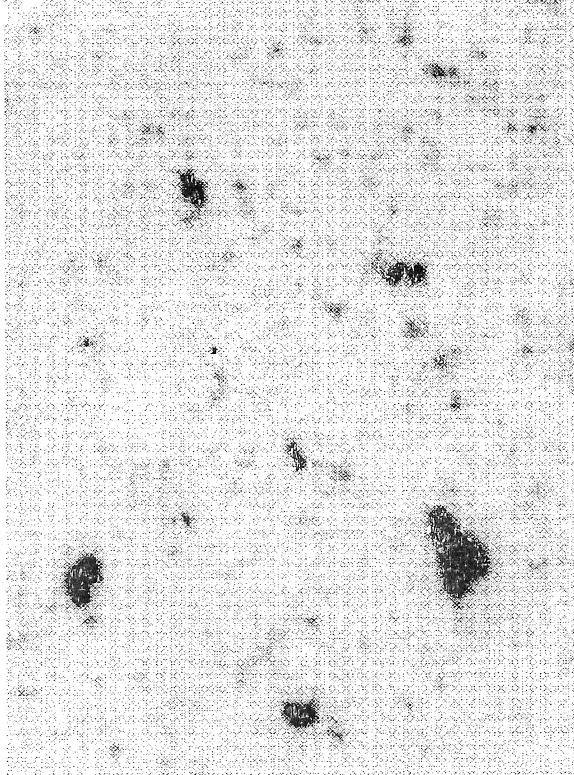


Fig.21

25/52

 $t=3$ ngày**Fig.22B** $t=0$ **Fig.22A**

26/52

N T T T P T N G C D R S Y R P
 E E G N G F E S V Y I F S S
 T D G P Q G S P V T T G Y L
 H G G N T S G C V S K K L S
 P T E A V H G P C N E V F L
 K C S P T F G P T F I L L E S
 A V G N G A S S V Q S C S K
 L V G Q T C G R E E S T G Q
 C V G E Y D G V P E P L D T
 S G E T V R G M T R L S S Y
 E T S G T F S A R P G V D H
 V A G P L K G G S K K Q L N
 T N G P A G G S I T N N V H
 E W G Y G N G G M K S K P L
 A L E T Q W A S L A V T P A
 M C S G R Y N G T N K M T E
 S G G D N A V G D H C E T H
 N E G L L R D P G K V K E K M
 T Y G P F Y P S P E Y Q Y V
 V N E N R M Q G K V E S N S
 L A N I N A P G P G K P N C
 A Y E Y N K L G P D G P E S
 L R P T Q S D E E V N L P E
 S D I Y F S S S L Y L T Q V
 L L A G M V S G F W W Y G N
 A T L P F P Q G V N D V N G
 I K G I T T G G S F Q Q S E
 C D I P N Y Q E P Q H P E Q
 S D P T L Q Y S G V L E W W
 L K V D P Y E G G E V R E R
 L W W G Q Y C G L P T P V S
 Q V T Y S T V G F D L Q A K
 M N G E F K F E E V G I D
 R T Y P E V P S P Q S K D V
 Y E C P L P D G A S V A S T K
 M S Q K S D E G P V V K P L G

(SEQ ID NO:9)

Fig. 23

27/52

Y Y G G N G S P S Y S
 D R G G I N G G X N V D S
 L D G G P W G G P F Q Q I
 L E G Q Y G P P Q P V
 T S S A E F F E P P K
 K G G E D S L E E P P G
 D G G E Y G F R P P T P G
 D G G L M G G V P Q T S P
 K E S A G G S T K G X L S
 W S S P K S G G T K K Y S
 V G G N S G G X K A N N L S
 T N G G P S G G A K N N S
 F E G A N V G G L N S E K S
 S E N P A P S F H I P Q
 N E N P T G G E V T Q T
 T E P Q Q Y G G P E K G Y
 H I P Q Q Y A G P E N H
 P L A E Y Y A P G I S N H
 K P L G T Y N C D S E H H
 L A G P P V P P C W L P E A
 C L P P Y P P Q P F N G L A H H
 S C V V T D P P F N K I M H
 E S W G T D G L S Q N D M V
 V E T D G L S Q N D M V
 T Y G L Q S S V E V S P S C
 A E C N F Q G A D C K Y F S
 A Q Q I T G G G E K G V V
 M E T Y T G Q S Q Y K N
 N S D Y Y E G S V K L E G
 T G G V C G G D V K L E G
 L V T P V G G V N T W Q
 L C P I L F G G V L L R R
 A L V P P A P S V W S S
 L V V T G G G C D V S S
 S L G V D Q G G T Q V D K
 L G V R N G G V H N V
 A T Y N R F S E V L K T
 C I A Y N R F S E V L K T
 S C I A Y N R F S E V L K T
 L L W N P F S G T T M R
 L L K N R H G G T T M R
 Q C L K N F G G T T M R
 M G G T N A E I S V E E Y S
 Y E G G Q C A E I S V E E Y S
 A N E G G Q C A E I S V E E Y S
 S E M F D C A E I S V E E Y S
 T F R G G S E I S V E E Y S
 K E R G G S E I S V E E Y S
 T Y R V V S Q E E Y S
 T L P P S Q E E Y S
 D C S F F L Y S
 SEQ ID NO:11)

Fig.24

28/52

MYRMQLLSCLIALSLALVLTNSMAETVESCCLAKPHTEENSEFTNVWKKDDKTL
 DRYANYEGCLWNATGVVCTGTQCYGTVVPIGLAIPENEGGSEGG
 GSEGGSEGGGCKPPEYGGDTPIPGYTYINPLDGTYPPTGTEQNPNPNP
 SLEESQPLNTFMFNKFRDCAFHSGFNEDEPFVCEYQGGSSDLPPPVNAGG
 SSKAMYDAYWNGKFGGSEGGSEGGSEGGSGSGAMVRSDDKTHTC
 GSGGSGGSELGGLGVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 PPCPAPELLGGLGVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 FNNWYVDGVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYVTLPPSRFEEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVPEWESNCGQPEPNNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLLTVDKSRWQ
 QGNVFSQCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)

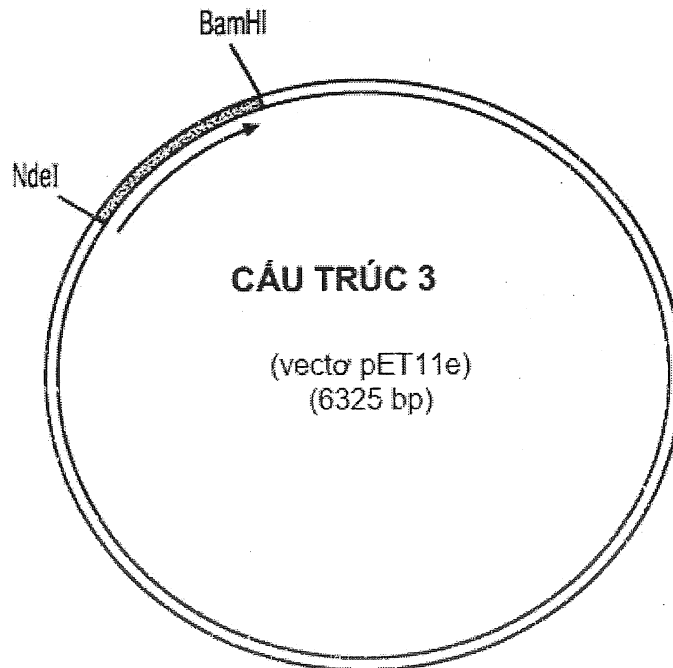
Fig. 25

29/52

fd	TKPEYGDTPIPGYIYNPLDGYPPGTEQNPN	
f1	TKPEYGDTPIPGYIYNPLDGYPPGTEQNPN	
M13	TKPEYGDTPIPGYIYNPLDGYPPGTEQNPN	
Ike	S-PGEKTESWSIRAQVEGDIQRSVPD--EEPSEQ	
I2-2	S-PSEKTESWSIRAQVEGDMQRSVPD--EEPSEQ	
If1	STPDVTTPGQTVNLPSDLSTLSIPANVVKSDSIG	
	;	*
fd	PNPSLEE-----SQPLNTEMFQNNRFRNRQGALTIVYTGVTQGTDPVKTY	
f1	PNPSLEE-----SQPLNTEMFQNNRFRNRQGALTIVYTGVTQGTDPVKTY	
M13	PNPSLEE-----SQPLNTEMFQNNRFRNRQGALTIVYTGVTQGTDPVKTY	
Ike	TPEELCE-----AKPPIDGVFNVFKGDEGGFYINNGCEYEATGVTVCQ	
I2-2	TPEELCE-----AKPPIDGVFNVSKGDEGGFYINNGCEYEATGVTVCQ	
If1	SQFSLYTNASCTMCSGYILSNNADSLAIANITETVKADYNQPDWFEQDSDGNHVKILQ	
	.	..
fd	YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG-----FNEDPFVCEYQGQSSDL	
f1	YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG-----FNEDPFVCEYQGQSSDL	
M13	YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG-----FNEDPFVCEYQGQSSDL	
Ike	NDGTVCSS-----SAWKPTGYVPESGEPSSSPL-----KDGDTGGTGEGGSDTGG	
I2-2	NDGTVCAS-----SAWKPTGYVPESGESSSSPV-----KDGDTGGTGEGGSDTGG	
If1	NSYKAVSYNVESKQSDVNNPTYINYSYVNVKQVSYDTSNVCINNWEITFQNKCDASRAVL	
	.	..
fd	PQPPVNA (SEQ ID NO:14)	
f1	PQPPVNA (SEQ ID NO:15)	
M13	PQPPVNA (SEQ ID NO:16)	
Ike	DTGGGDT (SEQ ID NO:17)	
I2-2	DTGGGDT (SEQ ID NO:18)	
If1	ITDVTTP (SEQ ID NO:19)	

Fig.26

30/52

**Fig.27A**

atgGCTGAAACTGTTGAAAGITGTTAGCAAAATCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCCTGGAAAGACGACAA
AACITTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAA
CTCAGTGTACGGTACATGGGTTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGT
TCTGAGGGTGGCGGTTCGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTA
TATCAACCCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGT
CTCAGCCCTCTTAATACTTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCA
CTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTT
ACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTCCATTCTGGCTTTAATGAGGATTTATTTGTTTGTGAATATCAAGGCC
AATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTCCGTCCmmratratratratratat(SF01DNO: 23)

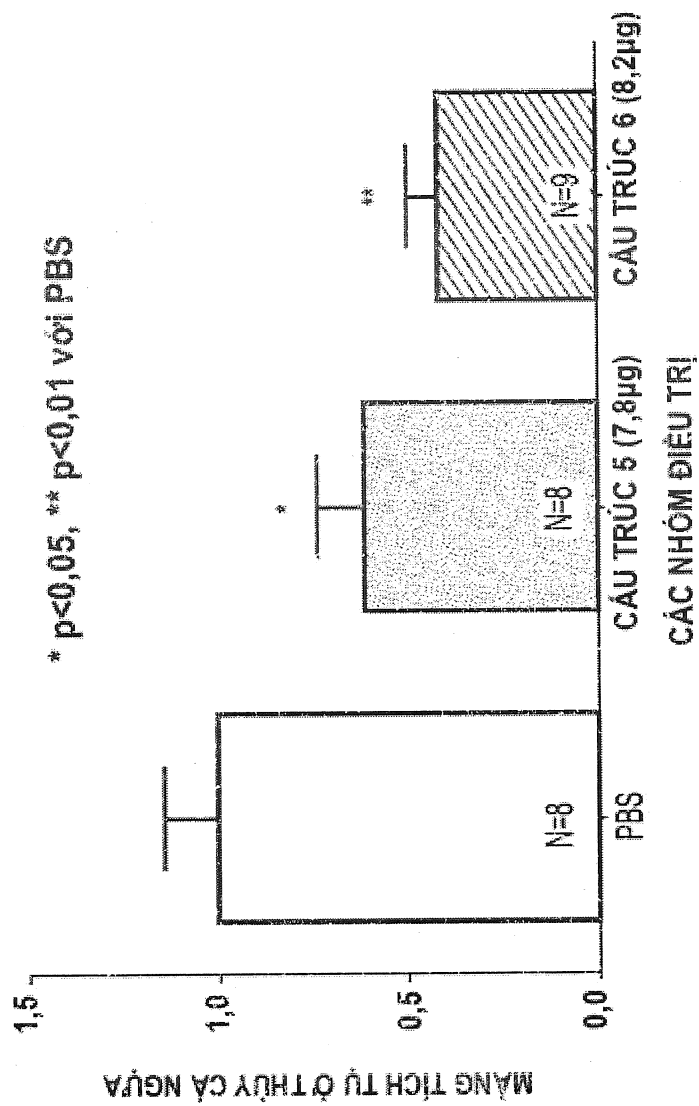
Fig.27B

31/52

E G N N K D
 Y E I N S S
 N N Y Q S S
 A E T F V Q
 Y P Y M P G
 R I G F T Q
 D A P T Y Y
 L L I N Q E
 T G P L Y C
 K I T P Y V
 D P D Q T F
 D V G S K L
 K W Y E V D
 W T E E P E
 V G P L D N
 W Y P S T E
 T C K P G G
 F Q T N Q S
 S T G P T H
 N E G N V F H
 E D G A T A H
 T G E P G C H
 H T S N T D H
 S C G Q Y R H
 K V G E V F G
 A V G T T K S
 L V E G L G P
 C G S P A N A
 S T G P G W N
 E A G Y Q Y V
 V N G T R A P
 T W E G N D P
 E L S D R Y Q
 A C G L F M P
 M G G P R A L

(SEQ ID NO:24)

