



(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)



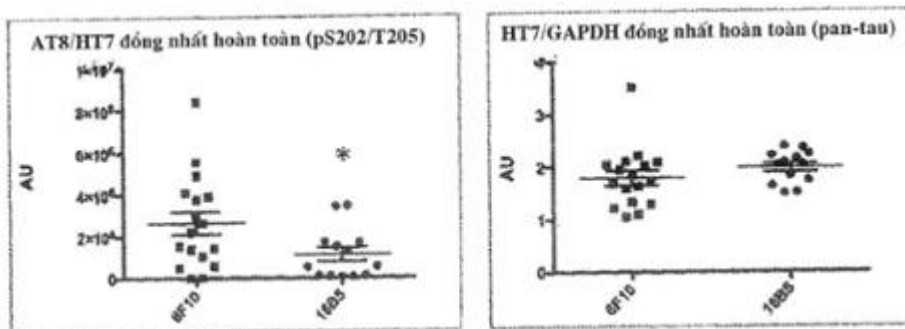
1-0035968

(51)⁷ A61K 39/395; C07K 16/18; A61P 25/28 (13) B

- (21) 1-2015-03645 (22) 12/03/2014
(86) PCT/US2014/025044 12/03/2014 (87) WO2014/165271 09/10/2014
(30) 61/780,624 13/03/2013 US; 61/800,382 15/03/2013 US
(45) 26/06/2023 423 (43) 25/02/2016 335A
(73) PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (IE)
25-28 North Wall Quay, Dublin, 1, Ireland
(72) SEUBERT, Peter (US); DOLAN III, Philip James (US); LIU, Yue (US);
BARBOUR, Robin (US).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG GẮN KẾT VỚI TAU, PHƯƠNG PHÁP NHÂN HÓA KHÁNG THỂ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể cạnh tranh với kháng thể 16B5 để gắn kết với tau. Kháng thể này ức chế hoặc trì hoãn tình trạng bệnh lý liên quan đến tau và triệu chứng thoái biến có liên quan. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit và axit nucleic mã hóa kháng thể này, phương pháp nhân hóa kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể cạnh tranh với kháng thể 16B5 để gắn kết với tau. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit và axit nucleic mã hóa kháng thể này, phương pháp nhân hóa kháng thể và được phẩm chứa kháng thể này. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể nhân hóa, thể khảm hoặc được bọc và phương pháp tạo ra dòng tế bào sản sinh kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tau là protein đã biết của người mà có thể tồn tại ở các dạng đã được phosphoryl hóa (xem, ví dụ tài liệu: Goedert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:4051-4055(1988); Goedert, *EMBO J.* 8:393-399(1989); Lee, *Neuron* 2:1615-1624(1989); Goedert, *Neuron* 3:519-526(1989); Andreadis, *Biochemistry* 31:10626-10633(1992). Đã có thông báo rằng tau có vai trò trong việc làm ổn định các vi ống, đặc biệt là ở hệ thần kinh trung ương. Tau toàn phần (t-tau (total tau), tức là dạng đã được phosphoryl hóa và dạng không được phosphoryl hóa) và phospho-tau (p-tau, tức là tau đã được phosphoryl hóa) được não giải phóng ra khi đáp ứng với tổn thương thần kinh và chứng thoái hóa thần kinh và đã có thông báo rằng các tau này xuất hiện với nồng độ gia tăng trong CSF ở bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer so với nhóm khỏe mạnh (Jack *et al.*, *Lancet Neurol* 9: 119–28 (2010)).

Tau là thành phần chủ yếu của các đám rối sợi thần kinh, cùng với các mảng là đặc tính tiêu chuẩn vàng của bệnh Alzheimer. Các đám rối này cấu thành các sợi bất thường có đường kính 10nm xuất hiện theo cặp được cuộn lại thành dạng xoắn ốc có kích thước trung bình thông thường là 80nm. Tau nằm trong các đám rối sợi thần kinh được phosphoryl hóa một cách bất thường (được siêu phosphoryl hóa) bằng các nhóm phosphat đã được gắn vào các vị trí đặc hiệu trên phân tử. Quan sát thấy sự bọc nghiêm trọng của các đám rối sợi thần kinh xảy ra trong các tế bào thần kinh lớp II của khứu não, các vùng CA1 và hồi hải mã của vùng hải mã, hạch hạnh nhân, và các lớp nằm sâu hơn (lớp III, lớp

V, và lớp VI bề mặt) của vùng tân vỏ não ở bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer. Cũng có thông báo rằng tau đã được siêu phosphoryl hóa cản trở việc lắp ráp vi ống, từ đó có thể thúc đẩy quá trình phá vỡ mạng lưới thần kinh.

Các thể vùi tau là một phần của bệnh lý thần kinh xác định ở một vài bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, liệt trên nhân tiến triển và bệnh Pick.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể đơn dòng vô tính gắn kết với tau, polynucleotit mã hóa kháng thể, phương pháp nhân hóa kháng thể, phương pháp tạo ra kháng thể nhân hóa, thể khảm hoặc được bọc và phương pháp tạo ra dòng tế bào sản sinh kháng thể này.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng cạnh tranh với kháng thể đơn dòng 16B5 để liên kết với tau. Một số kháng thể nhân hóa, thể khảm, được bọc hoặc các kháng thể của người. Một số kháng thể là isotyp IgG của người (ví dụ, IgG1, IgG2, hoặc IgG4). Một số kháng thể này có vùng hằng định IgG1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29. Một số kháng thể có vùng hằng định kappa của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32. Một số kháng thể có ít nhất một đột biến trong vùng hằng định này.

Một số kháng thể trong số các kháng thể này là dạng được nhân hóa, thể khảm hoặc được bọc của kháng thể đơn dòng 16B5. Một số kháng thể có ba chuỗi nhẹ CDR như xác định được theo Kabat và ba chuỗi nặng CDR như xác định được theo Kabat của kháng thể đơn dòng 16B5. Một số kháng thể gắn kết với tau ở dạng đã được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể đơn dòng gắn kết đặc hiệu với epitop nằm ở các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8). Một số kháng thể này là các kháng thể của người, nhân hóa, thể khảm, hoặc được bọc. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 25 đến 44 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 30 đến 39 của trình tự SEQ ID

NO:1. Một số kháng thể gắn kết với tau ở dạng đã được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể đơn dòng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 90% (ví dụ, ít nhất 95%, ít nhất 98%, ít nhất 99%) so với trình tự SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin có mức độ tương đồng ít nhất 90% (ví dụ, ít nhất 95%, ít nhất 98%, ít nhất 99%) so với trình tự SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, kháng thể đơn dòng chứa ba CDR Kabat của trình tự SEQ ID NO:15 và ba CDR Kabat của trình tự SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi của chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:21, 22, hoặc 23.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F, và ít nhất một trong số các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F, và ít nhất hai trong số các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S. Trong một số kháng thể, vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F, và ít nhất ba trong số các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F, và các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi của chuỗi nặng hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Trong một số kháng thể, vùng hằng định của chuỗi nặng là dạng đột biến của vùng hằng định tự nhiên của người có thể làm giảm khả năng gắn kết với thụ thể Fcγ so với vùng hằng định tự nhiên của người. Trong một số kháng thể, vùng hằng định của chuỗi nặng là isotyp IgG1.

Trong một số kháng thể, sự khác nhau trong các CDR của vùng biến đổi của chuỗi nặng hoàn chỉnh và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoàn chỉnh khi so sánh lần lượt với trình tự SEQ ID NO: 15 và 22, là nằm ở các vị trí H60 đến H65.

Các kháng thể có thể là các kháng thể nguyên vẹn hoặc đoạn kháng thể, như đoạn Fab.