Fig.27C

**Fig.28**

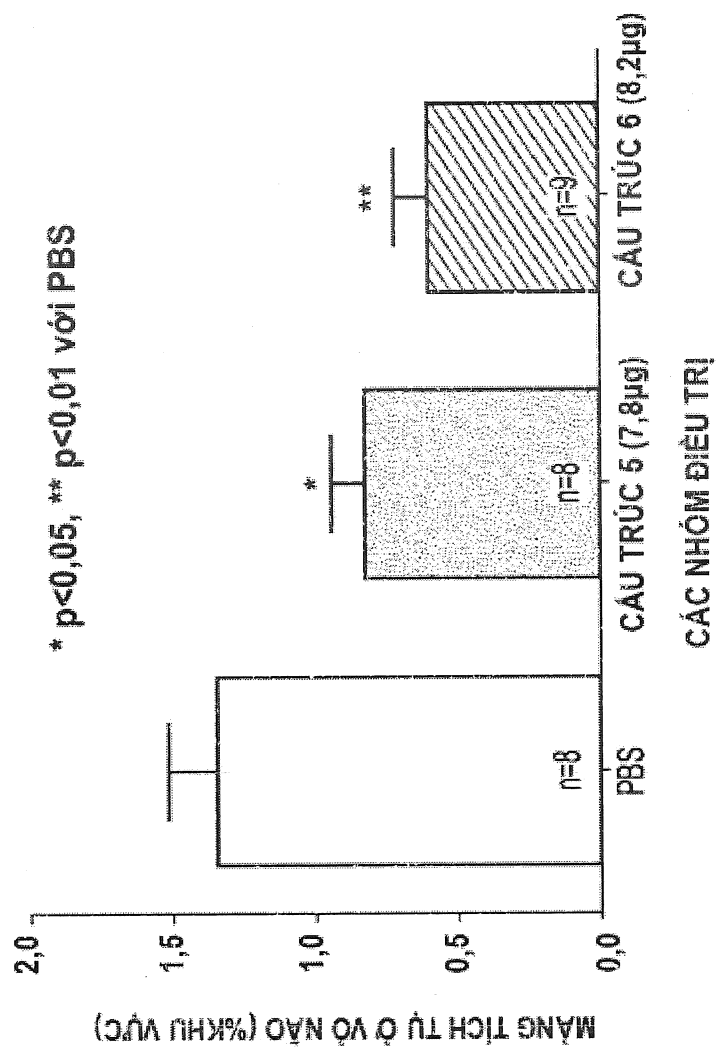


Fig.29

34/52

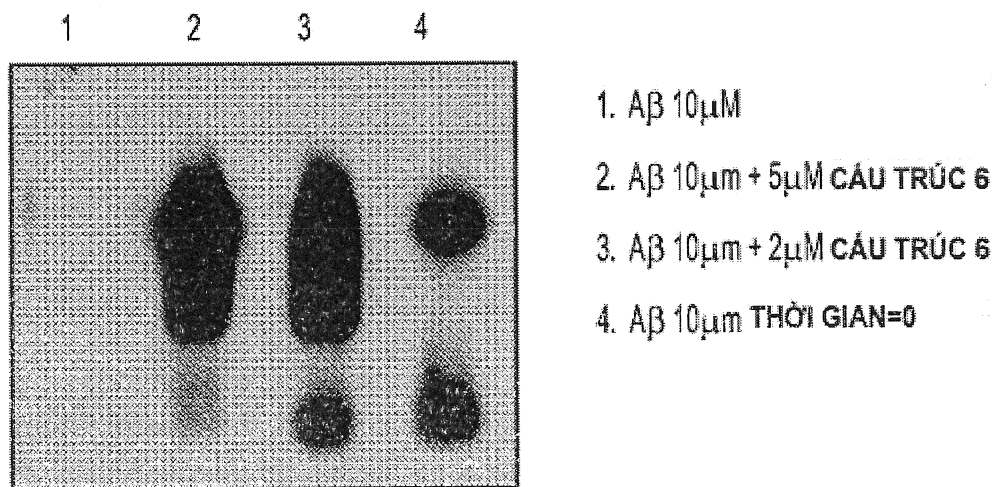


Fig.30A

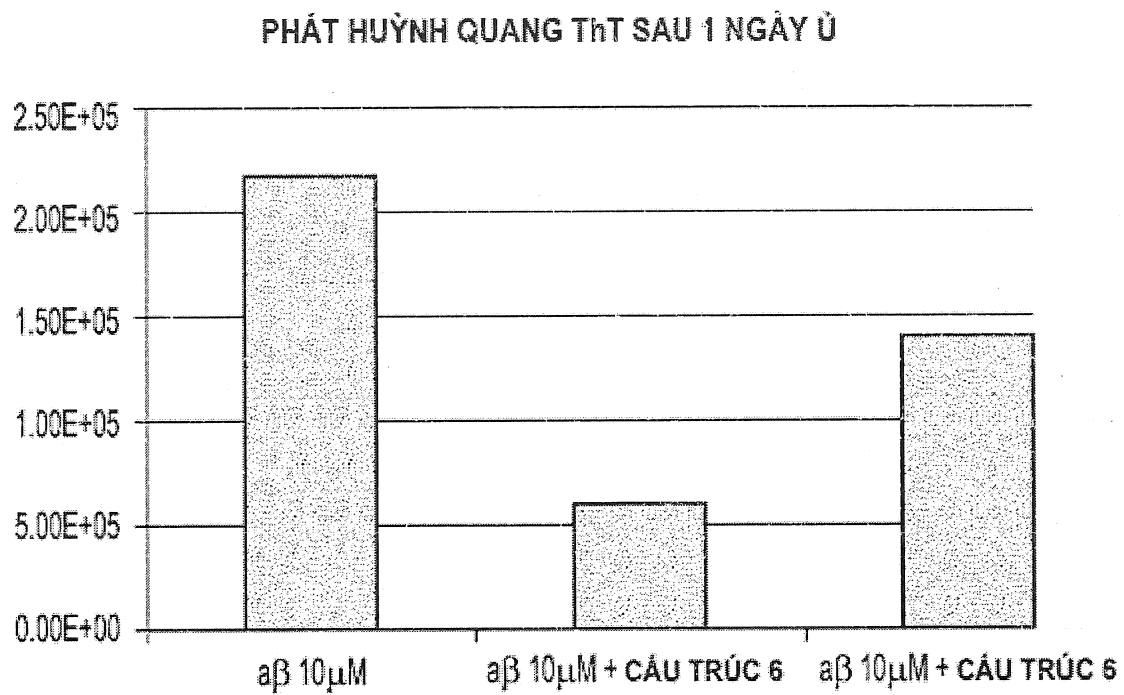
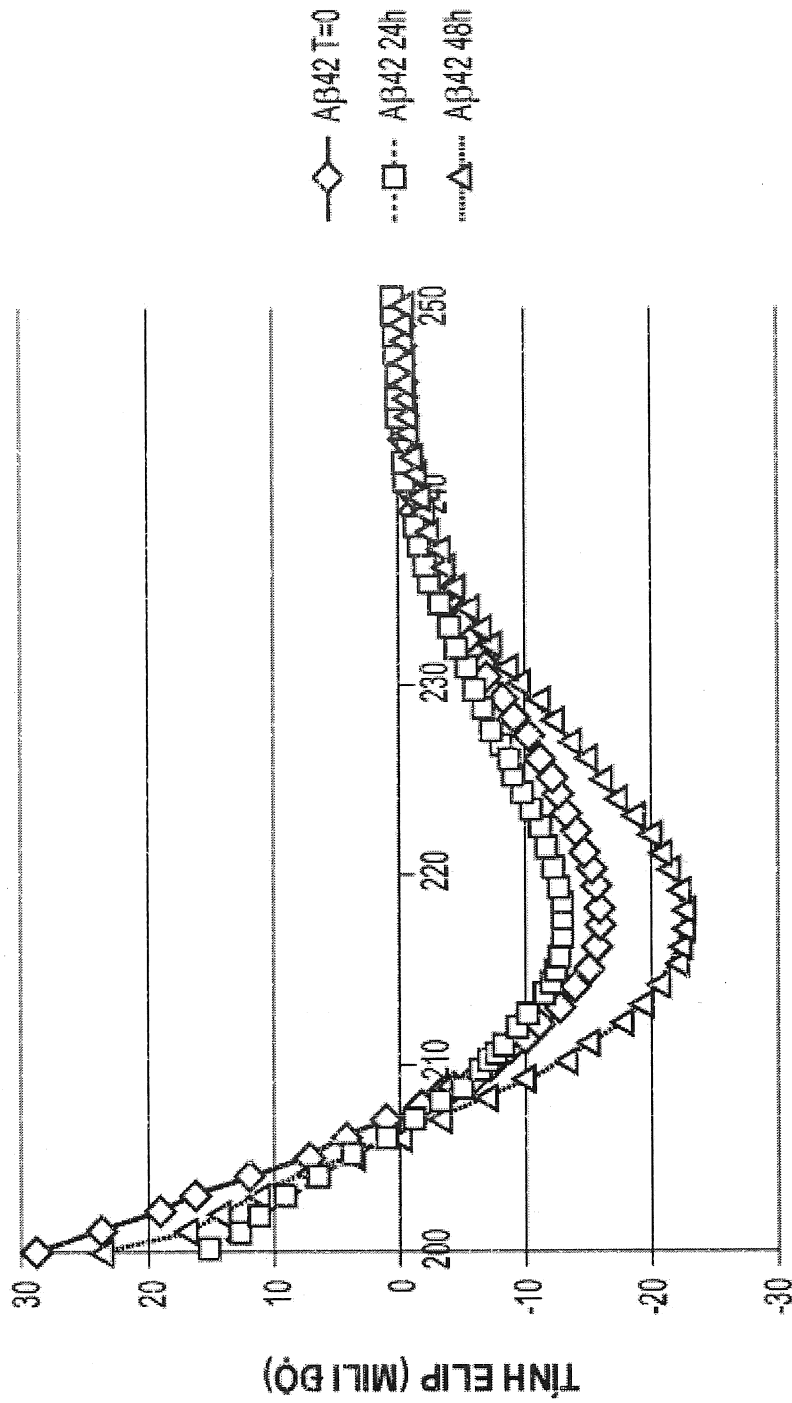


Fig.30B

35/52



BƯỚC SÓNG

Fig.31A

36/52

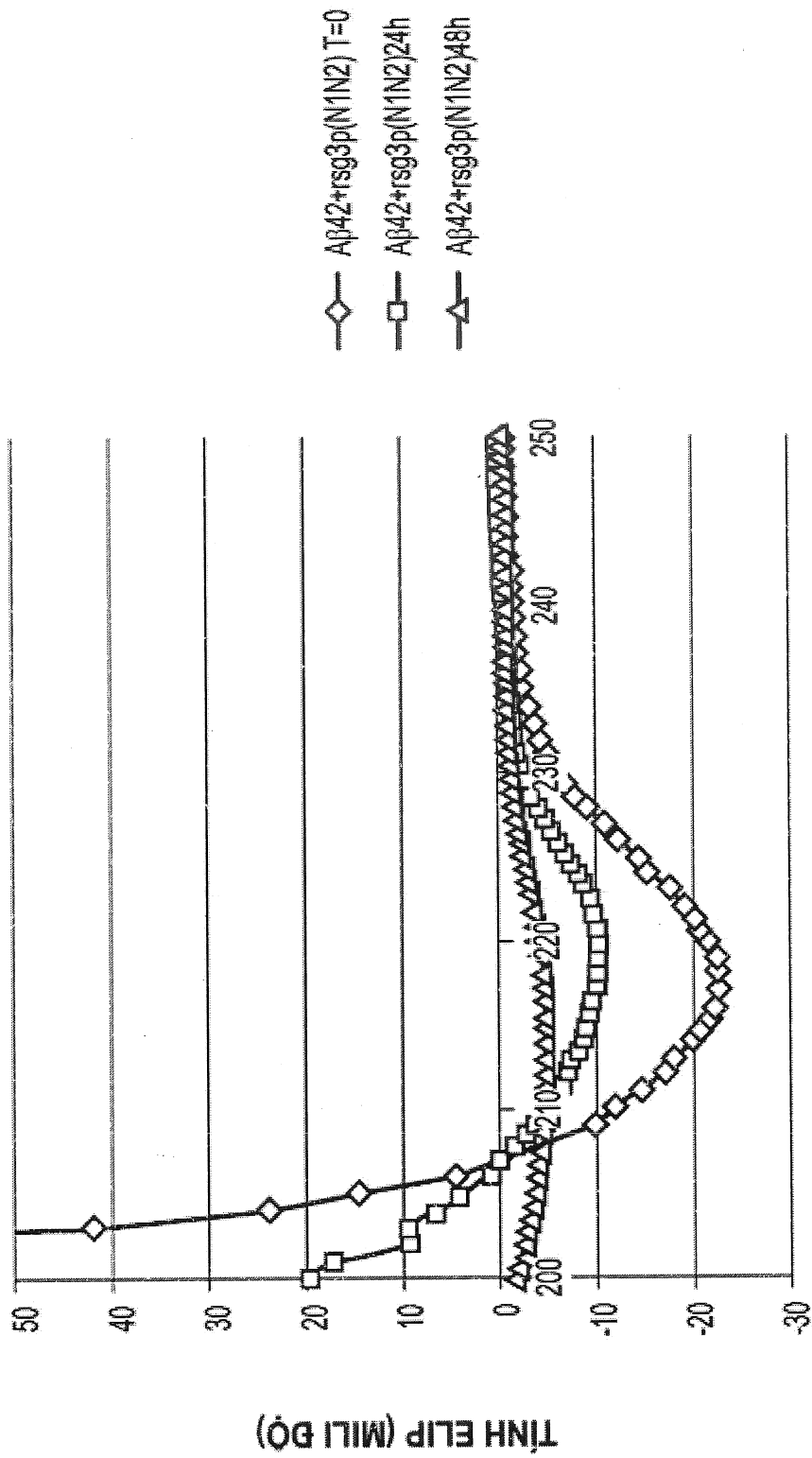
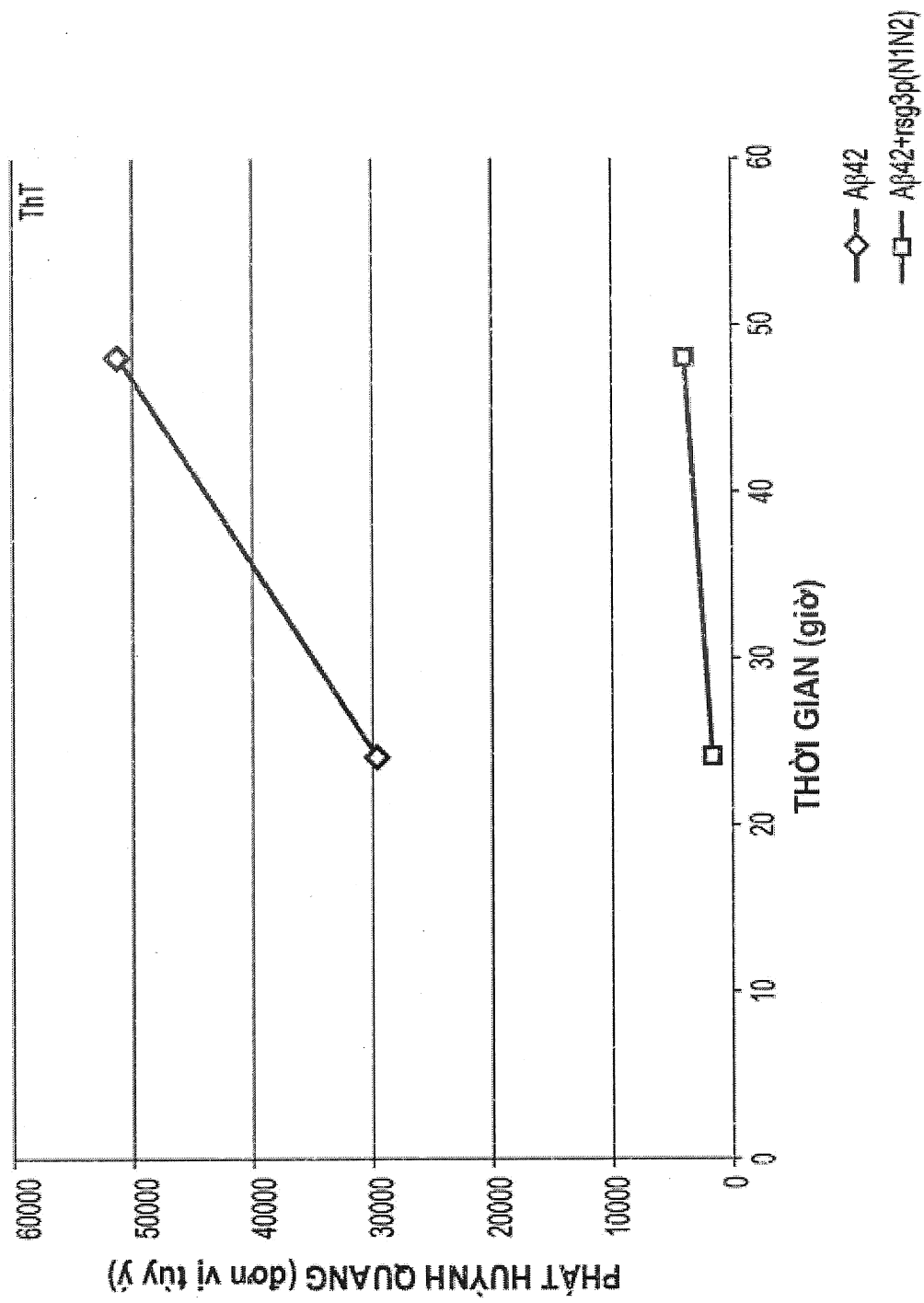


Fig. 31B

37/52

**Fig.31C**

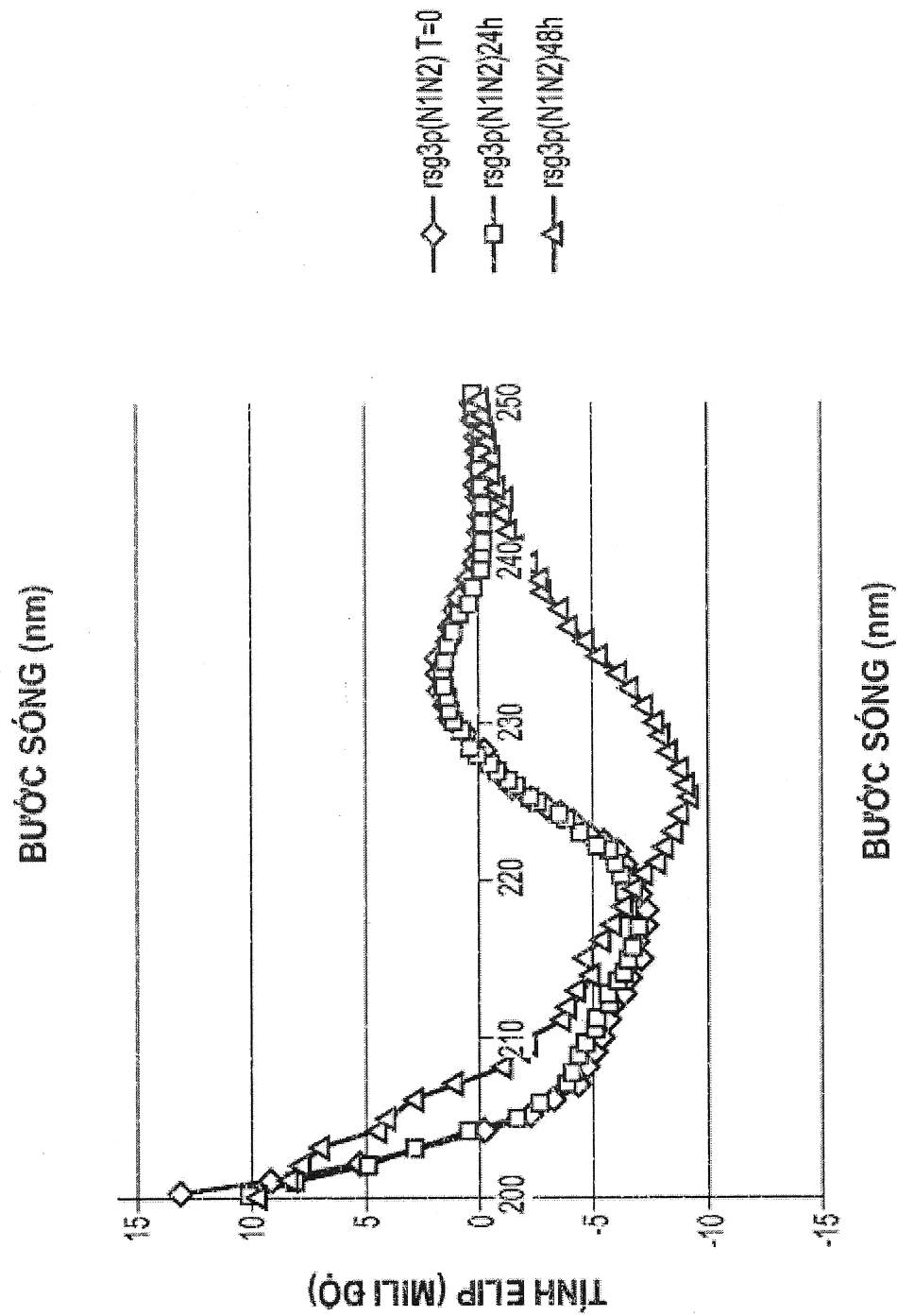


Fig.31D

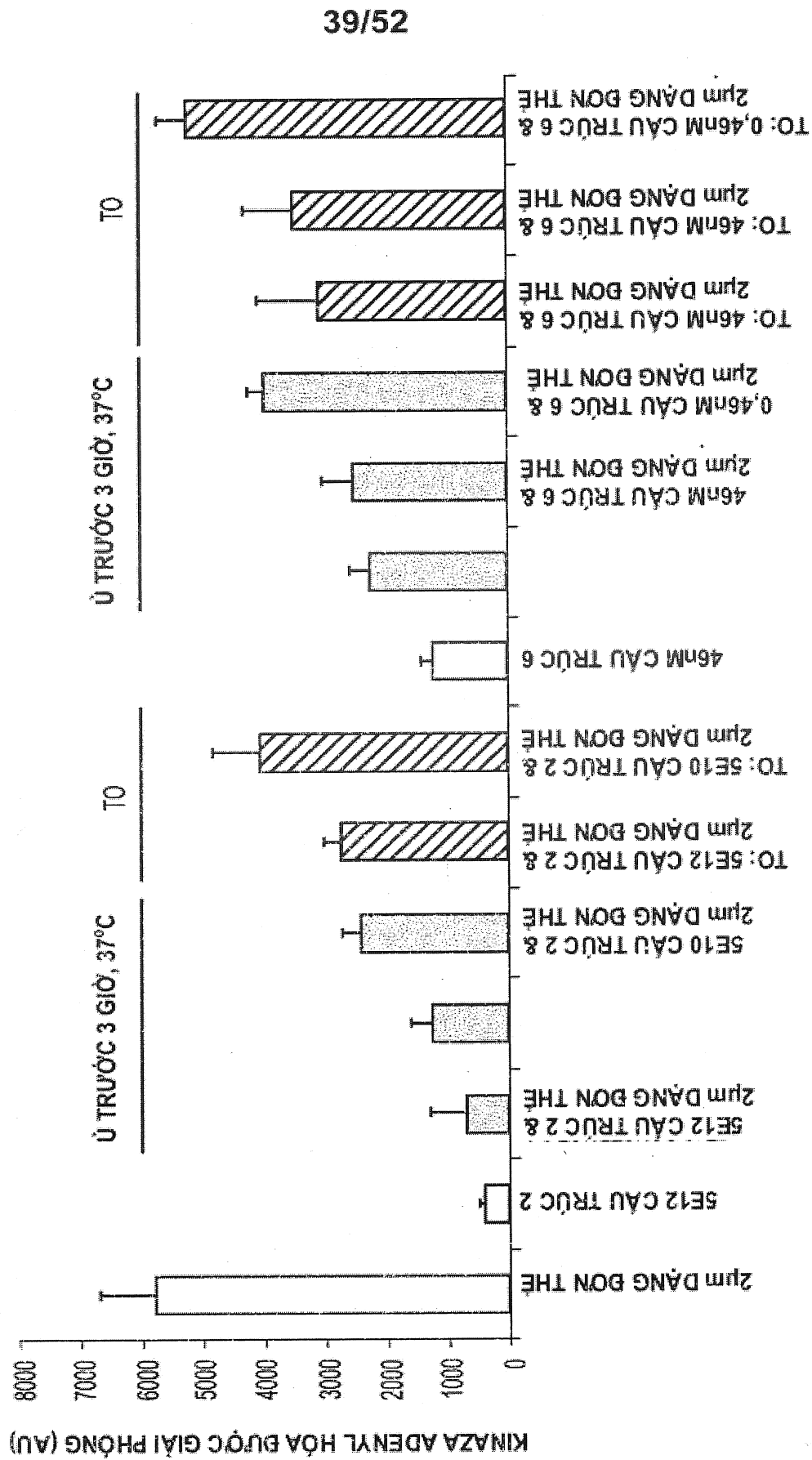


Fig. 32

40/52

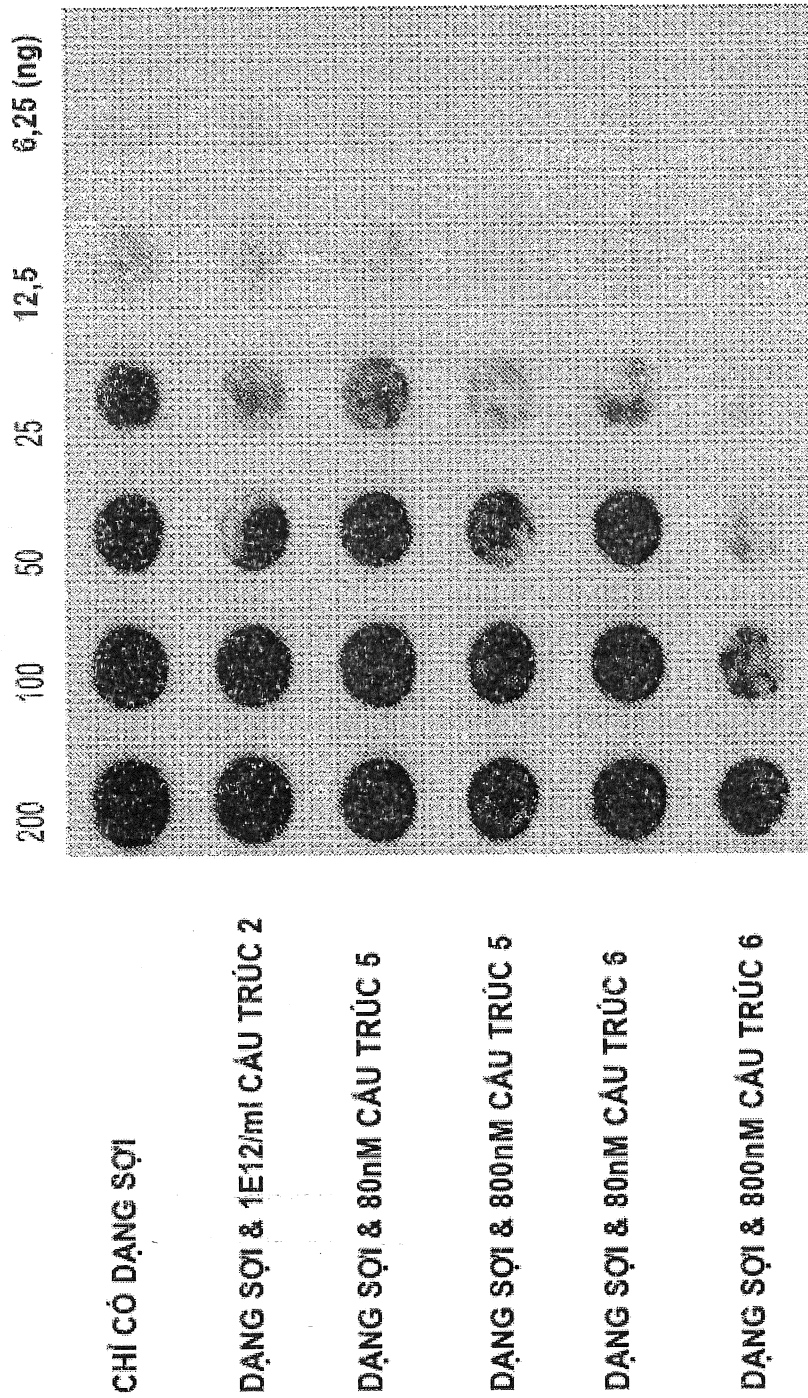
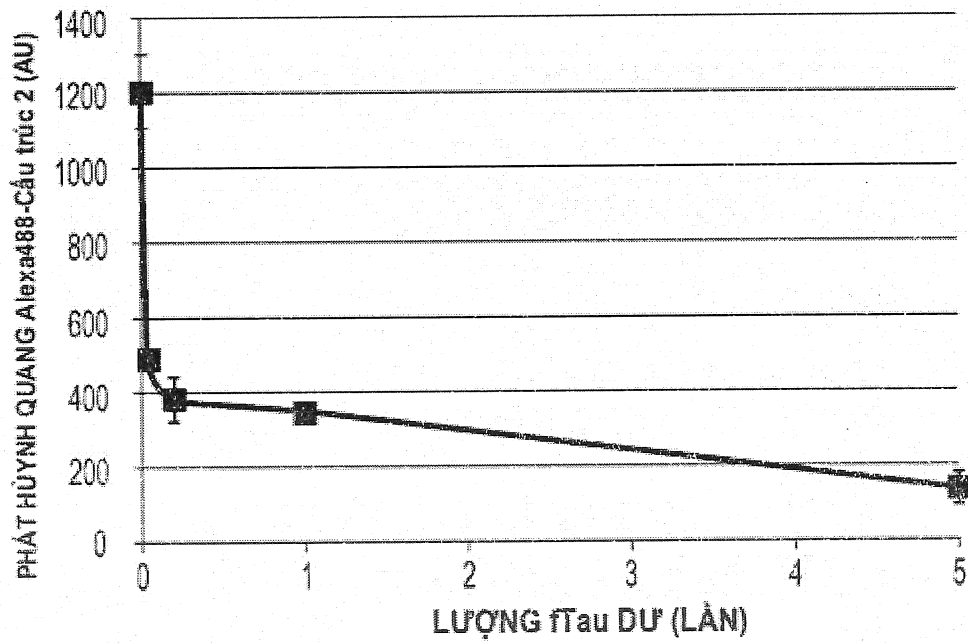
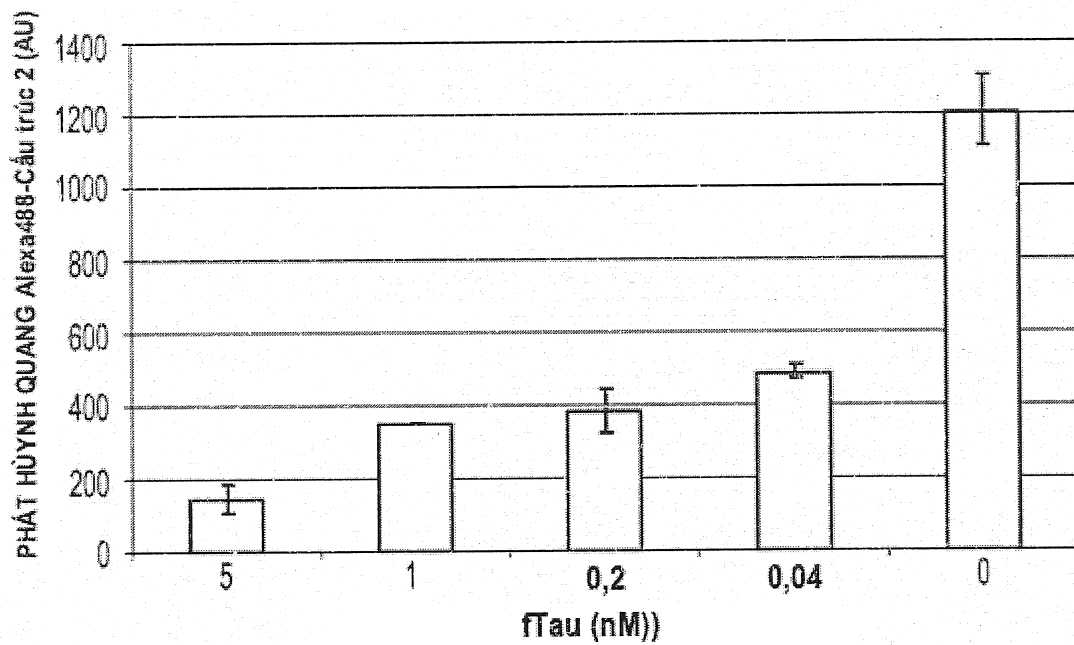
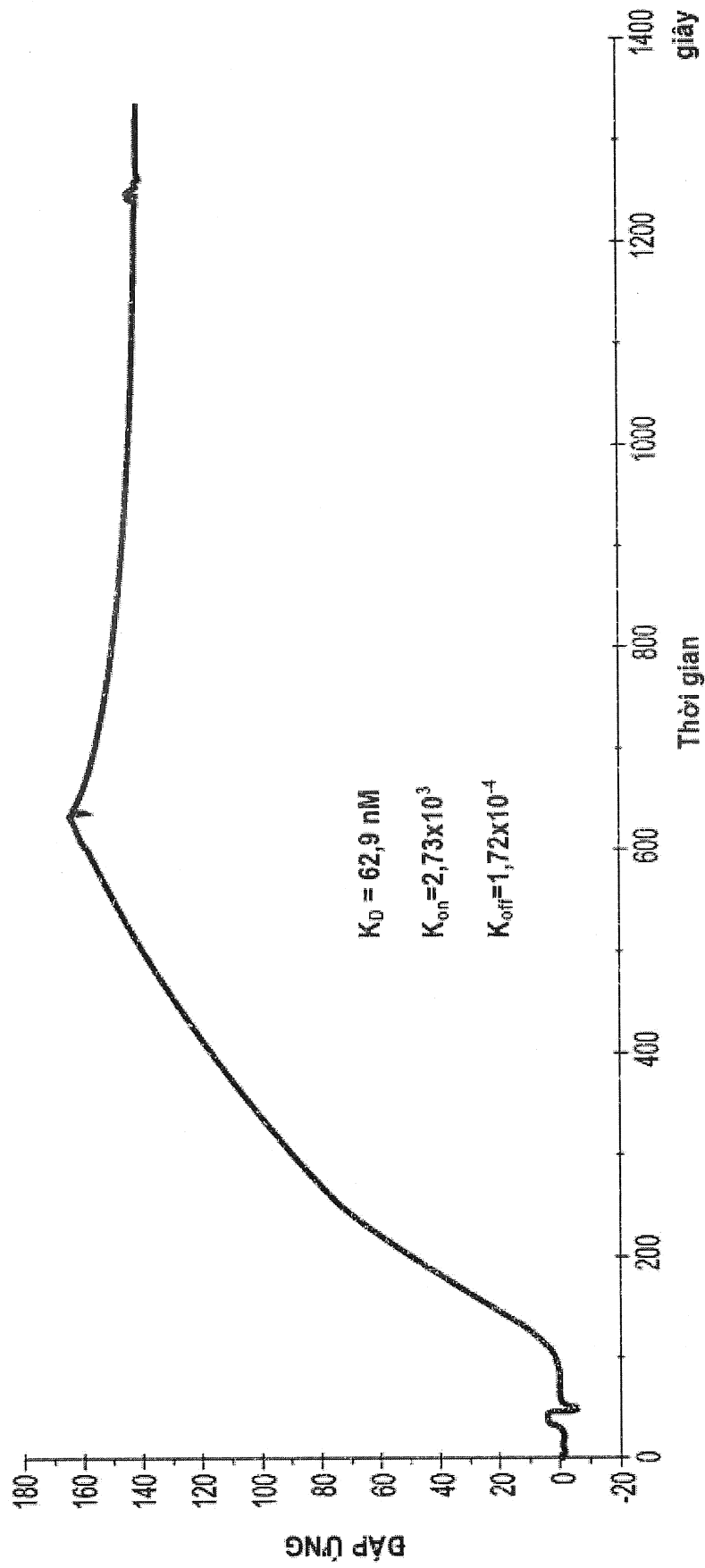