Kháng thể hoặc đoạn kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể hoặc đoạn kháng thể đơn dòng có thể được tiếp hợp với tác nhân gây độc tế bào hoặc kim hãm tế bào.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp nhân hóa kháng thể. Một số phương pháp bao gồm các bước: xác định trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhắt; tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được nhân hóa chứa các CDR của chuỗi nặng của kháng thể của chuột nhắt và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được nhân hóa chứa các CDR của chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhắt; và biểu hiện các axit nucleic trong tế bào chủ để tạo ra kháng thể nhân hóa, trong đó kháng thể của chuột nhắt này là 16B5.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp tạo ra kháng thể nhân hóa, thể khảm hoặc được bọc. Một số phương pháp bao gồm các bước: nuôi cấy các tế bào đã được biến nạp với các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của kháng thể, sao cho các tế bào này tiết ra kháng thể; và tinh sạch kháng thể khỏi môi trường nuôi cấy tế bào, trong đó kháng thể này là dạng nhân hóa, thể khảm hoặc được bọc của 16B5.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp tạo ra dòng tế bào sản sinh kháng thể nhân hóa, thể khảm hoặc được bọc. Một số phương pháp bao gồm các bước: đưa vector mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể và gen đánh dấu chọn lọc vào các tế bào; cấy truyền các tế bào trong các điều kiện để chọn ra các tế bào có số bản sao gia tăng của vật truyền; phân lập các tế bào đơn lẻ ra khỏi các tế bào đã được chọn; và thu gom các tế bào đã được tách dòng từ tế bào đơn lẻ đã được chọn dựa trên hiệu suất của kháng thể; trong đó kháng thể này là dạng nhân hóa, thể khảm hoặc được bọc của 16B5.

Sáng chế còn đề xuất các dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ được bọc lộ trong bản mô tả này và chất mang dược dụng.

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic chứa đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10.

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic chứa đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15. Trong một số axit nucleic, phân đoạn có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 25. Một số axit nucleic còn chứa đoạn mã hóa vùng hằng định IgG1, tùy ý chứa vùng hằng định IgG1 của người, ví dụ, có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 với điều kiện lysin có đầu tận cùng C có thể bỏ qua. Trong một số axit nucleic, đoạn mã hóa vùng hằng định IgG1 có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 30. Một số axit nucleic này còn chứa intron liên kết các đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng hằng định IgG1. Ví dụ, intron có thể có trình tự của intron được tìm thấy trong trình tự SEQ ID NO: 31. Do đó, intron và đoạn mã hóa vùng hằng định IgG1 có thể có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 31.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic chứa đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic chứa đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, 22, hoặc 23. Trong một số axit nucleic, đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 26, 27 hoặc 28. Một số axit nucleic này còn chứa đoạn mã hóa vùng hằng định kappa. Vùng hằng định kappa có thể là vùng hằng định kappa của người và có thể có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32. Tùy ý, axit nucleic mã hóa vùng hằng định kappa có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33. Một số axit nucleic này còn chứa intron liên kết đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ với đoạn mã hóa vùng hằng định kappa. Ví dụ, intron có thể có trình tự của intron được tìm thấy trong trình tự SEQ ID NO: 34. Do đó, intron và đoạn mã hóa vùng hằng định kappa có thể có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 34.

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên có thể chứa chuỗi nặng chứa vùng hằng định IgG1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 và/hoặc chuỗi nhẹ chứa vùng hằng định kappa của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32.

Sáng chế còn đề xuất đoạn phân lập được của tau bao gồm 3 đến 10 gốc liên kề của tau nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8). Một số đoạn bao gồm 3 đến 10 gốc liên kề của tau nằm trong các gốc 30 đến 39 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8). Một số đoạn bao gồm các gốc 33 đến

37 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8). Một số đoạn được liên kết với phân tử mang, tùy ý thông qua đoạn đệm để giúp cho các kháng thể kháng đoạn này. Một số đoạn là một phần của được phẩm chứa chất bổ trợ có thể chấp nhận được để dùng cho người.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể này để điều trị hoặc phòng bệnh Alzheimer. Người bệnh mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh Alzheimer được cho dùng phác đồ hữu hiệu chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8), hoặc tác nhân tạo ra kháng thể này, và từ đó tạo ra tác dụng điều trị bệnh hoặc phòng bệnh. Tốt hơn, nếu kháng thể này là kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Trong một số phương án, tác nhân tạo ra kháng thể là một đoạn của tau bao gồm 3 đến 10 gốc liền kề của tau nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO: 1. Trong một số phương án, người bệnh là người mang ApoE4.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể để điều trị hoặc phòng bệnh liên quan đến tau. Người bệnh mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh này được cho dùng phác đồ hữu hiệu chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8), hoặc tác nhân tạo ra kháng thể này, và từ đó tạo ra tác dụng điều trị bệnh hoặc phòng bệnh. Tốt hơn, nếu kháng thể này là kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể 16B5 được nhân hóa). Trong một số phương án, tác nhân tạo ra kháng thể là một đoạn của tau bao gồm 3 đến 10 gốc liền kề của tau nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1. Trong một số phương án, bệnh là bệnh thần kinh.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể để làm giảm khả năng dẫn truyền khác thường của tau. Người bệnh mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh liên quan đến sự dẫn truyền khác thường của tau được cho dùng phác đồ hữu hiệu chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8), hoặc tác nhân tạo ra kháng thể này, và từ đó tạo ra tác dụng điều trị bệnh hoặc phòng bệnh. Tốt hơn, nếu kháng thể này là kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể 16B5 được nhân hóa). Trong một số phương án, tác nhân tạo ra kháng thể là một đoạn của

tau bao gồm 3 đến 10 gốc liền kề của tau nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO: 1.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể cảm ứng quá trình thực bào của tau. Người bệnh mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh liên quan đến quá trình tích tụ tau được cho dùng phác đồ hữu hiệu chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8), hoặc tác nhân tạo ra kháng thể này. Tốt hơn, nếu kháng thể này là kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể 16B5 được nhân hóa). Trong một số phương pháp, tác nhân tạo ra kháng thể là một đoạn của tau bao gồm 3 đến 10 gốc liền kề của tau nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO: 1. Trong một số phương án, bệnh là bệnh thần kinh.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể để ức chế quá trình kết tụ hoặc lắng đọng tau. Theo các phương án nhất định, người bệnh mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh liên quan đến quá trình kết tụ hoặc lắng đọng tau được cho dùng phác đồ hữu hiệu chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8), hoặc tác nhân tạo ra kháng thể này. Tốt hơn, nếu kháng thể này là kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể 16B5 được nhân hóa). Trong một số phương án, tác nhân tạo ra kháng thể là một đoạn của tau bao gồm 3 đến 10 gốc liền kề của tau nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO: 1. Trong một số phương án, bệnh là bệnh thần kinh.

Sáng chế còn đề xuất các kháng thể để ức chế quá trình hình thành các đám rối tau. Người bệnh mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh liên quan đến quá trình hình thành các đám rối tau được cho dùng phác đồ hữu hiệu chứa kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8), hoặc tác nhân tạo ra kháng thể này. Tốt hơn, nếu kháng thể này là kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể 16B5 được nhân hóa). Trong một số phương án, tác nhân tạo ra kháng thể là một đoạn của tau bao gồm 3 đến 10 gốc liền kề của tau nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO: 1. Trong một số phương án, bệnh là bệnh thần kinh.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp sàng lọc tác nhân có hoạt tính kháng lại bệnh Alzheimer. Một số phương pháp bao gồm các bước: cho động vật chuyển gen biểu hiện gen chuyển tau dùng tác nhân này, và xác định xem tác nhân này có ức chế hoặc trì hoãn ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh Alzheimer hay không, trong đó tác nhân này là kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 24 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1 (Swiss-Prot No. P10636-8), hoặc tác nhân tạo ra kháng thể này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện kết quả của các thử nghiệm dùng để lập bản đồ (các) epitop đã được liên kết bởi kháng thể đơn dòng 16B5. Các vết thấm tách Western chứa Tau có chiều dài đầy đủ hoặc các đột biến khuyết của tau (Δ 5-24 hoặc Δ 25-44) được nhuộm bằng các kháng thể 16B5 (ô bên trái) hoặc kháng thể Tau46 (ô bên phải). Kháng thể Tau46 gắn kết với epitop có đầu tận cùng C của tau.

Hình 2 thể hiện kết quả của các thử nghiệm dùng để lập bản đồ (các) epitop đã được liên kết bởi kháng thể đơn dòng 16B5. Các vết thấm tách Western chứa Tau có chiều dài đầy đủ hoặc các đột biến khuyết của tau được nhuộm bằng các kháng thể 16B5 (ô bên trái phía trên) hoặc kháng thể Tau46 (ô bên phải). Quá trình tiếp xúc trong thời gian dài của vết thấm tách đã được nhuộm bằng các kháng thể 16B5 này được thể hiện ở ô bên trái phía dưới. Các đột biến khuyết của tau đã được phân tích trong thử nghiệm này bao gồm Δ 25-44, Δ 5-24, Δ 23-32, Δ 30-39, và Δ 37-46.