Fig.33

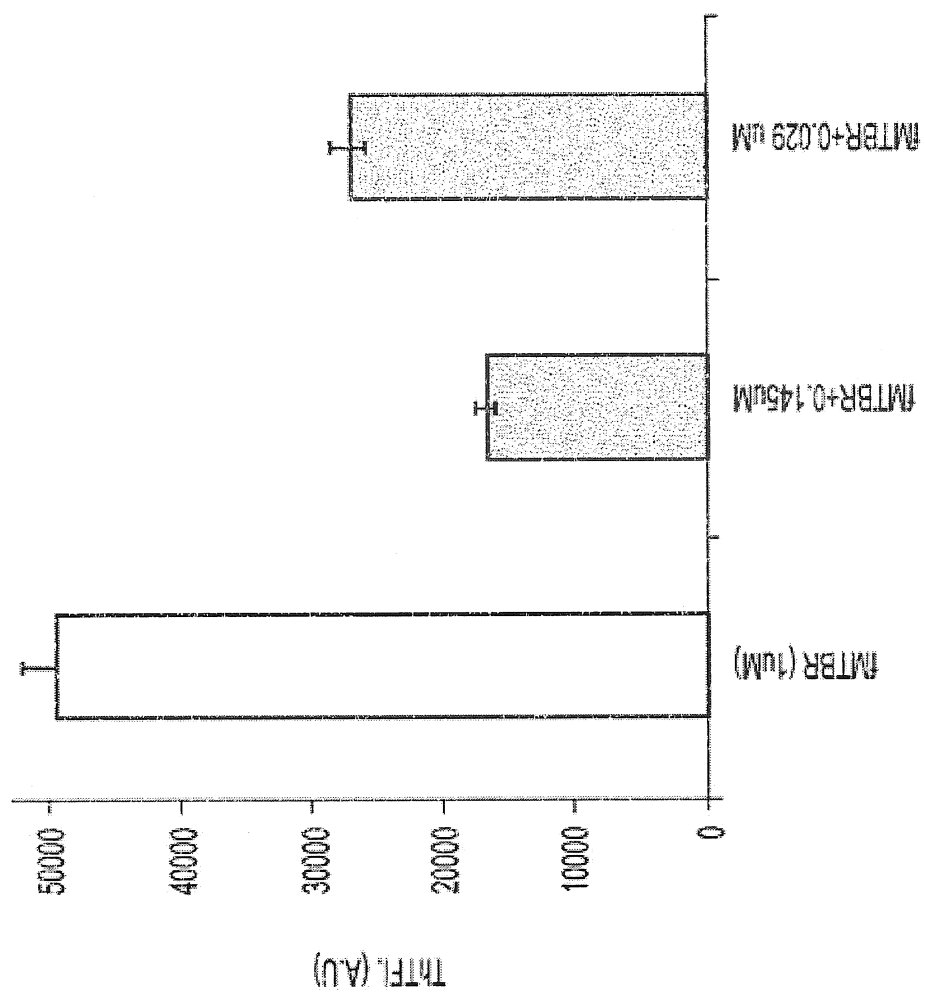
41/52

**Fig.34A****Fig.34B**

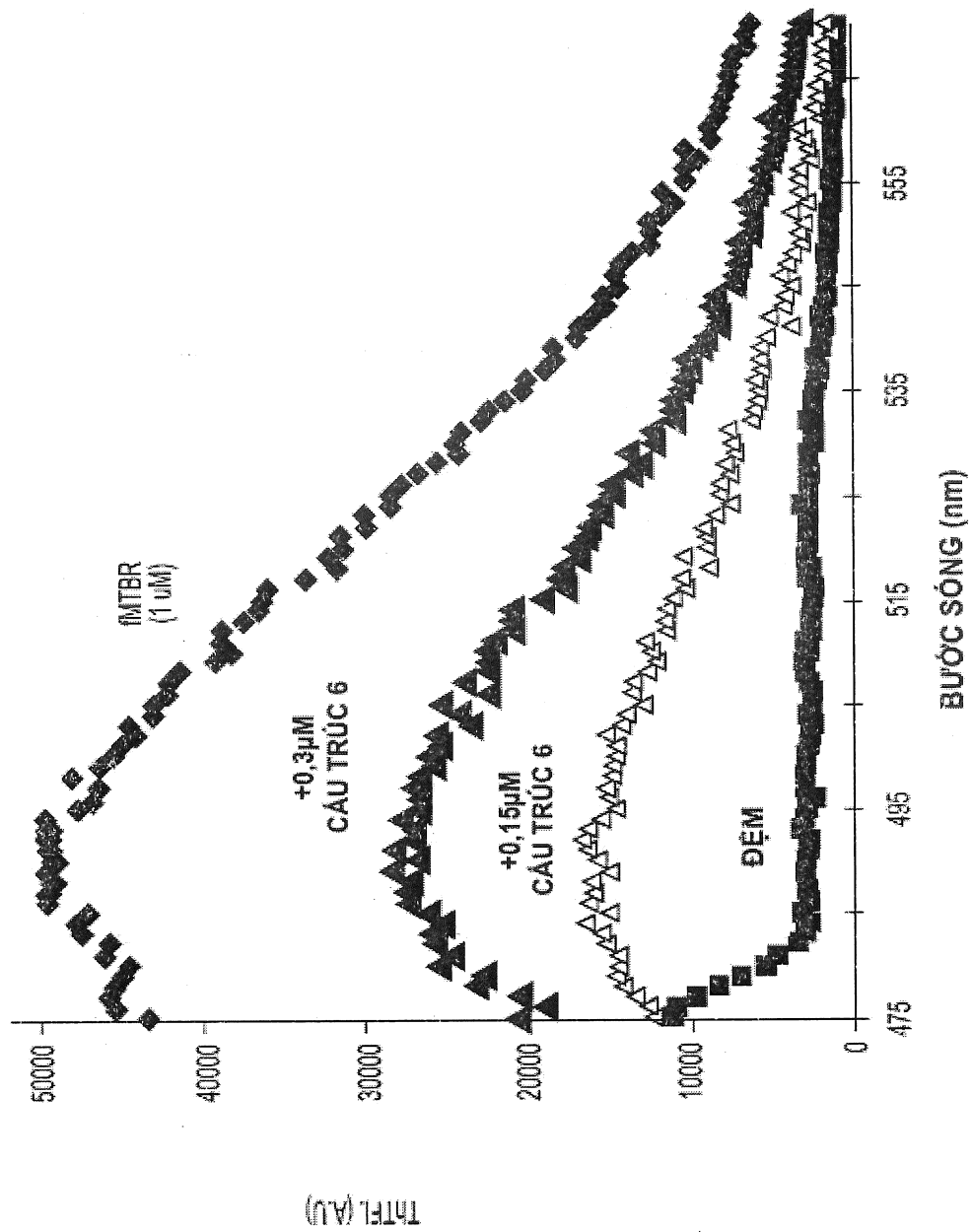
42/52

**Fig.35**

43/52

**Fig.36A**

44/52

**Fig.36B**

45/52

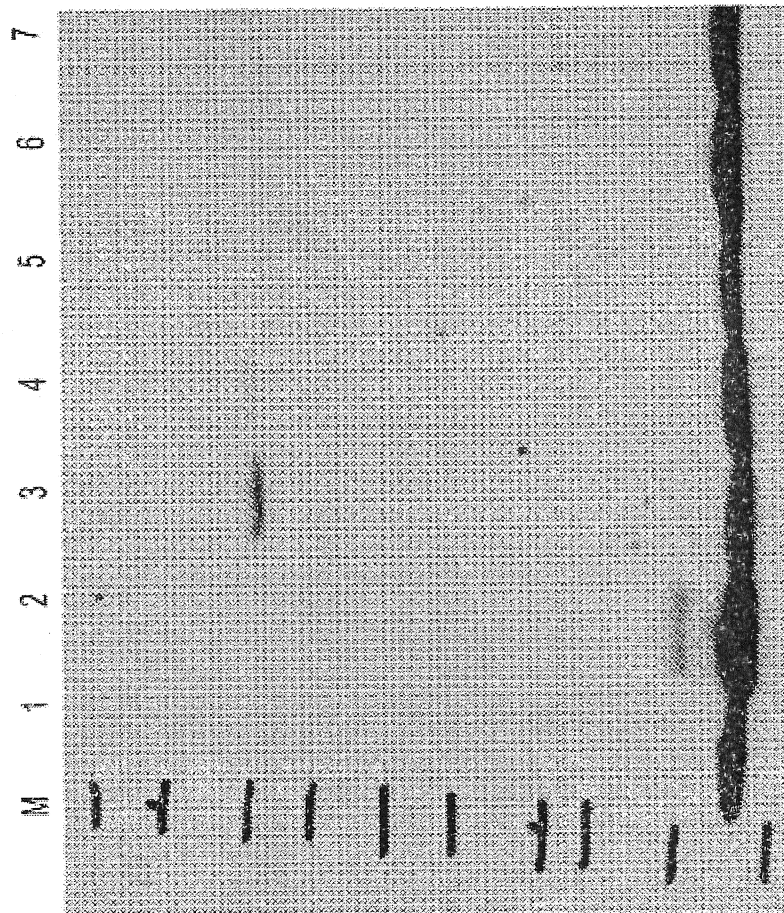
1. A β 42 1 μ M2. A β 42 1 μ M T=03. A β 42 + C α U TRÚC6 0,5 μ M4. A β 42 + C α U TRÚC6 0,2 μ M5. A β 42 + C α U TRÚC6 0,05 μ M6. A β 42 + C α U TRÚC6 1 μ M7. A β 42 + C α U TRÚC6 0,1 μ M

Fig.37A

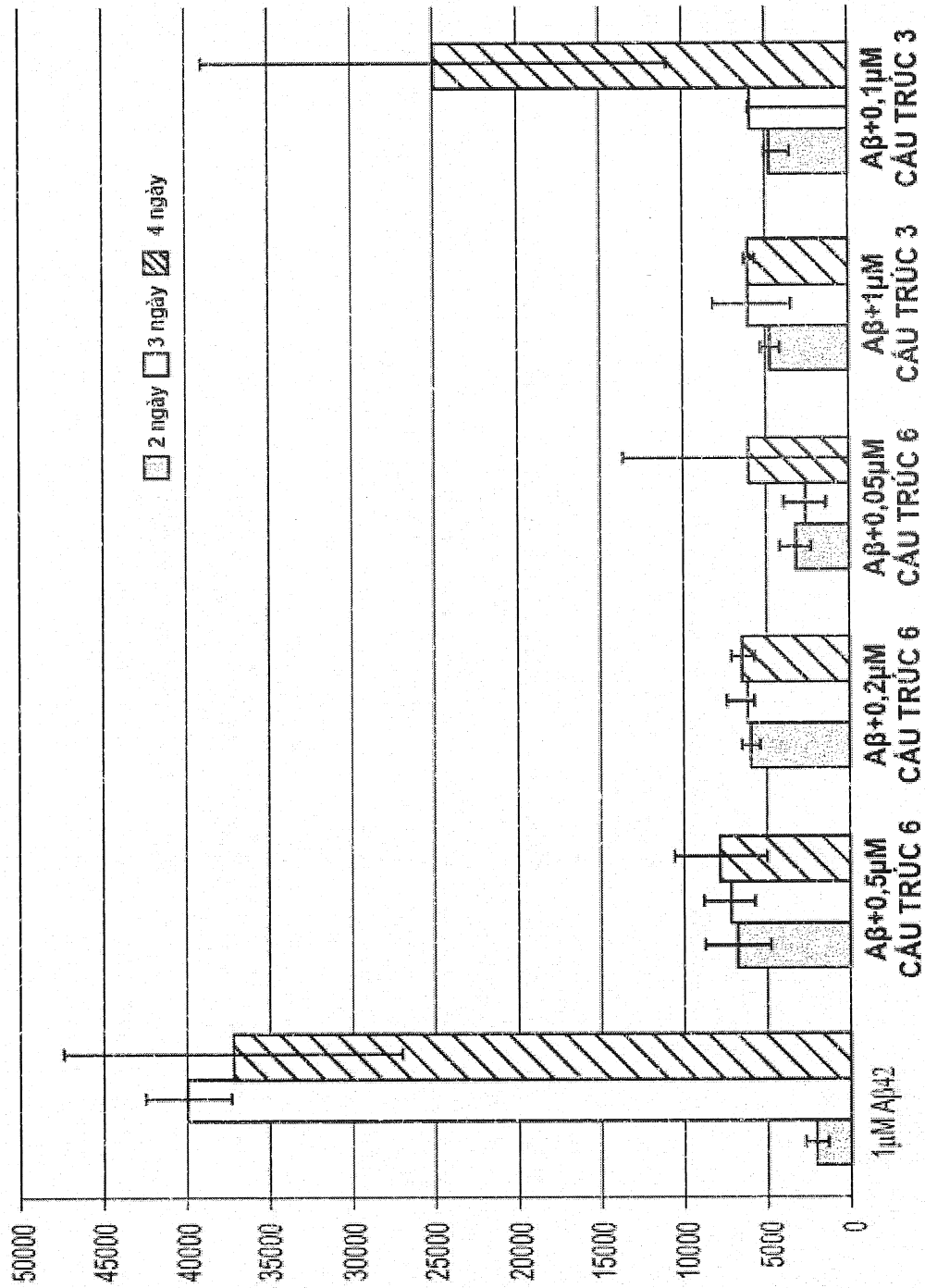


Fig.37B

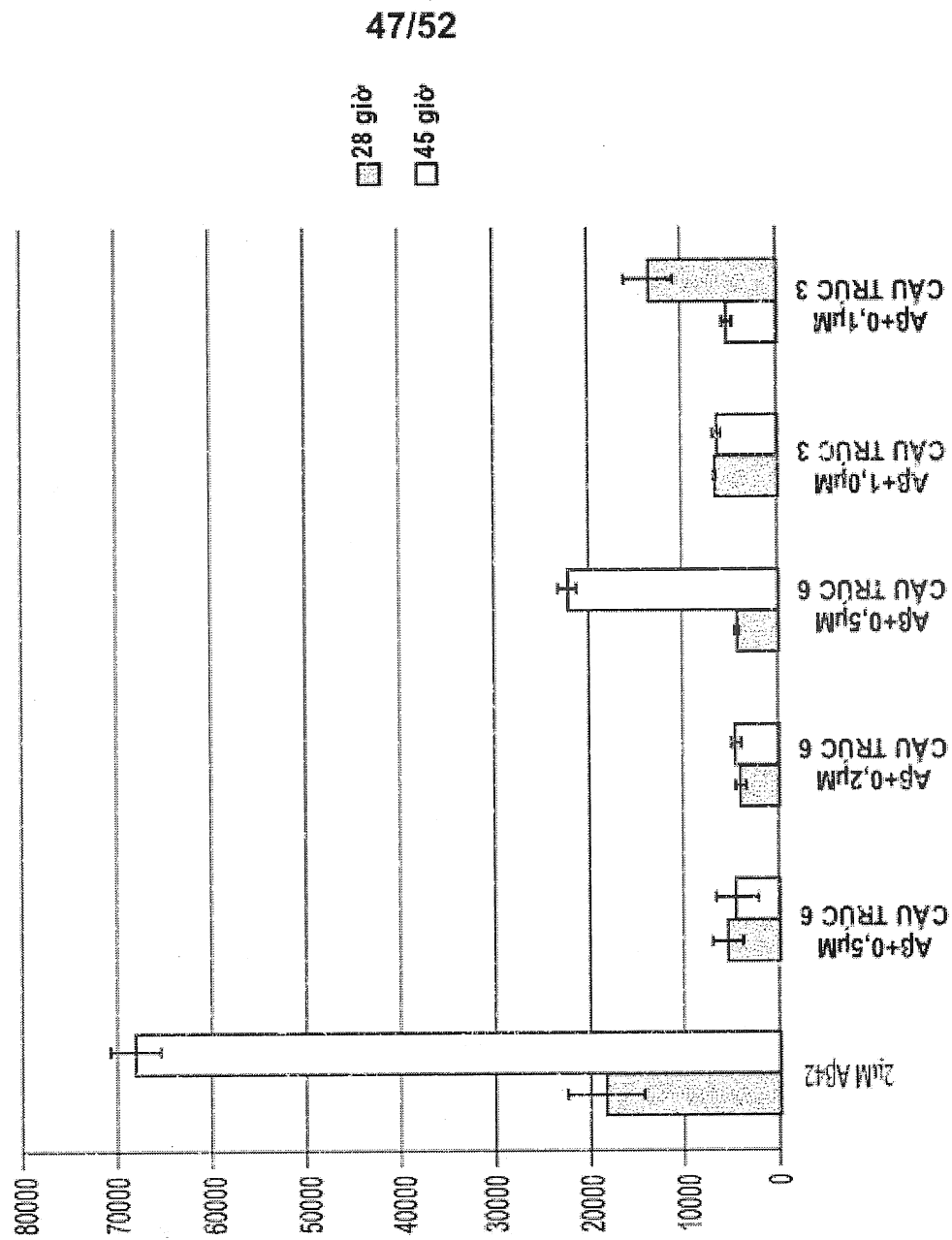


Fig. 37C

48/52

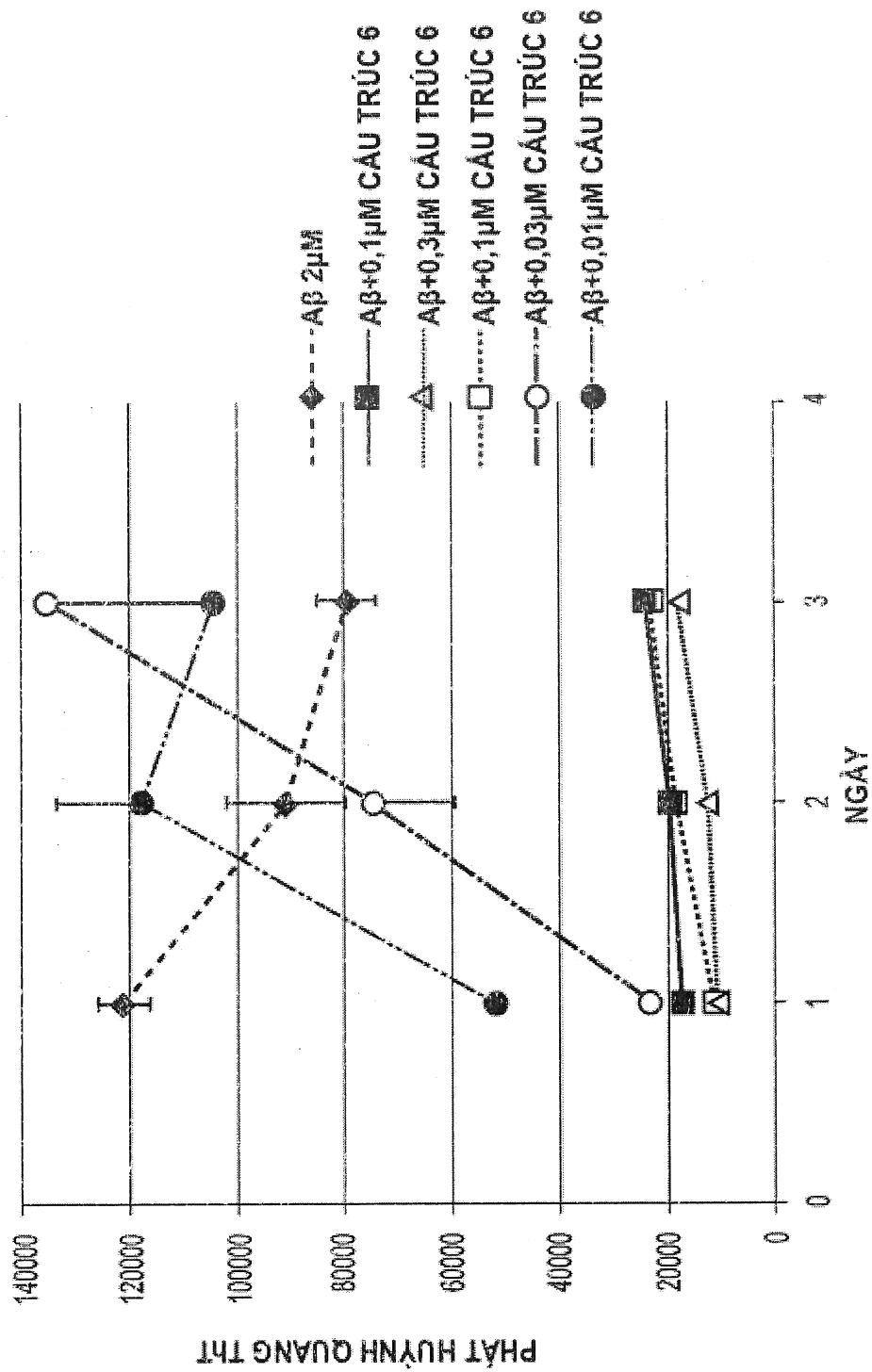


Fig.37D

49/52

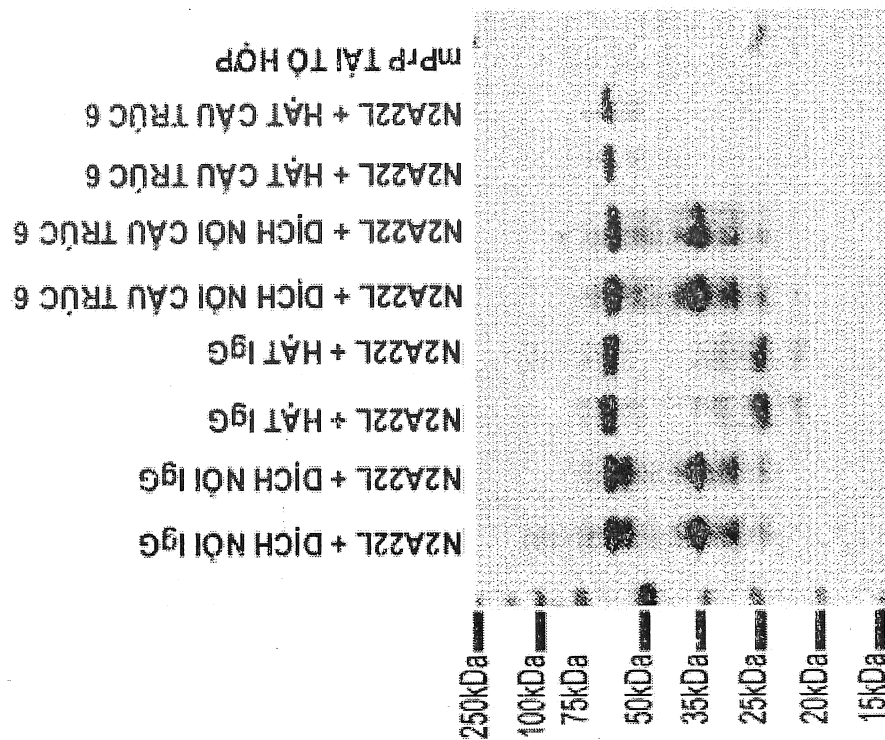


Fig.38A

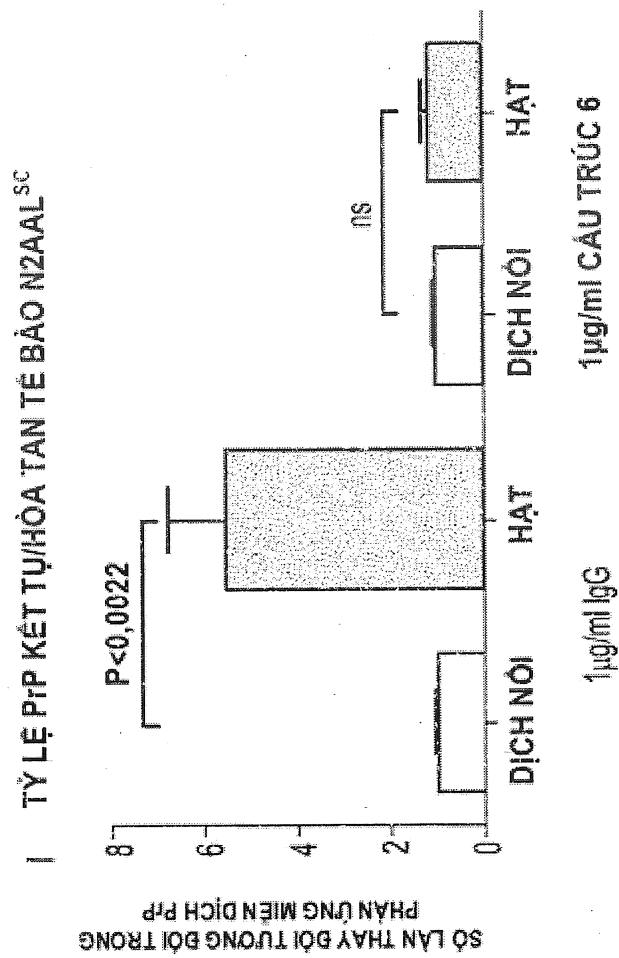


Fig.38B

51/52

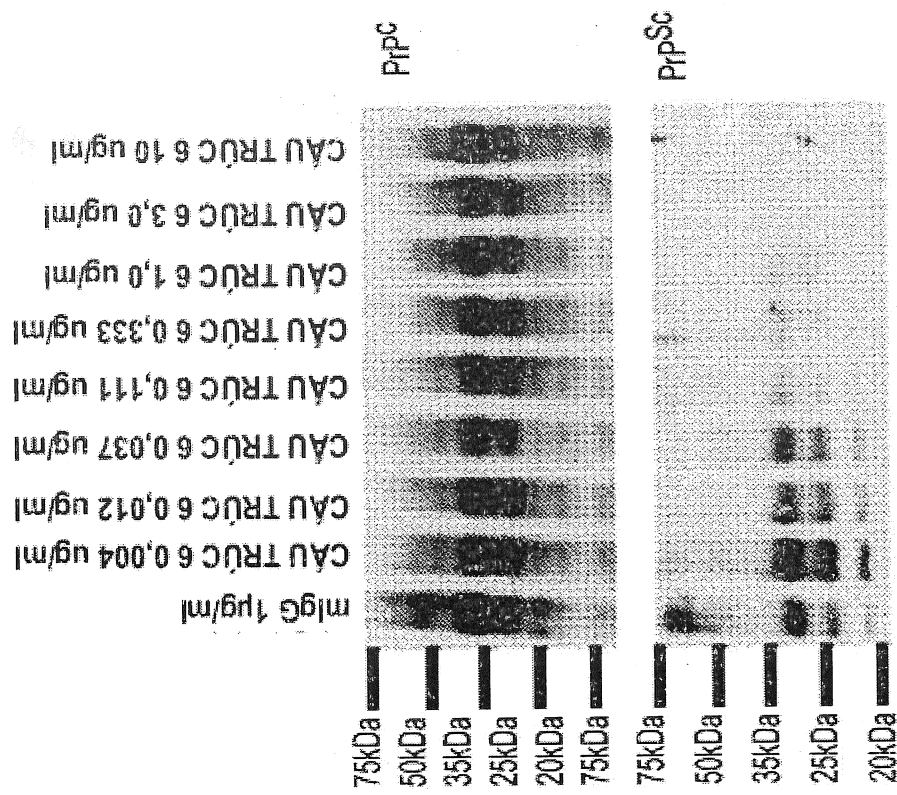


Fig.39A

52/52

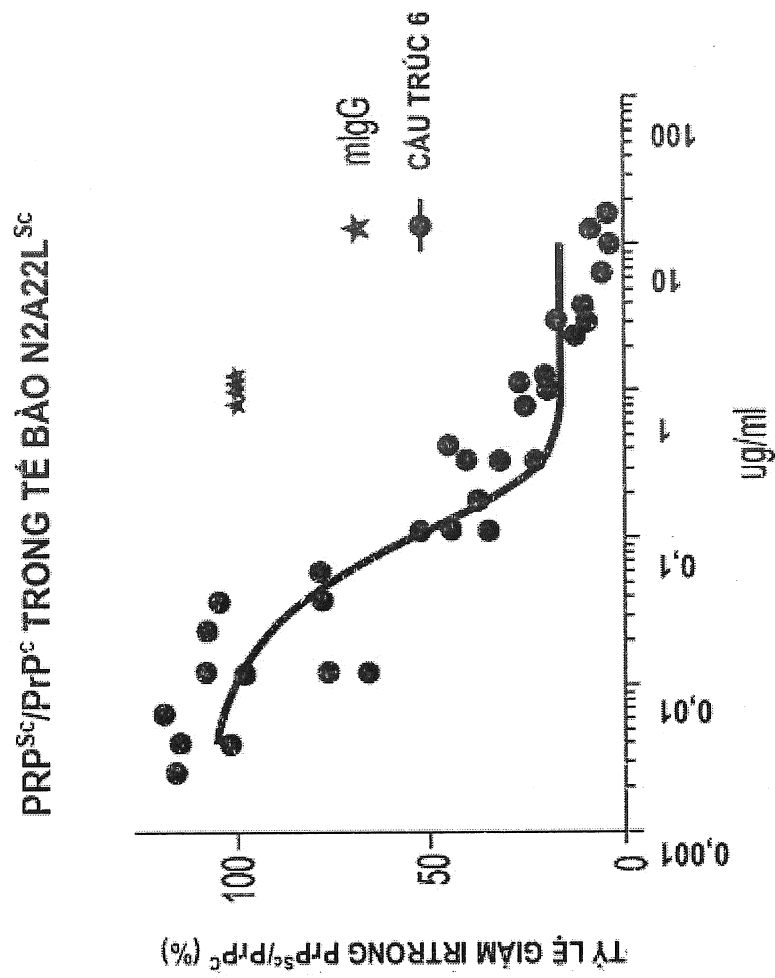


Fig.39B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NEUROPHAGE PHARMACEUTICALS, INC.
 <120> PROTEIN DUNG HỢP CHỨA POLYPEPTIT GẮN KẾT VỚI AMYLOID VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN DUNG HỢP NÀY
 <130> 12236.0004-00304
 <140> PCT/US2012/066793
 <141> 2012-11-28
 <150> 61/730,316
 <151> 2012-11-27
 <150> 61/708,709
 <151> 2012-10-02
 <150> 61/564,602
 <151> 2011-11-29
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
 <400> 1
 Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
 1 5 10 15
 His Ser Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu
 20 25 30
 Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr
 35 40 45
 Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys
 50 55 60
 Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu
 65 70 75 80
 Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu
 85 90 95
 Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp
 100 105 110
 Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr
 115 120 125
 Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu
 130 135 140
 Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg
 145 150 155 160
 Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly
 165 170 175
 Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys
 180 185 190
 Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe
 195 200 205
 His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln
 210 215 220
 Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
 245 250 255
 Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 260 265 270
 Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala
 275 280 285
 Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly
 290 295 300
 Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe
 305 310 315 320
 Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
 325 330 335
 Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn
 340 345 350
 Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln
 355 360 365
 Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Ser Ala Gly Lys Pro Tyr Glu
 370 375 380
 Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala
 385 390 395 400
 Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala
 405 410 415
 Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 420
 <210> 2
 <211> 424
 <212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 2

```

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
1      5      10      15
His Ser Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu
20      25      30
Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr
35      40      45
Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys
50      55      60
Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu
65      70      75      80
Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
85      90      95
Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp
100     105     110
Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr
115     120     125
Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu
130     135     140
Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg
145     150     155     160
Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly
165     170     175
Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys
180     185     190
Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe
195     200     205
His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln
210     215     220
Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly
225     230     235     240
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
245     250     255
Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
260     265     270
Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala
275     280     285
Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly
290     295     300
Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe
305     310     315     320
Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
325     330     335
Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn
340     345     350
Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln
355     360     365
Ser Val Glu Cys Arg Pro Tyr Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu
370     375     380
Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala
385     390     395     400
Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala
405     410     415
Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
420

```

<210> 3

<211> 424

<212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 3

```

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
1      5      10      15
His Ser Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu
20      25      30
Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr
35      40      45
Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys
50      55      60
Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu
65      70      75      80
Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
85      90      95
Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp
100     105     110
Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr
115     120     125
Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu
130     135     140

```



```

Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg
145                      150                      155                      160
Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly
                      165                      170                      175
Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys
                      180                      185                      190
Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe
                      195                      200                      205
His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln
                      210                      215                      220
Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly
225                      230                      235                      240
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
                      245                      250                      255
Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
                      260                      265                      270
Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala
                      275                      280                      285
Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly
                      290                      295                      300
Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe
305                      310                      315                      320
Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
                      325                      330                      335
Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn
                      340                      345                      350
Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln
                      355                      360                      365
Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu
                      370                      375                      380
Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala
385                      390                      395                      400
Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala
                      405                      410                      415
Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
                      420

```

<210> 4

<211> 422

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /Lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: trình tự liên ứng tổng hợp"

<220>

<221> Biễn thể

<222> (375)..(375)

<223> /Thay="Tyr"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (376)..(376)

<223> /Thay="Gly"

<220>

<221> Trình tự lỗi

<222> (375)..(376)

<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối với các vị trí này"

<400> 4

```

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
1                      5                      10                      15
His Ser Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu
                      20                      25                      30
Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr
                      35                      40                      45
Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys
50                      55                      60
Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu
65                      70                      75                      80
Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
                      85                      90                      95
Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp
100                      105                      110
Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr
115                      120                      125
Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu
130                      135                      140
Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg
145                      150                      155                      160
Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly
165                      170                      175

```

Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys
 180 185 190
 Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe
 195 200 205
 His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln
 210 215 220
 Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
 245 250 255
 Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 260 265 270
 Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala
 275 280 285
 Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly
 290 295 300
 Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe
 305 310 315 320
 Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
 325 330 335
 Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn
 340 345 350
 Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln
 355 360 365
 Ser Val Glu Cys Arg Pro Phe Ser Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser
 370 375 380
 Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu
 385 390 395 400
 Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile
 405 410 415
 Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 420