Hình 3 thể hiện kết quả của thử nghiệm quét alanin dùng để lập bản đồ (các) epitop đã được liên kết bởi kháng thể đơn dòng 16B5. Các vết thấm tách Western chứa Tau kiểu dại (wild-type Tau - WT) hoặc đột biến điểm alanin của tau được nhuộm bằng các kháng thể 16B5 (ô bên trái) hoặc kháng thể Tau46 (ô bên phải). Đột biến alanin của tau được phân tích trong thử nghiệm này bao gồm T30A, M31A, H32A, Q33A, D34A, Q35A, E36A, G37A, D38A, T39A, D40A, A41L, và G42A.

Hình 4 thể hiện các lượng tương đối của protein tau phát hiện được trong phân đoạn không hòa tan sarkosyl của thân não của chuột nhắt chuyển gen biểu hiện protein tau. P301L của người. Chuột nhắt được gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể 16B5 hoặc

kháng thể 6F10, kháng thể đối chứng isotyp IgG1 không tạo miễn dịch. Các mẫu được phân tích bằng cách thấm tách Western, nhuộm kháng thể, và đo tín hiệu thu được. Các kháng thể dùng để phát hiện tau bao gồm các kháng thể đặc hiệu kháng phospho-tau (AT8, ô bên trái phía trên; AT100, ô bên trái phía dưới; hoặc 1F5, ô bên phải phía trên) và kháng thể pan tau (HT7, ô bên phải phía dưới).

Hình 5 thể hiện tỷ lệ giữa phospho-tau và protein tau toàn phần (ô bên trái) và lượng chuẩn hóa của tau toàn phần (ô bên phải) phát hiện được trong các dịch thân não đồng nhất toàn phần của chuột nhắt chuyển gen biểu hiện protein tau P301L của người. Chuột nhắt được gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể 16B5 hoặc kháng thể 6F10, kháng thể đối chứng isotyp IgG1 không tạo miễn dịch. Các mẫu được phân tích bằng cách thấm tách Western, nhuộm kháng thể, và đo tín hiệu thu được. Kháng thể AT8 đã được dùng để phát hiện phospho-tau và kháng thể HT7 đã được dùng để phát hiện tau toàn phần. Kháng thể kháng GAPDH đã được sử dụng để chuẩn hóa lượng tau phát hiện được ở chuột nhắt đã được điều trị bằng kháng thể 16B5 so với kháng thể đối chứng 6F10.

Hình 6 thể hiện các phần nhân tiểu não của chuột nhắt chuyển gen biểu hiện protein tau. P301L của người, đã được nhuộm hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể kháng phospho-tau AT8. Chuột nhắt đã được gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể 16B5 (ô bên trái phía trên) hoặc kháng thể 6F10 (ô bên trái phía dưới), kháng thể đối chứng isotyp IgG1 không tạo miễn dịch. Việc định lượng lượng tau đã được nhuộm phát hiện được bằng kháng thể AT8 trong nhân tiểu não cài xen, phần trước và sau, nhân tiểu não bên bổ sung (IntA/P/LAT) và vùng bất định bổ sung của nhân thuộc vùng dưới đồi (STH/ZI) thu được từ chuột nhắt đã được gây miễn dịch thụ động bằng các kháng thể 16B5 hoặc 6F10 được thể hiện trong các biểu đồ dạng cột phía trên. Việc định lượng lượng phospho-tau đã được nhuộm phát hiện được bằng cách sử dụng kháng thể kháng phospho-tau AT100 trên các phần IntA/P/LAT và STH/ZI thu được từ chuột nhắt đã được gây miễn dịch thụ động bằng các kháng thể 16B5 hoặc 6F10 được thể hiện trong các biểu đồ dạng cột phía dưới. Mức ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm t của Student, $p < 0,05$.

Hình 7 thể hiện kết quả của quá trình kết tủa miễn dịch tau thu được bằng các kháng thể 16B5 thể khảm và các kháng thể 16B5 được nhân hóa (Phiên bản H1L2 và H1L3). Tau được kết tủa miễn dịch ra khỏi các phân đoạn hòa tan và không hòa tan của các mẫu vỏ não trước sau khi chết thu được từ bệnh nhân bị bệnh Alzheimer. Tau có mặt trong các chất kết tủa miễn dịch đã được thẩm tách đã được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng tau (tau pAb).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kháng thể đơn dòng và các chất điều trị bệnh khác thường được tạo ra ở dạng phân lập được. Điều này có nghĩa là tác nhân này thường có độ tinh khiết ít nhất là 50% trọng lượng của các protein nhiễu và các thành phần tạp nhiễm khác có nguồn gốc từ quá trình sản xuất hoặc làm sạch nó, nhưng không loại trừ khả năng một tác nhân được kết hợp với lượng dư của chất mang được dùng hoặc tá được khác nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho việc sử dụng nó. Đôi khi các kháng thể đơn dòng (hoặc các tác nhân điều trị bệnh khác) có độ tinh khiết ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trọng lượng của các protein nhiễu và các thành phần tạp nhiễm thu được từ quá trình sản xuất hoặc làm sạch.

Các kháng thể theo sáng chế thường gắn kết với đích được chỉ định của chúng có nồng độ liên kết ổn định ít nhất là 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , hoặc 10^{10}M^{-1} . Sự gắn kết này là sự gắn kết đặc hiệu ở chỗ mức độ có thể phát hiện được mạnh hơn và khác biệt so với sự gắn kết không đặc hiệu xảy ra ở ít nhất một đích không liên quan. Sự gắn kết đặc hiệu có thể là kết quả của quá trình tạo ra các liên kết giữa các nhóm chức cụ thể hoặc kiểu không gian cụ thể (ví dụ, kiểu khóa và chìa), trong khi sự gắn kết không đặc hiệu thường là kết quả của lực van der Waals. Tuy nhiên, sự gắn kết đặc hiệu không nhất thiết ám chỉ rằng kháng thể đơn dòng gắn kết với một và chỉ một đích.

Đơn vị cấu trúc cơ bản của kháng thể là tetrame của các cấu trúc siêu phân tử. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp giống nhau chứa các chuỗi polypeptit, mỗi cặp này có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25kDa) và một chuỗi “nặng” (nằm trong khoảng từ 50kDa đến 70kDa). Phần đầu tận cùng amino của mỗi chuỗi này bao gồm vùng biến đổi chứa khoảng 100 axit amin đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chủ yếu liên quan tới việc nhận diện

kháng nguyên. Vùng biến đổi này thường được biểu hiện trước tiên, được liên kết với peptit tín hiệu có thể phân cắt được. Vùng biến đổi không chứa peptit tín hiệu đôi khi được gọi là vùng biến đổi hoàn chỉnh. Do đó, ví dụ, vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuỗi nhẹ có nghĩa là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ không chứa peptit tín hiệu của chuỗi nhẹ. Phần đầu tận cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định chủ yếu liên quan đến chức năng tác động. Vùng hằng định có thể bao gồm miền bất kỳ hoặc tất cả các miền CH1, miền bản lề, miền CH2 và miền CH3.

Các chuỗi nhẹ được phân loại thành kappa hoặc lamda. Các chuỗi nặng được phân loại thành gama, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể lần lượt là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, các vùng biến đổi và vùng hằng định được nối với nhau bởi miền "J" chứa khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, trong đó chuỗi nặng còn bao gồm miền "D" chứa khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. (Xem tổng quan, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7) (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đối với mọi mục đích).

Các vùng biến đổi hoàn chỉnh của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo ra vị trí gắn kết với kháng thể. Do đó, kháng thể nguyên vẹn có hai vị trí gắn kết. Ngoại trừ trong các kháng thể chức kép hoặc đặc hiệu kép, hai vị trí gắn kết này là giống nhau. Tất cả các chuỗi có cấu trúc chung tương tự nhau chứa các vùng khung (FR) tương đối bảo toàn được nối với nhau bởi ba vùng siêu biến, còn được gọi các vùng xác định tính bổ trợ hay CDR (complementarity determining region). Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp được so sánh trình tự bởi các vùng khung, có khả năng gắn kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, cả chuỗi nhẹ lẫn chuỗi nặng bao gồm các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Việc phân định các axit amin cho từng miền được thực hiện theo định nghĩa của Kabat trong *Sequences of Protein of Immunological Interest* (Viện Y tế Quốc gia - National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 và 1991), hoặc Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat cũng đưa ra quy ước đánh số được sử dụng nhiều (đánh số Kabat) trong đó các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được quy ước là có cùng một số.

Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các kháng thể nguyên vẹn và các đoạn gắn kết của chúng. Thông thường, các đoạn cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn mà chúng có nguồn gốc từ việc gắn kết đặc hiệu với đích. Các đoạn bao gồm các chuỗi nặng riêng rẽ, các chuỗi nhẹ riêng rẽ, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, Fv và kháng thể của miền đơn lẻ. Các kháng thể của miền đơn lẻ (biến đổi) bao gồm các vùng VH đã được tách ra khỏi các đối tác VL của chúng (hoặc ngược lại) trong các kháng thể thông thường (Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341: 544-546), cũng như các vùng VH (đôi khi được gọi là VHH) từ các loài như họ Lạc đà (Camelidae) hoặc cá sụn (ví dụ, cá nhám) trong đó các vùng VH không liên kết với các vùng VL (xem, ví dụ, WO 9404678). Kháng thể của miền đơn lẻ trong đó một chuỗi được tách ra khỏi vật kèm tự nhiên của nó đôi khi được gọi là Dabs và kháng thể của miền đơn lẻ từ họ Lạc đà hoặc cá sụn đôi khi được biết là các thể nano. Vùng hằng định hoặc các phần của vùng hằng định có thể hoặc không thể có mặt trong kháng thể của miền đơn lẻ. Ví dụ, các kháng thể của vùng biến đổi đơn lẻ tự nhiên từ họ Lạc đà bao gồm vùng biến đổi VHH, và các vùng hằng định CH₂ và CH₃. Các kháng thể của miền đơn lẻ có thể được dùng để làm giống như kháng thể của người bằng các phương pháp tương tự như các kháng thể thông thường. Kháng thể dạng Dabs thường thu được từ các kháng thể có nguồn gốc từ người. Kháng thể dạng THE NANO có nguồn gốc từ họ Lạc đà hoặc cá nhám và có thể được dùng để làm giống như kháng thể của người. Các đoạn có thể được tạo ra theo các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách tách bằng enzym hoặc tách bằng cách hóa học các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Thuật ngữ “kháng thể” còn bao gồm kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc chức kép là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí gắn kết khác nhau (ví dụ, xem tài liệu: Songsivilai và Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)).

Thuật ngữ “epitop” được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà gắn kết với kháng thể. Epitop có thể được tạo ra từ các axit amin liên kề hoặc các axit amin không liên kề nằm cạnh nhau bằng cách gấp nếp ba lần một hoặc nhiều protein. Các epitop đã được tạo ra từ các axit amin liên kề thường được giữ lại để tiếp xúc với các dung môi biến tính, trong khi đó các epitop đã được tạo ra bằng cách gấp nếp ba lần thường bị mất đi trong quá trình xử lý bằng các dung môi biến tính. Epitop thường bao gồm ít nhất 3 axit amin, và

thường gặp hơn, ít nhất 5 hoặc 8 đến 10 axit amin theo cấu hình đặc biệt trong không gian. Nếu epitop nằm trong khoảng chứa các gốc axit amin trong protein (ví dụ, nằm trong các gốc 25 đến 44 của tau), thì khoảng này bao gồm cả các gốc xác định biên của nó. Các gốc nhất định nằm trong khoảng này sẽ tạo ra epitop, trong khi các gốc khác không thể tạo ra epitop. Các gốc tạo ra epitop có thể hoặc không thể nằm liền kề với nhau. Tương tự, nếu kháng thể gắn kết với epitop tìm được nằm trong một khoảng cụ thể chứa các axit amin, thì kháng thể này không nhất thiết phải tiếp xúc với tất cả các gốc axit amin nằm trong khoảng này, và các gốc của epitop được tiếp xúc bởi kháng thể có thể hoặc không thể nằm liền kề với nhau. Các phương pháp xác định cấu hình trong không gian của các epitop bao gồm, ví dụ, tinh thể học bằng tia X và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. Ví dụ, xem: *Epitope Mapping Protocols*, trong *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 của Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Các kháng thể nhận diện cùng một epitop hoặc các epitop chồng lên nhau có thể được xác định trong thử nghiệm miễn dịch đơn giản nhằm thể hiện khả năng cạnh tranh của một kháng thể với khả năng gắn kết của kháng thể khác với kháng nguyên đích. Epitop của kháng thể cũng có thể được xác định bằng tinh thể học bằng tia X của kháng thể đã gắn kết với kháng nguyên của nó để xác định các gốc tiếp xúc. Theo cách khác, hai kháng thể có cùng một epitop nếu tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên bị yếu hoặc mất khả năng gắn kết của một kháng thể thì sẽ bị yếu đi hoặc mất khả năng gắn kết so với kháng thể kia. Hai kháng thể có các epitop chồng lên nhau nếu một số đột biến axit amin bị yếu đi hoặc mất khả năng gắn kết của một kháng thể thì sẽ bị yếu đi hoặc mất khả năng gắn kết so với kháng thể kia. Sáng chế bao gồm các kháng thể cạnh tranh với 16B5 và/hoặc gắn kết với cùng một epitop trên tau như 16B5.

Khả năng cạnh tranh giữa các kháng thể được xác định bằng thử nghiệm, trong đó kháng thể trong điều kiện thử nghiệm sẽ ức chế khả năng gắn kết đặc hiệu của kháng thể quy chiếu (ví dụ, 16B5) với kháng nguyên thông thường (xem, ví dụ, tài liệu: Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Kháng thể thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể quy chiếu nếu lượng dư của kháng thể thử nghiệm (ví dụ, ít nhất gấp 2 lần, 5 lần, 10 lần, 20 lần hoặc 100 lần) ức chế khả năng gắn kết của kháng thể quy chiếu ít nhất 50%, nhưng tốt hơn

nếu là 75%, 90% hoặc 99% như xác định được trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Các kháng thể đã xác định được bằng thử nghiệm cạnh tranh (các kháng thể cạnh tranh) bao gồm các kháng thể gắn kết với cùng một epitop như kháng thể quy chiếu và các kháng thể gắn kết với epitop liên kề đủ gần epitop đã được gắn kết bởi kháng thể quy chiếu để cản trở về mặt không gian.

Thuật ngữ “người bệnh” bao gồm các đối tượng là người và động vật có vú khác tiếp nhận việc phòng bệnh hoặc điều trị bệnh.

Nhằm mục đích phân loại các dạng thể axit amin ở dạng bảo toàn hoặc không bảo toàn, các axit amin được chia thành các nhóm như sau: Nhóm I (mạch bên kỵ nước): met, ala, val, leu, ile; Nhóm II (mạch bên ưa nước trung tính): cys, ser, thr; Nhóm III (mạch bên có tính axit): asp, glu; Nhóm IV (mạch bên có tính bazơ): asn, gln, his, lys, arg; Nhóm V (các gốc ảnh hưởng tới hướng của mạch): gly, pro; và Nhóm VI (mạch bên thơm): trp, tyr, phe. Các dạng thể bảo toàn bao gồm các dạng thể nằm giữa các axit amin trong cùng một nhóm. Các dạng thể không bảo toàn sẽ trao đổi một thành phần của một trong số các nhóm này cho một thành phần của nhóm khác.

Tỷ lệ phần trăm của mức độ tương đồng trình tự được xác định bằng các trình tự của kháng thể được duỗi thẳng trình tự tối đa theo quy ước đánh số Kabat. Sau khi duỗi thẳng trình tự, nếu vùng kháng thể của đối tượng (ví dụ, toàn bộ vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) được so sánh với cùng một vùng của kháng thể quy chiếu, thì tỷ lệ phần trăm mức độ tương đồng trình tự giữa vùng kháng thể của đối tượng và vùng kháng thể quy chiếu là số lượng vị trí bị chiếm giữ bởi cùng một axit amin trong cả vùng kháng thể của đối tượng lẫn vùng kháng thể quy chiếu chia cho tổng số lượng các vị trí đã được duỗi thẳng của hai vùng này, trong đó không tính các khoảng cách, nhân với 100 để chuyển thành tỷ lệ phần trăm.