<210> 5

<211> 434

<212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 5

Met Lys Arg Lys Ile Ile Ala Ile Ser Leu Phe Leu Tyr Ile Pro Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Ala Asp Asn Trp Glu Ser Ile Thr Lys Ser Tyr Tyr Thr Gly
 20 25 30
 Phe Ala Met Ser Lys Thr Val Glu Ser Lys Asp Gln Asp Gly Lys Thr
 35 40 45
 Val Arg Lys Glu Val Ile Thr Gln Ala Asp Leu Thr Thr Ala Cys Asn
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ala Ser Ala Gln Asp Val Phe Asn Gln Met Lys Leu Thr
 65 70 75 80
 Phe Ser Gly Ile Trp Pro Asp Ser Gln Phe Arg Leu Val Thr Gly Asp
 85 90 95
 Thr Cys Val Tyr Asn Gly Ser Pro Ser Glu Lys Thr Glu Ser Trp Ser
 100 105 110
 Ile Arg Ala Gln Val Glu Gly Asp Met Gln Arg Ser Val Pro Asp Glu
 115 120 125
 Glu Pro Ser Glu Gln Thr Pro Glu Glu Ile Cys Glu Ala Lys Pro Pro
 130 135 140
 Ile Asp Gly Val Phe Asn Asn Val Ser Lys Gly Asp Glu Gly Gly Phe
 145 150 155 160
 Tyr Ile Asn Tyr Asn Gly Cys Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Val Thr Val
 165 170 175
 Cys Gln Asn Asp Gly Thr Val Cys Ala Ser Ser Ala Trp Lys Pro Thr
 180 185 190
 Gly Tyr Val Pro Glu Ser Gly Glu Ser Ser Ser Ser Pro Val Lys Asp
 195 200 205
 Gly Asp Thr Gly Gly Thr Gly Glu Gly Gly Ser Asp Thr Gly Gly Asp
 210 215 220
 Thr Gly Gly Gly Asp Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Asp Thr Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Ser
 245 250 255
 Thr Gly Lys Ser Leu Thr Lys Glu Asp Val Thr Ala Ala Ile His Asp
 260 265 270
 Ala Ser Pro Ser Ile Gly Asp Ala Val Lys Asp Ser Leu Thr Glu Asp
 275 280 285
 Asn Asp Gln Asn Asp Asn Gln Lys Lys Ala Asp Glu Gln Ser Ala Lys
 290 295 300
 Ala Ser Ala Ser Val Ser Asp Ala Ile Ser Asp Gly Met Arg Gly Val
 305 310 315 320
 Gly Asn Phe Val Asp Asp Leu Gly Gly Glu Ser Ser Gln Tyr Gly Ile
 325 330 335

Gly Asn Ser Glu Met Asp Leu Ser Val Ser Leu Ala Lys Gly Gln Leu
 340 345 350
 Gly Ile Asp Leu Glu Gly His Gly Ser Ala Trp Glu Ser Phe Leu Asn
 355 360 365
 Asp Gly Ala Leu Arg Pro Ser Ile Pro Ser Gly His Gly Cys Thr Asp
 370 375 380
 Phe Val Met Phe Gln Gly Ser Val Tyr Gln Leu Asp Ile Gly Cys Asp
 385 390 395 400
 Lys Leu Gly Asp Ile Lys Ser Val Leu Ser Trp Val Met Tyr Cys Leu
 405 410 415
 Thr Phe Trp Tyr Val Phe Gln Ser Ala Thr Ser Leu Leu Arg Lys Gly
 420 425 430
 Glu Gln
 <210> 6
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
 <400> 6
 Met Lys Arg Lys Ile Ile Ala Ile Ser Leu Phe Leu Tyr Ile Pro Leu
 1 5 10 15
 Ser Asn Ala Asp Asn Trp Glu Ser Ile Thr Lys Ser Tyr Tyr Thr Gly
 20 25 30
 Phe Ala Ile Ser Lys Thr Val Glu Ser Lys Asp Lys Asp Gly Lys Pro
 35 40 45
 Val Arg Lys Glu Val Ile Thr Gln Ala Asp Leu Thr Thr Ala Cys Asn
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ala Ser Ala Gln Asn Val Phe Asn Gln Ile Lys Leu Thr
 65 70 75 80
 Leu Ser Gly Thr Trp Asn Asp Ser Gln Phe Arg Leu Val Thr Gly Asp
 85 90 95
 Thr Cys Val Tyr Asn Gly Ser Pro Gly Glu Lys Thr Glu Ser Trp Ser
 100 105 110
 Ile Arg Ala Gln Val Glu Gly Asp Ile Gln Arg Ser Val Pro Asp Glu
 115 120 125
 Glu Pro Ser Glu Gln Thr Pro Glu Ile Cys Glu Ala Lys Pro Pro
 130 135 140
 Ile Asp Gly Val Phe Asn Asn Val Phe Lys Gly Asp Glu Gly Gly Phe
 145 150 155 160
 Tyr Ile Asn Tyr Asn Gly Cys Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Val Thr Val
 165 170 175
 Cys Gln Asn Asp Gly Thr Val Cys Ser Ser Ser Ala Trp Lys Pro Thr
 180 185 190
 Gly Tyr Val Pro Glu Ser Gly Glu Pro Ser Ser Ser Pro Leu Lys Asp
 195 200 205
 Gly Asp Thr Gly Gly Thr Gly Glu Gly Gly Ser Asp Thr Gly Gly Asp
 210 215 220
 Thr Gly Gly Gly Asp Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Asp Thr Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Ser
 245 250 255
 Thr Gly Lys Ser Leu Thr Lys Glu Asp Val Thr Ala Ala Ile His Val
 260 265 270
 Ala Ser Pro Ser Ile Gly Asp Ala Val Lys Asp Ser Leu Thr Glu Asp
 275 280 285
 Asn Asp Gln Tyr Asp Asn Gln Lys Lys Ala Asp Glu Gln Ser Ala Lys
 290 295 300
 Ala Ser Ala Ser Val Ser Asp Ala Ile Ser Asp Gly Met Arg Gly Val
 305 310 315 320
 Gly Asn Phe Val Asp Phe Gly Gly Glu Ser Ser Gln Tyr Gly Thr
 325 330 335
 Gly Asn Ser Glu Met Asp Leu Ser Val Ser Leu Ala Lys Gly Gln Leu
 340 345 350
 Gly Ile Asp Arg Glu Gly His Gly Ser Ala Trp Glu Ser Phe Leu Asn
 355 360 365
 Asp Gly Ala Leu Arg Pro Ser Ile Pro Thr Gly His Gly Cys Thr Asn
 370 375 380
 Phe Val Met Tyr Gln Gly Ser Val Tyr Gln Ile Glu Ile Gly Cys Asp
 385 390 395 400
 Lys Leu Asn Asp Ile Lys Ser Val Leu Ser Trp Val Met Tyr Cys Leu
 405 410 415
 Thr Phe Trp Tyr Val Phe Gln Ser Val Thr Ser Leu Leu Arg Lys Gly
 420 425 430
 Glu Gln
 <210> 7
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <221> Nguồn

```

<223> /Lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: trình tự liên ứng tổng hợp"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (35)..(35)
<223> /Thay="Ile"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (35)..(35)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> /Thay="Lys"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (44)..(44)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (48)..(48)
<223> /Thay="Pro"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (48)..(48)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (72)..(72)
<223> /Thay="Asn"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (72)..(72)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (77)..(77)
<223> /Thay="Ile"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (77)..(77)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (81)..(81)
<223> /Thay="Leu"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (81)..(81)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (84)..(84)
<223> /Thay="Thr"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (84)..(84)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (86)..(86)
<223> /Thay="Asn"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (86)..(86)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (105)..(105)
<223> /Thay="Gly"
<220>
<221> Trình tự lỗi

```

```

<222> (105)..(105)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (121)..(121)
<223> /Thay="Ile"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (121)..(121)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (153)..(153)
<223> /Thay="Phe"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (153)..(153)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (185)..(185)
<223> /Thay="Ser"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (185)..(185)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (201)..(201)
<223> /Thay="Pro"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (201)..(201)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (206)..(206)
<223> /Thay="Leu"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (206)..(206)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (243)..(243)
<223> /Thay="Ser"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (243)..(243)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (248)..(248)
<223> /Thay="Ser"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (248)..(248)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (272)..(272)
<223> /Thay="Val"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (272)..(272)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (292)..(292)
<223> /Thay="Tyr"

```

```

<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (292)..(292)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (327)..(327)
<223> /Thay="Phe"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (327)..(327)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (336)..(336)
<223> /Thay="Thr"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (336)..(336)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (356)..(356)
<223> /Thay="Arg"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (356)..(356)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (378)..(378)
<223> /Thay="Thr"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (378)..(378)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (384)..(384)
<223> /Thay="Asn"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (384)..(384)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (388)..(388)
<223> /Thay="Tyr"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (388)..(388)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (395)..(395)
<223> /Thay="Ile"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (396)..(396)
<223> /Thay="Glu"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (395)..(396)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (403)..(403)
<223> /Thay="Asn"
<220>

```

```

<221> Trình tự lỗi
<222> (403)..(403)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối với
các vị trí này"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (425)..(425)
<223> /Thay="Val"
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (425)..(425)
<223> Lưu ý="Các gốc nêu trong trình tự không ưu tiên liên quan đến các gốc được chú thích đối
với các vị trí này"
<400> 7
Met Lys Arg Lys Ile Ile Ala Ile Ser Leu Phe Leu Tyr Ile Pro Leu
1          5          10          15
Ser Asn Ala Asp Asn Trp Glu Ser Ile Thr Lys Ser Tyr Thr Gly
          20          25          30
Phe Ala Met Ser Lys Thr Val Glu Ser Lys Asp Gln Asp Gly Lys Thr
          35          40          45
Val Arg Lys Glu Val Ile Thr Gln Ala Asp Leu Thr Thr Ala Cys Asn
          50          55          60
Asp Ala Lys Ala Ser Ala Gln Asp Val Phe Asn Gln Met Lys Leu Thr
          65          70          75          80
Phe Ser Gly Ile Trp Pro Asp Ser Gln Phe Arg Leu Val Thr Gly Asp
          85          90          95
Thr Cys Val Tyr Asn Gly Ser Pro Ser Glu Lys Thr Glu Ser Trp Ser
          100          105          110
Ile Arg Ala Gln Val Glu Gly Asp Met Gln Arg Ser Val Pro Asp Glu
          115          120          125
Glu Pro Ser Glu Gln Thr Pro Glu Glu Ile Cys Glu Ala Lys Pro Pro
          130          135          140
Ile Asp Gly Val Phe Asn Asn Val Ser Lys Gly Asp Glu Gly Gly Phe
          145          150          155          160
Tyr Ile Asn Tyr Asn Gly Cys Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Val Thr Val
          165          170          175
Cys Gln Asn Asp Gly Thr Val Cys Ala Ser Ser Ala Trp Lys Pro Thr
          180          185          190
Gly Tyr Val Pro Glu Ser Gly Glu Ser Ser Ser Ser Pro Val Lys Asp
          195          200          205
Gly Asp Thr Gly Gly Thr Gly Glu Gly Gly Ser Asp Thr Gly Gly Asp
          210          215          220
Thr Gly Gly Gly Asp Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Asp Thr Gly
          225          230          235          240
Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Ser
          245          250          255
Thr Gly Lys Ser Leu Thr Lys Glu Asp Val Thr Ala Ala Ile His Asp
          260          265          270
Ala Ser Pro Ser Ile Gly Asp Ala Val Lys Asp Ser Leu Thr Glu Asp
          275          280          285
Asn Asp Gln Asn Asp Asn Gln Lys Lys Ala Asp Glu Gln Ser Ala Lys
          290          295          300
Ala Ser Ala Ser Val Ser Asp Ala Ile Ser Asp Gly Met Arg Gly Val
          305          310          315          320
Gly Asn Phe Val Asp Asp Leu Gly Gly Glu Ser Ser Gln Tyr Gly Ile
          325          330          335
Gly Asn Ser Glu Met Asp Leu Ser Val Ser Leu Ala Lys Gly Gln Leu
          340          345          350
Gly Ile Asp Leu Glu Gly His Gly Ser Ala Trp Glu Ser Phe Leu Asn
          355          360          365
Asp Gly Ala Leu Arg Pro Ser Ile Pro Ser Gly His Gly Cys Thr Asp
          370          375          380
Phe Val Met Phe Gln Gly Ser Val Tyr Gln Leu Asp Ile Gly Cys Asp
          385          390          395          400
Lys Leu Gly Asp Ile Lys Ser Val Leu Ser Trp Val Met Tyr Cys Leu
          405          410          415
Thr Phe Trp Tyr Val Phe Gln Ser Ala Thr Ser Leu Leu Arg Lys Gly
          420          425          430
Glu Gln

```

```

<210> 8
<211> 460
<212> PRT
<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
<400> 8
Met Lys Lys Ile Ile Ile Ala Leu Phe Phe Ala Pro Phe Phe Thr His
1          5          10          15
Ala Thr Thr Asp Ala Glu Cys Leu Ser Lys Pro Ala Phe Asp Gly Thr
          20          25          30

```

Leu Ser Asn Val Trp Lys Glu Gly Asp Ser Arg Tyr Ala Asn Phe Glu
 35 40 45
 Asn Cys Ile Tyr Glu Leu Ser Gly Ile Gly Ile Gly Tyr Asp Asn Asp
 50 55 60
 Thr Ser Cys Asn Gly His Trp Thr Pro Val Arg Ala Ala Asp Gly Ser
 65 70 75 80
 Gly Asn Gly Gly Asp Asp Asn Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asn Gly Asp
 85 90 95
 Ser Gly Asn Asn Ser Thr Pro Asp Thr Val Thr Pro Gly Gln Thr Val
 100 105 110
 Asn Leu Pro Ser Asp Leu Ser Thr Leu Ser Ile Pro Ala Asn Val Val
 115 120 125
 Lys Ser Asp Ser Ile Gly Ser Gln Phe Ser Leu Tyr Thr Asn Ala Ser
 130 135 140
 Cys Thr Met Cys Ser Gly Tyr Tyr Leu Ser Asn Asn Ala Asp Ser Ile
 145 150 155 160
 Ala Ile Ala Asn Ile Thr Glu Thr Val Lys Ala Asp Tyr Asn Gln Pro
 165 170 175
 Asp Met Trp Phe Glu Gln Thr Asp Ser Asp Gly Asn His Val Lys Ile
 180 185 190
 Leu Gln Asn Ser Tyr Lys Ala Val Ser Tyr Asn Val Glu Ser Lys Gln
 195 200 205
 Ser Asp Val Asn Asn Pro Thr Tyr Ile Asn Tyr Ser Tyr Ser Val Asn
 210 215 220
 Val Lys Gln Val Ser Tyr Asp Thr Ser Asn Val Cys Ile Met Asn Trp
 225 230 235 240
 Glu Thr Phe Gln Asn Lys Cys Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Ile Thr
 245 250 255
 Asp Thr Val Thr Pro Ser Tyr Ser Arg Asn Ile Thr Ile Gln Ser Asn
 260 265 270
 Ile Asn Tyr Gln Gly Ser Asn Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 275 280 285
 Gly Ser Gly Asn Asp Gly Gly Gly Thr Gly Asn Asn Gly Asn Gly Thr
 290 295 300
 Gly Asp Phe Asp Tyr Val Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Asp Ala Leu
 305 310 315 320
 Thr Glu Ser Phe Asp Leu Ser Ala Leu Gln Ala Asp Thr Gly Ala Ser
 325 330 335
 Leu Asp Gly Ser Val Gln Gly Thr Leu Asp Ser Leu Ser Gly Phe Ser
 340 345 350
 Asp Ser Ile Gly Gly Leu Val Gly Asn Gly Ser Ala Ile Ser Gly Glu
 355 360 365
 Phe Ala Gly Ser Ser Ala Ala Met Asn Ala Ile Gly Glu Gly Asp Lys
 370 375 380
 Ser Pro Leu Leu Asp Ser Leu Ser Phe Leu Lys Asp Gly Leu Phe Pro
 385 390 395 400
 Ala Leu Pro Glu Phe Lys Gln Cys Thr Pro Phe Val Phe Ala Pro Gly
 405 410 415
 Lys Glu Tyr Glu Phe Ile Ile Glu Cys Lys Tyr Ile Asp Met Phe Lys
 420 425 430
 Gly Ile Phe Ala Phe Ile Leu Tyr Phe Thr Thr Phe Val Thr Val Tyr
 435 440 445
 Asp Ser Phe Ser Gly Ile Leu Arg Lys Gly Arg Gly
 450 455 460
 <210> 9
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
 <400> 9
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Met Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro
 20 25 30
 His Thr Glu Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu
 35 40 45
 Asp Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val
 50 55 60
 Val Val Cys Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro
 65 70 75 80
 Ile Gly Leu Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu
 100 105 110
 Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp
 115 120 125
 Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro
 130 135 140
 Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn
 145 150 155 160

Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val
 165 170 175
 Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val
 180 185 190
 Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp
 195 200 205
 Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr
 210 215 220
 Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
 245 250 255
 Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Ser Gly Ala Met Val Arg Ser Pro Pro Cys Pro Ser Cys
 275 280 285
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 290 295 300
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 305 310 315 320
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 325 330 335
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 340 345 350
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 355 360 365
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 370 375 380
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 405 410 415
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 420 425 430
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 435 440 445
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 450 455 460
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 465 470 475 480
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 485 490 495
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500 505