Thuật ngữ "chất bổ trợ" được dùng để chỉ hợp chất mà nếu được dùng cùng với kháng nguyên thì tăng cường và/hoặc chuyển hướng đáp ứng miễn dịch sang kháng nguyên, nhưng khi được dùng riêng rẽ lại không tạo ra đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên. Các chất bổ trợ có thể làm tăng đáp ứng miễn dịch theo một vài cơ chế bao gồm

sự bổ sung tế bào lympho, kích thích tế bào B và/hoặc tế bào T, và kích thích tế bào đơn nhân lớn.

Bệnh liên quan đến tau nếu nhóm bệnh nhân mắc bệnh này có lượng tau gia tăng trong não, hoặc gia tăng lượng lắng đọng hoặc các thể vùi của tau, hoặc có mặt các đám rối tau trong não, hoặc gia tăng mức độ phosphoryl hóa của tau trong não (số lượng nhóm phosphat trung bình trong mỗi phân tử tau), hoặc quá trình dẫn truyền liên bào hoặc nội bào khác thường của tau so với nhóm đối tượng đã biết là không mắc bệnh thần kinh. Bệnh cũng liên quan đến tau nếu các người bệnh có biến thể của gen tau có nguy cơ phát triển bệnh này cao hơn so với các người bệnh có gen tau thông thường (phổ biến nhất là xuất hiện biến thể ở nhóm người).

Cá thể có nguy cơ mắc bệnh cao nếu đối tượng có ít nhất một yếu tố nguy cơ đã biết (ví dụ, di truyền, sinh hóa, tiền sử gia đình, tình trạng phơi nhiễm) khiến cho cá thể có yếu tố nguy cơ ở mức nguy cơ phát triển bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với cá thể không có yếu tố nguy cơ.

Thuật ngữ "triệu chứng" được dùng để chỉ chứng cứ chủ quan của bệnh, như đáng đi thay đổi, như được cảm nhận bởi người bệnh. "Dấu hiệu" được dùng để chỉ chứng cứ khách quan của bệnh như quan sát được bởi thầy thuốc.

Mức ý nghĩa thống kê có nghĩa $p \leq 0,05$.

Tổng quan

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết với tau. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 23 đến 46 của trình tự SEQ ID NO.1. Một số kháng thể gắn kết với tau bất kể có xảy ra quá trình phosphoryl hóa hay không. Một số kháng thể theo sáng chế có khả năng ức chế hoặc trì hoãn tình trạng bệnh lý liên quan đến tau và tình trạng thoái biến triệu chứng liên quan đến tau. Mặc dù việc hiểu biết về cơ chế là không cần thiết để thực hiện sáng chế, nhưng mức giảm độc tính có thể xảy ra là do kháng thể gây ra quá trình thực bào tau, ức chế tau khỏi quá trình kết tụ liên phân tử hoặc nội phân tử, hoặc khỏi quá trình gắn kết với các phân tử khác, bằng cách làm ổn định cấu hình không độc, hoặc bằng cách ức chế quá trình dẫn truyền liên bào hoặc nội bào của các dạng

tau gây bệnh, trong số các cơ chế khác. Các kháng thể theo sáng chế hoặc các tác nhân tạo ra các kháng thể này có thể được dùng trong các phương pháp điều trị hoặc phòng bệnh Alzheimer và các bệnh khác liên quan đến tau.

II. Tau

Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến tau có nghĩa là dạng tau tự nhiên của người bao gồm tất cả các dạng đồng chức năng bất kể có mặt hay không có mặt quá trình cải biến sau dịch mã (ví dụ, phosphoryl hóa, glyxyl hóa, hoặc axetyl hóa). Có sáu dạng đồng chức năng chính (các biến thể nội) của tau xuất hiện trong não người. Các biến thể này có chiều dài lớn nhất là 441 axit amin, trong đó gốc met ban đầu được phân cắt. Các gốc được đánh số theo dạng đồng chức năng thứ 441. Do đó, ví dụ, việc đề cập đến quá trình phosphoryl hóa ở vị trí 404 nghĩa là vị trí 404 của dạng đồng chức năng thứ 441, hoặc vị trí tương ứng của dạng đồng chức năng khác bất kỳ khi đã được duỗi thẳng trình tự tối đa bằng dạng đồng chức năng thứ 441. Các trình tự axit amin của các dạng đồng chức năng và số Swiss-Prot được biểu thị dưới đây.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

10	20	30	40	50	60				
MAEPRQEF	EV	MEDHAGTY	GL	GDRKDQGG	YT	MHQDQEGD	TD	AGLKESPL	QT
PTEDGSEEP	G								
70	80	90	100	110	120				
SETSDAKST	P	TAEDVTAP	LV	DEGAPGKQ	AA	AQPHTEIPE	G	TTAEEAGI	GD
TPSLEDEAA	G								
130	140	150	160	170	180				
HVTQARMVS	K	SKDGTGS	DDK	KAKGADGK	TK	IATPRGAAP	P	GQKGQANAT	R
IPAKTPPAP	K								
190	200	210	220	230	240				
TPPSSGEPP	K	SGDRSGY	SSP	GSPGTPGS	RS	RTPSLPTPT	P	REPKKVAV	VR
TPPKSPSSA	K								
250	260	270	280	290	300				
SRLQTAPVP	M	PDLKNVK	SKI	GSTENLKH	QP	GGGKVQIIN	K	KLDLSNVQ	SK
CGSKDNIKH	V								
310	320	330	340	350	360				
PGGGSVQIV	Y	KPVDLSK	VTS	KCGSLGNI	HH	KPGGGQVE	VK	SEKLDFKDR	V
QSKIGSLDN	I								
370	380	390	400	410	420				

THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN
 VSSTGSIDMV
 430 440
 DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
 PTEDGSEEPG
 70 80 90 100 110 120
 SETSDAKSTP TAEAE EAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD
 KKA KGADGKT
 130 140 150 160 170 180
 KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPA KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS
 PGSPGTPGSR
 190 200 210 220 230 240
 SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK
 IGSTENLKHQ
 250 260 270 280 290 300
 PGGGKVQIIN KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT
 SKCGSLGNIH
 310 320 330 340 350 360
 HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR
 ENAKAKTDHG
 370 380 390 400 410
 AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

P10636-6 (SEQ ID NO:3)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI
 GDTPSLEDEA
 70 80 90 100 110 120
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA
 TRIPA KTPPA
 130 140 150 160 170 180
 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV
 VRTPPKSPSS
 190 200 210 220 230 240
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ
 SKCGSKDNIK
 250 260 270 280 290 300

HVPGGGSVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDFKD
RVQSKIGSLD
310 320 330 340 350 360
NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSRHL
SNVSSTGSID
370 380
MVDSPQLATL ADEVASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10 20 30 40 50 60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG
70 80 90 100 110 120
SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD
TPSLEDEAAG
130 140 150 160 170 180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR
IPAKTPPAPK
190 200 210 220 230 240
TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR
TPPKSPSSAK
250 260 270 280 290 300
SRLQTAPVPM PDLKNVFSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK
CGSLGNIHHK
310 320 330 340 350 360
PGGGQVEVKS EKLDKDFKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGGNKKI ETHKLTFREN
AKAKTDHGAE
370 380 390 400 410
IVYKSPVVSG DTSRHLNSV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10 20 30 40 50 60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG
70 80 90 100 110 120
SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTSPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD
KKAKGADGKT
130 140 150 160 170 180
KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPA KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS
PGSPGTPGSR
190 200 210 220 230 240

SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSKS
 IGSTENLKHQ
 250 260 270 280 290 300
 PGGGKVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV
 QSKIGSLDNI
 310 320 330 340 350 360
 THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN
 VSSTGSIDMV
 370 380
 DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI
 GDTPSLEDEA
 70 80 90 100 110 120
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA
 TRIPAKTPPA
 130 140 150 160 170 180
 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV
 VRTPPKSPSS
 190 200 210 220 230 240
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDLSKVT
 SKCGSLGNIH
 250 260 270 280 290 300
 HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR
 ENAKAKTDHG
 310 320 330 340 350
 AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

Việc đề cập tới tau bao gồm khoảng 30 biến thể tự nhiên đã biết trong số các biến thể được liệt kê trên cơ sở dữ liệu Swiss-Pro và các hoán vị của chúng, cũng như các đột biến liên quan đến bệnh lý liên quan đến tau, như chúng mất trí, bệnh Pick, chứng liệt trên nhân, v.v. (xem, ví dụ: cơ sở dữ liệu Swiss-Pro và Poorkaj, *et al. Ann Neurol.* 43:815-825

(1998)). Một số ví dụ về các đột biến tau đã được đánh số bởi dạng đồng chức năng thứ 441 là lysin với đột biến threonin trên gốc axit amin 257 (K257T), isoleuxin với đột biến valin ở vị trí axit amin 260 (I260V); glyxin với đột biến valin ở vị trí axit amin 272 (G272V); asparagin với đột biến lysin ở vị trí axit amin 279 (N279K); asparagin với đột biến histidin ở vị trí axit amin 296 (N296H); prolin với đột biến serin ở vị trí axit amin 301 (P301S); glyxin với đột biến valin ở vị trí axit amin 303 (G303V); serin với đột biến asparagin ở vị trí 305 (S305N); glyxin với đột biến serin ở vị trí axit amin 335 (G335S); valin với đột biến methionin ở vị trí 337 (V337M); axit glutamic với đột biến valin ở vị trí 342 (E342V); lysin với đột biến isoleuxin ở vị trí axit amin 369 (K369I); glyxin với đột biến arginin ở vị trí axit amin 389 (G389R); và arginin với đột biến tryptophan ở vị trí axit amin 406 (R406W).