<210> 10

<211> 6407

<212> DNA

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 10

aacgctacta ctattagtag aattgatgcc accttttcag ctgcgcgccc aaatgaaaat 60
 atagctaaac aggttattga ccatttgcga aatgtatcta atgggtcaaac taaatctact 120
 cgttcgcaga attgggaatc aactgttaca tggaatgaaa ctccagacaca cgtactttta 180
 gttgcatatt taaaacatgt tgagctacag caccagattc agcaattaag ctctaagcca 240
 tccgcaaaaa tgacctctta tcaaaaggag caattaaagg tactctctaa tccctgacctg 300
 ttggagtttg ctcccggtct gggtcgcttt gaagctcgaa ttaaaacgag atatttgaag 360
 tctttcgggc ttctctctaa tctttttgat gcaatccgct ttgcttctga ctataatagt 420
 cagggtaaag acctgatttt tgatttatgg tcattctcgt tttctgaact gtttaaagca 480
 tttgaggggg attcaatgaa tatttatgac gattccgcag tattggacgc tatccagtct 540
 aaacatttta ctattacccc ctctggcaaa acttcttttg caaaagcctc tcgctatttt 600
 gggtttttatc gtcgtctggt aaacgagggt tatgatagt tgctctttac tatgcctcgt 660
 aattcctttt ggcgttatgt atctgcatta gttgaatgtg gtattcctaa atctcaactg 720
 atgaatcttt ctacctgtaa taatgtttgt ccgttagtcc gttttattaa cgtagatttt 780
 tcttcccaac gtctcgactg gtataatgag ccagttctta aaatcgcata aggtaatcca 840
 caatgattaa agttgaaatt aaaccatctc aagcccaatt tactactcgt tctggtgttt 900
 ctgcgtcagg caagccttat tcaactgaat agcagctttg ttaogttgat ttgggtaatg 960
 aatatccggt tcttgtcaag attactcttg atgaaggtca gccagcctat gcgcctggtc 1020
 tgtacaccgt tcatctgtcc tctttcaaag ttggtcagtt cggttccctt atgattgacc 1080
 gtctgcgcct cggtccggtt aagtaacatg gagcaggtcg cggatttcca cacaatttat 1140
 caggcgatga tacaatctc cggtgtactt tgtttcgcgc ttgggtataat cgctgggggt 1200
 caaagatgag tgttttagtg tattctttcg cctctttcgt ttaggttggtg tgccttcgta 1260
 gtggcattac gtattttacc cgtttaaatg aaacttctc atgaaaaagt cttagtctct 1320
 caaagcctct gtagccgttg ctacccctcg tccgatgctg tctttcgtg ctgagggtga 1380
 cgatcccgca aaagcggcct ttaactcctt gcaagcctca gcgaccgaat atatcggtta 1440
 tgcgtgggag atggttgttg tcattgtcgg cgcaactatc ggtatcaagc tgtttaagaa 1500
 attcactcgg aaagcaagct gataaaccca tacaattaaa ggctcctttt ggagcctttt 1560
 tttttggaga ttttcaacgt gaaaaaatta ttattcgcaa ttcttttagt tgttcccttc 1620
 tattctcact ccgtggaac tgttgaaagt tgtttagcaa aaccccatc agaaaattca 1680
 tttactaacg tctggaaga cgacaaaact ttagatcggt acgctaacta tgagggtcgt 1740
 ctgtggaatg ctacaggcgt tgtagtttgt actggtgacg aaactcagtg ttacggtaca 1800

tgggttcccta	ttgggcttgc	tatccctgaa	aatgaggggtg	gtggctctga	gggtggcggt	1860
tctgaggggtg	gcggttctga	gggtggcggt	actaaacctc	ctgagtagcg	tgatacacct	1920
attccgggct	atacttatat	caaccctctc	gacggcactt	atccgcctgg	tactgagcaa	1980
aaccccgcta	atcctaatac	ttctcttgag	gagtctcagc	ctcttaatac	tttcatgttt	2040
cagaataata	ggttccgaaa	taggcagggg	gcattaactg	tttatacggg	cacttttact	2100
caagcgactg	acccggttaa	aacttattac	cagtagactc	ctgtatcatc	aaaagccatg	2160
tatgacgctt	actggaacgg	taaattcaga	gactgcgctt	tccattctgg	ctttaatgag	2220
gatccattcg	tttgtgaata	tcaaggccaa	tcgctcgacc	tgccctcaacc	tccgtgcaat	2280
gctggcgggc	gctctgggtg	tggttctggg	ggcggtctcg	agggtgggtg	ctctgagggt	2340
ggcggttctg	agggtggcg	ctctgaggga	ggcggttccg	gtggtggctc	tggttccggt	2400
gattttgatt	atgaaaagat	ggcaaacgct	aataaggggg	ctatgaccga	aaatgccgat	2460
gaaaaacgcg	tacagtctga	cgctaaaggc	aaacttgatt	ctgtcgctac	tgattacggt	2520
gctgctatcg	atgggtttcat	tggtagcgtt	tccggccttg	ctaattggtaa	tggtgctact	2580
ggtagttttg	ctggctctaa	ttcccaaatg	gctcaagtgc	gtgacgggtg	taattcacct	2640
ttaatgaata	atttccgtca	atattttacct	tccctccctc	aatcggttga	atgtcgccct	2700
tttgtcttta	gcgctggtaa	accatatgaa	ttttctattg	attgtgacaa	aataaactta	2760
ttccgtgggtg	tctttgctgt	tcttttataat	gttgccacct	ttatgtatgt	attttctacg	2820
tttgtctaaca	tactgttgaa	taaggagctc	taatcatgcc	agttcttttg	ggtagtccgt	2880
tattattgcg	tttctcgggt	ttccttctgg	taactttgtt	cggtctatctg	cttacttttc	2940
ttaaaaagg	cttcggtaag	atagctattg	ctatttcatt	gtttcttgct	cttattattg	3000
ggcttaactc	aattctttgtg	ggttatctct	ctgatattag	cgctcaatta	ccctctgact	3060
ttgttccagg	tgttcagttg	attctcccg	ctaattgcgt	tccctgtttt	tatgttattc	3120
tctctgtataa	ggctgctatt	ttcatttttg	acgttaaaca	aaaaatcggt	tcttatttgg	3180
attgggataa	ataatatggc	tgtttatttt	gtaactggca	aattaggctc	tggaaagacg	3240
ctcgtttagcg	ttggtaagat	tcaggataaa	attgtagctg	ggtgcaaaat	agcaactaat	3300
cttgatttaa	ggcttcaaaa	cctccgcgaa	tcggggaggt	tcgctaaaaa	gcctcgcggt	3360
ctragaatac	cggtataagc	ttctatatct	gatttgcttg	ctattgggcg	cggtaatgat	3420
tcctacgatg	aaaataaaaa	cggtctgctt	gttctcgatg	agtgcggtac	ttggtttaat	3480
acccgttctt	ggaatgataa	ggaaagacag	ccgattattg	attggtttct	acatgctcgt	3540
aaattaggat	gggatattat	ttttcttggt	caggacttat	ctattgttga	taaacaggcg	3600
cgttctgcat	tagctgaaca	tgttgtttat	tgtcgctcgc	tggacagaat	tactttacct	3660
tttgtcggtg	cttttatattc	tcttattact	ggctcgaaaa	tgccctctgcc	taaattacat	3720
gttgccggtg	ttaaatatgg	cgattctcaa	ttaaagccct	ctggtgagcg	ttggctttat	3780
actggttaaga	atttgtataa	cgcatatgat	actaaacagg	ctttttctag	taattatgat	3840
tccggtgttt	attcttattt	aacgccttat	ttatcacacg	gtcgggtattt	caaaccatta	3900
aatttaggtc	agaagatgaa	attaaactaa	atatatttga	aaaagttttc	tcgcttctct	3960
tgtcttcgca	ttggatttgc	atcagcattt	acatatagtt	atataacca	acctaaagccg	4020
gaggttaaaa	aggtagtctc	tcagacctat	gattttgata	aattcactat	tgactcttct	4080
cagcgctcta	acttaagcta	tcgctatggt	ttcaaggatt	ctaagggaat	attaattaat	4140
agcgacgatt	tacagaagca	aggttattca	ctcacatata	ttgatttatg	tactgtttcc	4200
attaaaaaag	gtaattcaaaa	tgaattgttt	aaatgtaatt	aattttgttt	tcttgatggt	4260
tgtttcatca	tcttcttttg	ctcaggtaat	tgaatgaat	aattcgccct	tgccgcgattt	4320
tgttaacttg	tattcaaaagc	aatcagggca	atccgttatt	gtttctcccg	atgtaaaagg	4380
tactgttact	gtatattcat	ctgacgttaa	acctgaaaat	ctacgcaatt	tctttatttc	4440
tgttttaact	gcaataaatt	ttgatatggt	aggttctatt	ccttccatta	ttcagaagta	4500
taatccaaac	aatcaggatt	atattgatga	attgccatca	tctgataatc	aggaatatga	4560
tgataaattc	aatctctctg	gtgttttctt	tgttccgcaa	aatgataatg	ttactcaaac	4620
ttttaaaatt	aataacgttc	gggcaagga	tttaatacga	gttgcgaat	tgtttgtaaa	4680
gtctaaatac	tctaaatcct	caaatgtatt	atctattgac	ggctctaatac	tattagtgtg	4740
tagtgctcct	aaagatatatt	tagataacct	tccctcaattc	ctttcaactg	ttgatttgcc	4800
aactgaccag	atattgatgg	agggtttgat	atttgagggt	cagcaagggtg	atgctttaga	4860
tttttcatct	gctgctgggt	ctcagcggtg	cactgttgca	ggcggtgtta	atactgaccg	4920
cctcaccctc	gttttatctt	ctgctgggtg	ttcggtccgt	atttttaaatg	gcgatgtttt	4980
agggtctatc	gttcgcgcac	taaagactaa	tagccattca	aaaatatgtt	ctgtgccacg	5040
tattctttacg	gtttcagggt	agaagggttc	tatctctgtt	ggccagaatg	tcccttttat	5100
tactggtcgt	gtgactgggt	aatctgccaa	tgtaaataat	ccatttcaga	cgattgagcg	5160
tcaaaatgta	ggatattcca	tgagcggttt	tccgtgttga	atggctggcg	gtaatatgtt	5220
tctggatatt	accagcaagg	ccgatagttt	gagttctctc	actcaggcaa	gtgatgttat	5280
tactaatcaa	agaagtattg	ctacaacggt	taattttcgt	gatggacaga	ctcttttact	5340
cggtggcctc	actgattata	aaaacacttc	tcaggattct	ggcgtagcgt	tccgtgtctaa	5400
aatcccttta	atcggcctcc	tgttttagctc	ccgctctgat	tctaacgagg	aaagcacggt	5460
atacgtgctc	gtcaaaagcaa	ccatagtagc	cgccctgtag	cgcgccatta	agcgcgcggt	5520
gtgtgggtgt	tacgcgcagc	gtgacgcgta	cacttgccag	cgccctagcg	cccgtcctt	5580
tcgctttctt	cccttccctt	ctcgcacagt	tcgcggctt	tcccgctcaa	gctctaaatc	5640
gggggctccc	tttaggggtc	cgatttagtg	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	5700
atttgggtga	tggttcacgt	agtgggcat	cgccctgata	gacgggtttt	cgccctttga	5760
cgttgagtc	caggttcttt	aatagtggac	tctgtttcca	aactggaaca	acactcaacc	5820
ctatctcggt	ctattctttt	gatttataag	ggattttgct	gatttcggcc	tattggttaa	5880
aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattttta	caaaatatta	acgtttacaa	5940
tttaaatatt	tgcttatata	atcttctcgt	ttttggggct	tttctgatta	tcaaccgggg	6000
tacatatgat	tgacatgcta	gtttttacgat	taccgttcat	cgatttctct	gtttgctcca	6060
gactctcagg	aatgacctg	atagcctttg	tagacctctc	aaaaatagct	acctctccg	6120
gcatttaatt	atcagctaga	acggttgaat	atcatattga	tggtgatttg	actgtctccg	6180
gcctttctca	cccttttgaa	tctttaccta	cacattactc	aggcattgca	tttaaaatat	6240
atgaggggtc	taaaaaattt	tatccttgcg	ttgaaataaa	ggcttctccc	gcaaaagtat	6300
tacaggggtc	taattctttt	ggtagaacgg	atttagcttt	atgctctgag	gctttattgc	6360
tttaattttgc	taattctttg	ccttgccctg	atgatttatt	ggatgtt		6407

<210> 11

<211> 506

<212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 11

```

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1      5      10      15
Val Thr Asn Ser Met Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro
      20      25      30
His Thr Glu Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu
      35      40      45
Asp Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val
      50      55      60
Val Val Cys Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro
      65      70      75      80
Ile Gly Leu Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Ser Glu Gly Gly
      85      90      95
Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu
      100      105      110
Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp
      115      120      125
Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro
      130      135      140
Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn
      145      150      155      160
Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Phe
      165      170      175
Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val
      180      185      190
Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp
      195      200      205
Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr
      210      215      220
Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly
      225      230      235      240
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ser Glu
      245      250      255
Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly
      260      265      270
Gly Ser Gly Ser Gly Ala Met Val Arg Ser Pro Pro Cys Pro Ser Cys
      275      280      285
Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      290      295      300
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      305      310      315      320
Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
      325      330      335
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      340      345      350
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      355      360      365
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      370      375      380
Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      385      390      395      400
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
      405      410      415
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      420      425      430
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      435      440      445
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      450      455      460
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
      465      470      475      480
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      485      490      495
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      500      505

```

<210> 12

<211> 6407

<212> DNA

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 12

```

aacgctacta ctattagtag aattgatgcc accttttcag ctgcgcgcc aaatgaaaat 60
atagctaaac aggttattga ccatttgcca atgttatcta atggtcaaac taaatctact 120
cgttcgagaa attgggaatc aactgttaca tggaatgaaa ctccagaca ccgtacttta 180
gttgcatatt taaaacatgt tgagctacag caccagattc agcaattaag ctctaagcca 240
tcgcgaaaaa tgacctctta tcaaaaggag caattaaagg tactctctaa tcctgacctg 300
ttggagtttg ctccgggtct gggttcgctt gaagctcgaa ttaaaacgcg atatttgaag 360
tctttcgggc ttctctctaa tctttttgat gcaatccgct ttgcttctga ctataatagt 420