Tau có thể được phosphoryl hóa trên một hoặc nhiều gốc axit amin bao gồm tyrosin ở các vị trí axit amin 18, 29, 97, 310, và 394, serin ở các vị trí axit amin 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413, và 422; và threonin ở các vị trí axit amin 175, 181, 205, 212, 217, 231, và 403.

III. Kháng thể

A. Đặc tính về tính đặc hiệu và chức năng gắn kết

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết với tau. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 23 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 25 đến 44 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong 28 đến 41 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 30 đến 39 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 30 đến 36 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 33 đến 39 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 33 đến 36 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop bao gồm các gốc 28 đến 30, 28 đến 31, 28 đến 32, 28 đến 33, 28 đến 34, 28 đến 35, 28 đến 36, 28 đến 37, 28 đến 38, 28 đến 39, 28 đến 40, 28 đến 41, 29 đến 31, 29 đến 32, 29 đến 33, 29 đến 34, 29 đến 35, 29 đến 36, 29 đến 37, 29 đến 38, 29 đến 39,

29 đến 40, 29 đến 41, 30 đến 32, 30 đến 33, 30 đến 34, 30 đến 35, 30 đến 36, 30 đến 37, 30 đến 38, 30 đến 39, 30 đến 40, 30 đến 41, 31 đến 33, 31 đến 34, 31 đến 35, 31 đến 36, 31 đến 37, 31 đến 38, 31 đến 39, 31 đến 40, 31 đến 41, 32 đến 34, 32 đến 35, 32 đến 36, 32 đến 37, 32 đến 38, 32 đến 39, 32 đến 40, 32 đến 41, 33 đến 35, 33 đến 36, 33 đến 37, 33 đến 38, 33 đến 39, 33 đến 40, 33 đến 41, 34 đến 36, 34 đến 37, 34 đến 38, 34 đến 39, 34 đến 40, 34 đến 41, 35 đến 37, 35 đến 38, 35 đến 39, 35 đến 40, 35 đến 41, 36 đến 38, 36 đến 39, 36 đến 40, 36 đến 41 của trình tự SEQ ID NO:1. Một số kháng thể gắn kết với tau bất kể có xảy ra quá trình phosphoryl hóa hay không. Một số kháng thể gắn kết với epitop không bao gồm gốc phụ thuộc vào quá trình phosphoryl hóa. Các kháng thể này có thể thu được bằng cách tạo miễn dịch với polypeptit tau đã được tinh sạch từ nguồn tự nhiên hoặc được biểu hiện tái tổ hợp. Các kháng thể này có thể được sàng lọc để gắn kết tau ở dạng không được phosphoryl hóa cũng như dạng mà ở đó một hoặc nhiều gốc dễ bị phosphoryl hóa được phosphoryl hóa. Tốt hơn, nếu các kháng thể này gắn kết với ái lực đồng nhất hoặc gắn kết với tau đã được phosphoryl hóa ít nhất cao hơn gấp 1,5 lần, 2 lần hoặc 3 lần so với tau không được phosphoryl hóa (tức là “đặc hiệu với pan”). 16B5 là ví dụ về kháng thể đơn dòng đặc hiệu với pan. Sáng chế còn đề xuất các kháng thể gắn kết với cùng một epitop như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên, ví dụ, epitop của 16B5. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các kháng thể cạnh tranh, để gắn kết với tau, với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên, ví dụ, cạnh tranh với 16B5.

Các kháng thể nêu trên có thể được tạo ra ban đầu bằng cách tạo miễn dịch với peptit bao gồm các gốc 23 đến 46, 25 đến 44, 28 đến 30, 28 đến 31, 28 đến 32, 28 đến 33, 28 đến 34, 28 đến 35, 28 đến 36, 28 đến 37, 28 đến 38, 28 đến 39, 28 đến 40, 28 đến 41, 29 đến 31, 29 đến 32, 29 đến 33, 29 đến 34, 29 đến 35, 29 đến 36, 29 đến 37, 29 đến 38, 29 đến 39, 29 đến 40, 29 đến 41, 30 đến 32, 30 đến 33, 30 đến 34, 30 đến 35, 30 đến 36, 30 đến 37, 30 đến 38, 30 đến 39, 30 đến 40, 30 đến 41, 31 đến 33, 31 đến 34, 31 đến 35, 31 đến 36, 31 đến 37, 31 đến 38, 31 đến 39, 31 đến 40, 31 đến 41, 32 đến 34, 32 đến 35, 32 đến 36, 32 đến 37, 32 đến 38, 32 đến 39, 32 đến 40, 32 đến 41, 33 đến 35, 33 đến 36, 33 đến 37, 33 đến 38, 33 đến 39, 33 đến 40, 33 đến 41, 34 đến 36, 34 đến 37, 34 đến 38, 34 đến 39, 34 đến 40, 34 đến 41, 35 đến 37, 35 đến 38, 35 đến 39, 35 đến 40, 35 đến 41, 36 đến 38, 36 đến 39, 36 đến 40, 36 đến 41 của trình tự SEQ ID NO:1 hoặc bằng cách tạo

miễn dịch với polypeptit tau có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn của chúng chứa các gốc này và sàng lọc để gắn kết đặc hiệu với peptit bao gồm các gốc này. Tốt hơn, nếu các peptit này đã được gắn vào phân tử tiếp hợp khác loại giúp tạo ra đáp ứng kháng thể với peptit này. Sự gắn kết này có thể là trực tiếp hoặc thông qua peptit hoặc axit amin đệm. Xystein được dùng làm axit amin đệm do nhóm SH tự do của nó tạo điều kiện thuận lợi cho việc gắn phân tử mang. Sự liên kết với polyglyxin (ví dụ, 2 đến 6 glyxin), có hoặc không có gốc xystein nằm giữa glyxin và peptit cũng có thể được sử dụng. Phân tử mang đóng vai trò tạo ra epitop tế bào T giúp tạo ra đáp ứng kháng thể kháng peptit này. Một vài chất mang thường được sử dụng cụ thể như hemoxyanin từ con hà (KLH), albumin từ lòng trắng trứng và huyết thanh bò (BSA). Peptit đệm có thể được bổ sung vào tác nhân gây miễn dịch peptit là một phần của quy trình tổng hợp peptit pha rắn. Các chất mang thường được bổ sung bằng liên kết ngang hóa học. Một số ví dụ về các liên kết ngang hóa học có thể được sử dụng bao gồm este N-maleimido-6-aminocaproyl liên kết ngang hoặc este m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimit (MBS) (ví dụ, xem tài liệu: Harlow, E. *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia *et al.*, *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz *et al.*, *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer *et al.*, *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. *et al.*, *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; và, Southwood *et al.*, *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)). Chất mang và chất đệm nếu có mặt có thể được gắn vào một trong số hai đầu của tác nhân gây miễn dịch.