```

cagggtaaag	acctgatttt	tgatttatgg	tcatttctcg	tttctgaact	gtttaaagca	480
tttggggggg	attcaatgaa	tatttatgac	gattccgcag	tattggagcg	tatccagtc	540
aaacattttta	ctattaccoc	ctctggcaaa	acttcttttg	caaaagcctc	tcgctatttt	600
gggtttttatc	gtcgtctggg	aaacgagggg	tatgatagtg	ttgctcttac	tatgctcgt	660
aattcctttt	ggcgttatgt	atctgcatta	gttgaatgtg	gtattcctaa	atctcaactg	720
atgaatcttt	ctacctgtaa	taatgttggt	ccgttagttc	gttttattaa	cgtagatttt	780
tcttcccaac	gtcctgactg	gtataatgag	ccagttctta	aaatcgcata	aggtaattca	840
caatgattaa	agttgaaatt	aaaccatctc	aagcccaatt	tactactcgt	tctggtgttt	900
ctcgtcaggg	caagccttat	tcactgaatg	agcagctttg	ttacgttgat	ttgggtaatg	960
aatatccggg	tcttgtcaag	attactcttg	atgaaggtea	gccagcctat	gcgcctgggc	1020
tgtacaccgt	tcactgtgct	tctttcaag	ttgggtcagtt	cgggtccctt	atgattgacc	1080
gtctgcgcct	cgttccggct	aagtaacatg	gagcaggtcg	cggatttcga	cacaatttat	1140
caggcgatga	tacaaatctc	cgttgacttt	tgtttcgcgc	ttgggtataat	cgtctggggg	1200
caaagatgag	tggtttatgt	tattctttcg	cctctttcgt	tttaggttgg	tgccctcgta	1260
gtggcatttc	gtattttacc	cgtttaatgg	aaacttcctc	atgaaaaagt	ctttagtctt	1320
caaagcctct	gtagccgttg	ctaccctcgt	tccgatgctg	tctttcgtcg	ctgaggggtga	1380
cgatcccgca	aaagcggcct	ttaactccct	gcaagcctca	gcgaccgaat	atatcgggtta	1440
tgcggtggcg	atgggtgttg	tcattgtcgg	cgcaactatc	ggatcaaacg	tggttaagaa	1500
attcaactcg	aaagcaagct	gataaacga	tacaattaaa	ggctcccttt	ggagcctttt	1560
tttttgagaga	ttttcaacgt	gaaaaaatta	ttattcgcaa	ttcctttagt	tgctcctttc	1620
tattctcact	ccgtgaaac	tggtgaaagt	tgtttagcaa	aaacccatac	agaaaattca	1680
tttactaacg	tctggaaga	cgacaaaact	ttagatcggt	acgctaacta	tgagggtctg	1740
ctgtggaatg	ctacagagct	tgtagtttgt	actggtagcg	aaactcagtg	ttacggtaga	1800
tggttcccta	ttgggcttgc	tatccctgaa	aatgaggggtg	gtggctctga	gggtggcggt	1860
tctgaggggtg	ggcgttctga	gggtggcggt	actaaacctc	ctgagtagcg	tgatacacct	1920
attccggggt	atacttatat	caaccctctc	gacggcactt	atccgcctgg	tactgagcaa	1980
aaaccccgca	atccctaatc	ttctcttgag	gagttctcag	ctcttaatac	tttcagtgtt	2040
cagaataata	ggttccgaaa	taggcagggg	gcattaactg	tttatacggg	cacttttact	2100
caaggcactg	accocgttaa	aaactattac	cagtacactc	ctgtatcatc	aaaagccatg	2160
tatgacgctt	actggaacgg	taaattcaga	gactgcgctt	tccattctgg	ctttaatgag	2220
gatccattcg	tttgtgaata	tcaaggccaa	tcgtctgacc	tgccccaacc	tctgtcaat	2280
gctggcgcg	gctctgggtg	tggttctggt	ggcggtctcg	agggtgggtg	ctctgagggg	2340
ggcggttctg	agggtggcg	ctctgagggg	ggcggttccg	gtgggtggctc	tggttccggg	2400
gattttgatt	atgaaaagat	ggcaaacgct	aataaggggg	ctatgaccga	aaatgccgat	2460
gaaaacgcgc	tacagttctg	cgctaaagcg	aaacttgatt	ctgtcgctac	tgattacggg	2520
gctgctatcg	atggtttcat	tggtgacgtt	tccggccttg	ctaagtgtaa	tggtgctact	2580
gggtgattttg	ctgggtctaa	ttcccaaatg	gctcaagtcg	gtgacgggtg	taattcacct	2640
ttaatgaata	atttccgtca	atatttacct	tccctccctc	aatcggttga	atgtcgcctt	2700
tttgtctttg	gcgctggtaa	accatatgaa	ttttctattg	attgtgacaa	aataaactta	2760
ttccgtgggtg	ttcttgcgtt	tcttttatat	gttgccacct	ttatgtatgt	attttctacg	2820
tttgctaaca	tactgcgtaa	taaggagtct	taatcatgcc	agttcttttg	ggtattccgt	2880
tattatttgcg	tttccctcgt	ttccttctgg	taactttgtt	cggctatctg	cttacttttc	2940
ttaaaaaggg	cttcggtaag	atagctattg	ctatttcatt	gtttcttgct	cttattattg	3000
ggcttaactc	aatctcttgc	ggttatctct	ctgatattag	cgtcctaatta	ccctctgact	3060
ttgttcaggg	tggttcagtt	attctcccgt	ctaattgcgt	tccctgtttt	tatgttattc	3120
tctctgtaaa	ggctgctatt	ttcatttttg	acgttaaaaa	aaaaatcggt	tcttattttg	3180
attgggataa	ataaatatgg	tggtttattt	gtaactggca	aattaggctc	tggaagaagc	3240
ctcggttagcg	ttggttaagt	tcaggataaa	attgtagctg	gggtcaaaaat	agcaactaat	3300
cttgatttaa	ggcttcaaaa	cctcccgcaa	gtcgggaggt	tcgctaaaaac	gcctcgcggt	3360
cttagaatac	cggataagcc	ttctatatct	gatttgcttg	ctattggggc	cggtaatgat	3420
tcctacagat	aaaataaaaa	cggcttgctt	gttctcgatg	agtgcggtac	ttgggttaat	3480
accggttctt	ggaatgataa	ggaaagacag	ccgattattg	attgggtttc	acatgctcgt	3540
aaattaggtat	gggatattat	ttttcttggt	caggacttat	ctattgttga	taaacaggcg	3600
cgttctgcgt	tagctgaaca	tggtgtttat	tgctcgtcgt	tggaacagaat	tactttacct	3660
tttgtcggtg	cttttatatt	tcttattact	ggctcgaaaa	tgctctgccc	taaattacat	3720
gttgccgttg	tttaaatatg	cgattctcaa	ttaaagcccta	ctgttgagcg	ttggctttat	3780
actggtaaga	atttgtataa	cgcataatgat	actaaacagg	ctttttctag	taattatgat	3840
tccggtgttt	attcttattt	aacgccttat	ttatcacacg	gtcgggtattt	caaacattta	3900
aatattaggtc	agaagatgaa	attaactaaa	atataattga	aaaagttttc	tcgcgttctt	3960
tgtcttcgca	ttggattttg	atcagcattt	acatatagtt	atataacca	acctaagccg	4020
gagggttaaaa	aggtagtctc	tcagacctat	gattttgata	aattcactat	tgactcttct	4080
cagcgtctta	atctaagcta	tcgctatggt	ttcaaggatt	ctaagggaat	attaattaat	4140
agcgacgatt	tacagaagca	aggttattca	ctcacatata	ttgatttatg	tactgtttcc	4200
attaaaaaag	gtaattcaaa	tgaaattggt	aaatgtaatt	aattttgttt	tcttgatgtt	4260
tgtttcatca	tcttcttttg	ctcaggtaat	tgaaatgaat	aattcgcttc	tgcgcgattt	4320
tgtaacttgg	tattcaaaag	aatcaggcga	atccgttatt	gtttctcccg	atgtaaaaag	4380
tactgttact	gtaatttcat	ctgacgttaa	acctgaaaaat	ctacgcaatt	tctttatttc	4440
tgttttacgt	gcgaataaatt	ttgatatggt	aggttctaac	ccttccatta	ttcagaagta	4500
taatccaaac	aatcaggatt	atattgatga	attgccatca	tctgataatc	aggaatatga	4560
tgataattoc	gtcctctctg	gtgggttctt	tgttccgcaa	aatgataatg	ttactcaaac	4620
ttttaaaaat	aataacgttc	gggcaaggga	tttaatacga	gttgctgaat	tgtttgtaaa	4680
gtctaatact	tctaatacct	caaatgtatt	atctattgac	ggctctaata	tattagtgtg	4740
tagtgctcct	aaagatatatt	tagataacct	tcccaatttc	ctttcaactg	ttgatttgcc	4800
aaactgaccg	atattgattg	agggtttgat	atttgagggtt	cagcaagggtg	atgctttaga	4860
tttttcattt	gctgctgggt	ctcagcggtg	cactgttgca	ggcggtgtta	atactgaccg	4920
cctcacctct	gttttatctt	ctgctgggtg	ttcgctcggt	atttttaagt	gcgatgtttt	4980
agggctatca	gttcgcgcgt	taaagactaa	tagccattca	aaaatattgt	ctgtgccacg	5040
tattcttaacg	ctttcagggtc	agaagggttc	tatctctggt	ggccagaatg	tcccttttat	5100
tactggctcg	gtgactgggtg	aatctgccaa	tgtaataaat	ccatttcaga	cgattgagcg	5160

```

tcaaaatgta ggtatttcca tgagcgtttt tctgttgca atggctggcg gtaatattgt 5220
tctggatatt accagcaagg ccgatagttt gagttcttct actcaggcaa gtgatgttat 5280
tactaatcaa agaagtattg ctacaacggt taatttgcgt gatggacaga ctcttttact 5340
cggtggcctc actgattata aaaacacttc tcaggattct ggcgtagcgt tctgttctaa 5400
aatcccttta atcggcctcc tgttttagctc ccgctctgat tctaacgagg aaagcacgtt 5460
atacgtgctc gtcaaagcaa ccatagtacg cgccctgtag cggcgacatta agcggggcgg 5520
gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctectt 5580
tcgctttctt cccttctctt ctgcgccagt tcgcccgtt tccccgtcaa gctctaaatc 5640
gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 5700
atttgggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata gacggttttt cgccctttga 5760
cgttggagtc caagttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc 5820
ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattgggtta 5880
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaaatatta acgtttacaa 5940
tttaaattatt tgcttataca atcttctctg ttttggggct tttctgatta tcaaccgggg 6000
tacatatgat tgacatgcta gttttacgat taccgttcat cgattctctt gtttgctcca 6060
gactctcagg caatgacctg atagcctttg tagacctctc aaaaatagct accctctccg 6120
gcattaattt atcagctaga acggttgaat atcatattga tgggtatttg actgtctccg 6180
gccttttctc cccttttgaa tctttacctc cacattactc aggcattgca tttaaaatat 6240
atgagggttc taaaaatttt tatccttgcg ttgaaataaa ggcttctccc gcaaaagtat 6300
tacagggtca taatgttttt ggtacaaccg atttagcttt atgctctgag gctttattgc 6360
ttaattttgc taattctttg ccttgctgtg atgatttatt ggatgtt 6407

```

<210> 13

<211> 509

<212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 13

```

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Val Thr Asn Ser Met Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro
20 25 30
His Thr Glu Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu
35 40 45
Asp Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val
50 55 60
Val Val Cys Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro
65 70 75 80
Ile Gly Leu Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly
85 90 95
Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu
100 105 110
Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp
115 120 125
Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro
130 135 140
Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn
145 150 155 160
Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Phe
165 170 175
Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val
180 185 190
Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp
195 200 205
Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr
210 215 220
Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly
225 230 235 240
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
245 250 255
Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly
260 265 270
Gly Ser Gly Ser Gly Ala Met Val Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
275 280 285
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
290 295 300
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
305 310 315 320
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
325 330 335
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
340 345 350
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
355 360 365
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
370 375 380
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
385 390 395 400
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
405 410 415
Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

```

420 425 430
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 435 440 445
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 450 455 460
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 465 470 475 480
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 485 490 495
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500 505

<210> 14

<211> 131

<212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 14

Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr
 1 5 10 15
 Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro
 20 25 30
 Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe
 35 40 45
 Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val
 50 55 60
 Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn
 85 90 95
 Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro
 100 105 110
 Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro
 115 120 125
 Val Asn Ala
 130

<210> 15

<211> 131

<212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 15

Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr
 1 5 10 15
 Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro
 20 25 30
 Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe
 35 40 45
 Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val
 50 55 60
 Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn
 85 90 95
 Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro
 100 105 110
 Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro
 115 120 125
 Val Asn Ala
 130

<210> 16

<211> 131

<212> PRT

<213> Thực khuẩn thể Enterobacteria

<400> 16

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

130
 <210> 17
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
 <400> 17
 Ser Pro Gly Glu Lys Thr Glu Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gln Val Glu
 1 5 10 15
 Gly Asp Ile Gln Arg Ser Val Pro Asp Glu Glu Pro Ser Glu Gln Thr
 20 25 30
 Pro Glu Glu Ile Cys Glu Ala Lys Pro Pro Ile Asp Gly Val Phe Asn
 35 40 45
 Asn Val Phe Lys Gly Asp Glu Gly Gly Phe Tyr Ile Asn Tyr Asn Gly
 50 55 60
 Cys Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Val Thr Val Cys Gln Asn Asp Gly Thr
 65 70 75 80
 Val Cys Ser Ser Ser Ala Trp Lys Pro Thr Gly Tyr Val Pro Glu Ser
 85 90 95
 Gly Glu Pro Ser Ser Ser Pro Leu Lys Asp Gly Asp Thr Gly Gly Thr
 100 105 110
 Gly Glu Gly Gly Ser Asp Thr Gly Gly Asp Thr Gly Gly Asp Thr
 115 120 125
 <210> 18
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
 <400> 18
 Ser Pro Ser Glu Lys Thr Glu Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gln Val Glu
 1 5 10 15
 Gly Asp Met Gln Arg Ser Val Pro Asp Glu Glu Pro Ser Glu Gln Thr
 20 25 30
 Pro Glu Glu Ile Cys Glu Ala Lys Pro Pro Ile Asp Gly Val Phe Asn
 35 40 45
 Asn Val Ser Lys Gly Asp Glu Gly Gly Phe Tyr Ile Asn Tyr Asn Gly
 50 55 60
 Cys Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Val Thr Val Cys Gln Asn Asp Gly Thr
 65 70 75 80
 Val Cys Ala Ser Ser Ser Ser Pro Val Lys Asp Gly Asp Thr Gly Gly Thr
 85 90 95
 Gly Glu Ser Ser Ser Ser Pro Val Lys Asp Gly Asp Thr Gly Gly Thr
 100 105 110
 Gly Glu Gly Gly Ser Asp Thr Gly Gly Asp Thr Gly Gly Asp Thr
 115 120 125
 <210> 19
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
 <400> 19
 Ser Thr Pro Asp Thr Val Thr Pro Gly Gln Thr Val Asn Leu Pro Ser
 1 5 10 15
 Asp Leu Ser Thr Leu Ser Ile Pro Ala Asn Val Val Lys Ser Asp Ser
 20 25 30
 Ile Gly Ser Gln Phe Ser Leu Tyr Thr Asn Ala Ser Cys Thr Met Cys
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Leu Ser Asn Asn Ala Asp Ser Ile Ala Ile Ala Asn
 50 55 60
 Ile Thr Glu Thr Val Lys Ala Asp Tyr Asn Gln Pro Asp Met Trp Phe
 65 70 75 80
 Glu Gln Thr Asp Ser Asp Gly Asn His Val Lys Ile Leu Gln Asn Ser
 85 90 95
 Tyr Lys Ala Val Ser Tyr Asn Val Glu Ser Lys Gln Ser Asp Val Asn
 100 105 110
 Asn Pro Thr Tyr Ile Asn Tyr Ser Tyr Ser Val Asn Val Lys Gln Val
 115 120 125
 Ser Tyr Asp Thr Ser Asn Val Cys Ile Met Asn Trp Glu Thr Phe Gln
 130 135 140
 Asn Lys Cys Asp Ala Ser Arg Ala Val Leu Ile Thr Asp Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Pro
 <210> 20
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Thực khuẩn thể Enterobacteria
 <400> 20
 Met Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ser His Thr Glu Asn
 1 5 10 15
 Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala
 20 25 30
 Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr

```

      35              40              45
Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala
  50              55              60
Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
  65              70              75              80
Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr
      85              90              95
Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro
      100             105             110
Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu
      115             120             125
Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn
      130             135             140
Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr
      145             150             155             160
Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala
      165             170             175
Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His
      180             185             190
Ser Gly Phe Asn Glu Asp Leu Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser
      195             200             205
Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Pro Ser Gly His His His
      210             215             220
His His His
225

```

```

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn
<223> /Lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: trình tự liên ứng tổng hợp
      peptit"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Axit amin bất kỳ

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Axit amin bất kỳ

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Axit amin bất kỳ

```

```

<400> 21
Gly Xaa Phe Xaa Gly Xaa Phe
1              5

```

```

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> Nguồn
<223> /Lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

```

```

<400> 22
Lys Leu Val Phe Phe
1              5

```

```

<210> 23
<211> 684
<212> DNA
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> Nguồn
<223> /Lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"
<400> 23

```

```

atgggtgaaa ctgttgaaag ttgttttagca aaatcccata cagaaaattc atttactaac      60
gtctggaag acgacaaaac tttagatcgt tacgctaact atgagggtg tctgtggaat      120
gctacaggcg ttgtagtttg tactggtgac gaaactcagt gttacggtac atgggttcct      180
attgggcttg ctatccctga aaatgagggt ggtggctctg aggggtggcgg ttctgagggt      240
ggcggttctg aggggtggcgg tactaaacct cctgagtagc gtgatacacc tattccgggc      300

```



```

tatacttata tcaaccctct cgacggcact tatccgctg gtactgagca aaaccccgct 360
aatcctaata cttctcttga ggagtctcag cctcttaata ctttcatgtt tcagaataat 420
aggttccgaa ataggcaggg ggcattaact gtttatacgg gcaactgttac tcaaggcact 480
gaccccgta aaacttatta ccagtacact cctgtatcat caaaagccat gtatgacgct 540
tactggaacg gtaaattcag agactgcgct ttccattctg gctttaatga ggatttattt 600
gtttgtgaat atcaaggcca atcgtctgac ctgcctcaac ctccgtgcaa tgctccgtcc 660
gggcatcatc atcatcatca ttaa 684

```

<210> 24

<211> 227

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /Lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 24

```

Met Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ser His Thr Glu Asn
1      5      10      15
Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala
      20      25      30
Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr
      35      40      45
Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala
      50      55      60
Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
      65      70      75      80
Gly Gly Ser Glu Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr
      85      90      95
Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro
      100     105     110
Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu
      115     120     125
Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn
      130     135     140
Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr
      145     150     155     160
Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala
      165     170     175
Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His
      180     185     190
Ser Gly Phe Asn Glu Asp Leu Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser
      195     200     205
Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Pro Ser Gly His His His
      210     215     220

```

His His His

225

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Nguồn

<223> /Lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo:trình tự đánh dấu 6xHis tổng hợp"

<400> 25

His His His His His His

1

5