Peptit có đoạn đệm và mang tùy ý có thể được dùng để gây miễn dịch cho các động vật trong phòng thí nghiệm hoặc các tế bào B như được bộc lộ một cách chi tiết hơn dưới đây. Các dịch nổi chứa tế bào lai có thể được thử nghiệm về khả năng gắn kết với một hoặc nhiều peptit bao gồm các gốc 24 đến 46, 25 đến 44, 28 đến 30, 28 đến 31, 28 đến 32, 28 đến 33, 28 đến 34, 28 đến 35, 28 đến 36, 28 đến 37, 28 đến 38, 28 đến 39, 28 đến 40, 28 đến 41, 29 đến 31, 29 đến 32, 29 đến 33, 29 đến 34, 29 đến 35, 29 đến 36, 29 đến 37, 29 đến 38, 29 đến 39, 29 đến 40, 29 đến 41, 30 đến 32, 30 đến 33, 30 đến 34, 30 đến 35, 30 đến 36, 30 đến 37, 30 đến 38, 30 đến 39, 30 đến 40, 30 đến 41, 31 đến 33, 31 đến 34, 31 đến 35, 31 đến 36, 31 đến 37, 31 đến 38, 31 đến 39, 31 đến 40, 31 đến 41, 32 đến 34, 32 đến 35, 32 đến 36, 32 đến 37, 32 đến 38, 32 đến 39, 32 đến 40, 32 đến 41, 33 đến

35, 33 đến 36, 33 đến 37, 33 đến 38, 33 đến 39, 33 đến 40, 33 đến 41, 34 đến 36, 34 đến 37, 34 đến 38, 34 đến 39, 34 đến 40, 34 đến 41, 35 đến 37, 35 đến 38, 35 đến 39, 35 đến 40, 35 đến 41, 36 đến 38, 36 đến 39, 36 đến 40, 36 đến 41 của trình tự SEQ ID NO:1 và/hoặc các dạng đã được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa của tau, ví dụ, dạng đồng chức năng có chiều dài đầy đủ của tau với vị trí 404 ở dạng đã được phosphoryl hóa. Peptit có thể được gắn vào phân tử mang hoặc đầu khác để tạo điều kiện thuận lợi cho thử nghiệm sàng lọc. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu chất mang hoặc đầu là khác so với dạng kết hợp của đoạn đệm và phân tử mang được sử dụng để gây miễn dịch nhằm loại bỏ các kháng thể đặc hiệu với đoạn đệm hoặc phân tử mang hơn là peptit tau. Các dạng đồng chức năng tau bất kỳ có thể được sử dụng.

Các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể đã chọn của loài gặm nhấm (ví dụ, 16B5) cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng biến thể của phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Xem WO 92/20791 của Winter. Phương pháp này là đặc biệt thích hợp để sản sinh các kháng thể của người. Theo phương pháp này, vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể đã chọn của loài gặm nhấm được dùng làm nguyên liệu ban đầu. Ví dụ, nếu vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn làm nguyên liệu ban đầu, thì thư viện thể thực khuẩn được xây dựng trong đó các thành viên biểu hiện cùng một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (tức là nguyên liệu ban đầu của loài gặm nhấm) và vùng biến đổi của chuỗi nặng khác nhau. Các vùng biến đổi của chuỗi nặng có thể thu được từ thư viện gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng đã được sắp xếp lại của người chẳng hạn. Thể thực khuẩn có khả năng gắn kết đặc hiệu mạnh với đích mong muốn (ví dụ, peptit tau) (ví dụ, ít nhất 10^8 và tốt hơn nếu ít nhất $10^9 M^{-1}$) được chọn. Sau đó, vùng biến đổi của chuỗi nặng thu được từ thể thực khuẩn này đóng vai trò làm nguyên liệu ban đầu để xây dựng thư viện thể thực khuẩn khác. Trong thư viện này, mỗi thể thực khuẩn biểu hiện cùng một vùng biến đổi của chuỗi nặng (tức là vùng xác định được từ thư viện biểu hiện đầu tiên) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ khác. Ví dụ, các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có thể thu được từ thư viện gồm các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đã được sắp xếp lại của người. Tiếp theo, thể thực khuẩn có khả năng gắn kết đặc hiệu mạnh với đích mong muốn đã được chọn. Các kháng thể thu được thường có cùng tính đặc hiệu epitop hoặc tính đặc hiệu epitop tương tự như nguyên liệu ban đầu của loài gặm nhấm.

Các kháng thể khác có thể thu được bằng cách tạo đột biến ADN hỗ trợ mã hóa các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của kháng thể làm ví dụ, như 16B5. Các kháng thể đơn dòng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95% hoặc 99% so với 16B5 trong trình tự axit amin của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ hoàn chỉnh và duy trì được đặc tính chức năng của nó, và/hoặc là khác biệt so với kháng thể tương ứng bởi số lượng dạng thể nhỏ axit amin không hợp lý về mặt chức năng (ví dụ, các dạng thể bảo toàn), đoạn khuyết, hoặc đoạn chèn cũng nằm trong yêu cầu của sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đơn dòng có ít nhất một và tốt hơn là hoàn tất cả sáu CDR như xác định được bởi Kabat có mức độ tương đồng là 90%, 95%, 99% hoặc 100% so với các CDR tương ứng của 16B5.

B. Kháng thể không phải là kháng thể của người

Quá trình sản sinh các kháng thể đơn dòng khác không phải kháng thể của người, ví dụ, loài gặm nhấm, chuột lang, linh trưởng, thỏ hoặc chuột nhắt, kháng lại tác nhân gây miễn dịch có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách tạo miễn dịch động vật này bằng tác nhân gây miễn dịch như nêu trên. Xem tài liệu: Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đối với mọi mục đích). Tác nhân gây miễn dịch này có thể thu được từ nguồn tự nhiên, bằng cách tổng hợp peptit hoặc bằng cách biểu hiện tái tổ hợp.

Tùy ý, tác nhân gây miễn dịch có thể được dùng với chất hỗ trợ. Một vài loại chất hỗ trợ có thể được dùng như được bộc lộ dưới đây. Chất hỗ trợ Freund hoàn chỉnh tiếp theo là chất hỗ trợ không hoàn chỉnh được ưu tiên để gây miễn dịch cho các động vật trong phòng thí nghiệm. Thỏ hoặc chuột lang thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đa dòng. Chuột nhắt thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng. Các kháng thể được sàng lọc theo khả năng gắn kết đặc hiệu tùy ý với. Các kháng thể được sàng lọc tiếp về khả năng gắn kết với vùng đặc hiệu của tau. Quá trình sàng lọc này có thể được tiến hành bằng cách xác định khả năng gắn kết của kháng thể với tập hợp gồm các đột biến khuyết của tau và xác định xem các đột biến khuyết này có gắn kết với kháng thể hay không. Khả năng gắn kết có thể được đánh giá, ví dụ, bằng cách thâm tách Tây, FACS™ hoặc ELISA.

C. Kháng thể nhân hóa

Kháng thể nhân hóa là kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền, trong đó các CDR từ kháng thể “cho” không phải của người (ví dụ, 16B5) được ghép vào trình tự của kháng thể “nhận” của người (xem, ví dụ: US 5,530,101 và 5,585,089 của Queen; US 5,225,539 của Winter, US 6,407,213 của Carter, US 5,859,205 6,881,557 của Adair, US 6,881,557 của Foote). Các trình tự của kháng thể nhận có thể, ví dụ, là trình tự của kháng thể hoàn chỉnh của người, tổ hợp chứa các trình tự này, trình tự liên ứng của các trình tự của kháng thể của người, hoặc trình tự vùng dòng mầm. Do đó, kháng thể nhân hóa là kháng thể có một vài hoặc tất cả các CDR hoàn toàn hoặc hầu như từ kháng thể cho và các trình tự khung của vùng biến đổi và các vùng hằng định, nếu có, hoàn toàn hoặc hầu như từ các trình tự của kháng thể của người. Tương tự, chuỗi nặng được làm giống như chuỗi nặng của người có ít nhất một, hai và thường là cả ba CDR hoàn toàn hoặc hầu như từ chuỗi nặng của kháng thể cho, và trình tự khung của vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng hằng định của chuỗi nặng, nếu có, hầu như từ khung của vùng biến đổi của chuỗi nặng và trình tự của vùng hằng định của người. Tương tự, chuỗi nhẹ được nhân hóa có ít nhất một, hai và thường là cả ba CDR hoàn toàn hoặc hầu như từ chuỗi nhẹ của kháng thể cho, và trình tự khung của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng hằng định của chuỗi nhẹ, nếu có, hầu như từ khung của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của người và trình tự của vùng hằng định. Không giống như các thể nano và dAb, kháng thể nhân hóa chứa chuỗi nặng được làm giống như chuỗi nặng của người và chuỗi nhẹ được nhân hóa. CDR trong kháng thể nhân hóa hầu như từ CDR tương ứng trong kháng thể không phải kháng thể của người nếu ít nhất 85%, 90%, 95% hoặc 100% gốc tương ứng (như xác định được theo Kabat) là giống nhau giữa các CDR tương ứng. Trình tự khung của vùng biến đổi của chuỗi kháng thể hoặc vùng hằng định của chuỗi kháng thể hầu như từ trình tự khung của vùng biến đổi của người hoặc vùng hằng định của người lần lượt nếu ít nhất 85%, 90%, 95% hoặc 100% gốc tương ứng xác định được theo Kabat là giống nhau.

Mặc dù các kháng thể nhân hóa thường kết hợp tất cả sáu CDR (tốt hơn là như xác định được theo Kabat) từ kháng thể của chuột nhất, nhưng chúng cũng có thể được tạo ra với ít hơn tất cả sáu CDR (ví dụ, ít nhất 3, 4, hoặc 5) từ kháng thể của chuột nhất (ví dụ,

Pascalis *et al.*, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi *et al.*, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura *et al.*, *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

Trong một số kháng thể, chỉ có một phần CDR, cụ thể là phân nhóm gồm các gốc CDR cần thiết đối với quá trình gắn kết, được gọi là SDR, là cần thiết để duy trì quá trình gắn kết trong kháng thể nhân hóa. Các gốc CDR không tiếp xúc với kháng nguyên và không có mặt trên SDR có thể được xác định dựa trên các nghiên cứu trước đây (ví dụ, các gốc H60 đến H65 trong H2 của CDR thường là không cần thiết), từ các vùng của các CDR xác định được bởi Kabat nằm ngoài các vòng siêu biến Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), bằng cách xây dựng mô hình phân tử và/hoặc theo kinh nghiệm, hoặc như đã được bộc lộ trong tài liệu: Gonzales *et al.*, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. Trong các kháng thể được nhân hóa này, ở vị trí mà ở đó một hoặc nhiều gốc CDR không có mặt hoặc trong đó CR cho nguyên vẹn được loại bỏ, axit amin chiếm giữ vị trí này là axit amin chiếm giữ vị trí tương ứng (bằng cách đánh số Kabat) trong trình tự của kháng thể nhận. Số lượng các đoạn thể này của kháng thể nhận đối với các axit amin cho trong các CDR phản ánh trạng thái cân bằng của các cân nhắc cạnh tranh. Các sự thể như vậy là có lợi về tiềm năng làm giảm số lượng các axit amin của chuột nhắt trong kháng thể nhân hóa và do đó làm giảm tính sinh miễn dịch tiềm năng. Tuy nhiên, các sự thể cũng có thể làm thay đổi ái lực, và tốt hơn là cần tránh việc làm giảm đáng kể ái lực. Các vị trí để thể nằm trong các CDR và các axit amin để thể cũng có thể được lựa chọn theo kinh nghiệm.

Các trình tự của kháng thể nhận của người có thể tùy ý được chọn từ nhiều trình tự đã biết của kháng thể của người để tạo ra mức độ tương đồng trình tự cao (ví dụ, mức độ tương đồng nằm trong khoảng từ 65% đến 85%) giữa khung của vùng biến đổi trình tự nhận của người và khung của vùng biến đổi tương ứng của chuỗi kháng thể cho.

Các axit amin nhất định từ các gốc khung của vùng biến đổi của người có thể được chọn để thay thế dựa trên ảnh hưởng đến cấu hình CDR và/hoặc khả năng gắn kết với kháng nguyên. Nghiên cứu về ảnh hưởng này được tiến hành bằng cách lập mô hình, kiểm tra các đặc tính của các axit amin ở vị trí cụ thể, hoặc quan sát theo kinh nghiệm về các tác động của sự thể hoặc tạo đột biến của các axit amin cụ thể.

Ví dụ, nếu axit amin là khác nhau giữa gốc khung của vùng biến đổi của loài gặm nhấm và gốc khung của vùng biến đổi của người đã được chọn, thì axit amin của khung của người có thể được thế bằng axit amin của khung tương đương từ kháng thể của chuột nhất nếu kỳ vọng một cách hợp lý rằng axit amin:

- (1) không liên kết cộng hóa trị trực tiếp với kháng nguyên,
- (2) nằm liền kề với vùng CDR,
- (3) theo cách khác tương tác với vùng CDR (ví dụ, nằm trong khoảng 6Å của vùng CDR), (ví dụ, xác định được bằng cách lập mô hình chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng trên cấu trúc cần giải quyết của chuỗi globulin miễn dịch đồng nhất đã biết); và
- (4) một gốc tham gia vào tương tác với VL-VH.

Các gốc khung thuộc các nhóm (1) đến (3) như xác định được bởi Queen, US 5,530,101 đôi khi còn được gọi là gốc chính tắc và gốc dạng thước cặp. Các gốc khung xác định nhóm chính tắc chứa các vòng CDR cho xác định cấu hình của vòng CDR đôi khi được gọi là các gốc chính tắc (Chothia và Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin *J. Mol. Biol.*, 263, 800-815, 1996). Lớp gốc khung mà trợ giúp việc tạo cấu hình vòng gắn kết với kháng nguyên đóng vai trò trong việc tinh chỉnh tính phù hợp của kháng thể đối với kháng nguyên đôi khi được gọi là các gốc dạng thước cặp (Foote & Winter, 1992, *J Mol Bio.* 224,487-499). Các gốc dự tuyển khác để thay thế là các gốc tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Các gốc dự tuyển khác để thế là các axit amin của khung nhận của người mà là khác thường đối với globulin miễn dịch của người ở vị trí đó. Các axit amin này có thể được thế bằng các axit amin từ vị trí tương đương của kháng thể cho của chuột nhất hoặc từ vị trí tương đương của nhiều hơn các globulin miễn dịch thông thường của người. Các gốc dự tuyển khác để thế là các axit amin của khung nhận của người mà là khác thường đối với globulin miễn dịch của người ở vị trí đó.

Sáng chế đề xuất các dạng được nhân hóa của kháng thể 16B5 của chuột nhất. Kháng thể của chuột nhất chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có các trình tự axit amin lần lượt nêu trong SEQ ID NO.10 và 16. Sáng chế đề xuất một vùng biến đổi của chuỗi nặng hoàn chỉnh được nhân hóa (H1) được minh họa bằng ví dụ và ba vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được làm giống như vùng của người (L1, L2 và L3) được minh họa bằng ví dụ. Biến thể H1L2 có cùng ái lực hoặc ái lực mạnh hơn so với

16B5 thể khảm và bảy đột biến ngược. H1L1 và H1L3 có ái lực tương tự như 16B5 thể khảm và sáu đột biến ngược.

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 16B5 được làm giống như biến thể của người H1L2 trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng hoàn chỉnh được làm giống như vùng của người có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với trình tự SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được nhân hóa có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95%, 96%, 97% 98% hoặc 99% so với trình tự SEQ ID NO:22. Tốt hơn, nếu trong các kháng thể này, một số hoặc toàn bộ đột biến ngược trong H1L2 được giữ lại. Nói cách khác, ít nhất 1, 2, hoặc 3 vị trí vị trí H13 được chiếm giữ bởi K, vị trí H48 được chiếm giữ bởi M và vị trí H91 được chiếm giữ bởi F. Tốt hơn, nếu ít nhất 1, 2, 3 hoặc cả bốn vị trí vị trí L1 được chiếm giữ bởi N, vị trí L4 được chiếm giữ bởi L, vị trí L36 được chiếm giữ bởi F và vị trí L43 được chiếm giữ bởi S. Tốt hơn, nếu các vùng CDR của các kháng thể được làm giống như vùng của người này là giống hoặc hầu như giống với các vùng CDR của H1L2, là tương tự như các vùng CDR của kháng thể cho của chuột nhất. Các vùng CDR có thể được xác định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ (ví dụ, Chothia) nhưng tốt hơn là xác định được theo Kabat.

Một khả năng để biến đổi tiếp trong các biến thể 16B5 là tạo đột biến ngược bổ sung trong các khung của vùng biến đổi. Nhiều gốc khung không tiếp xúc với các CDR trong mAb được làm giống như gốc của người có thể là thích hợp để thể các axit amin từ các vị trí tương ứng của mAb cho của chuột nhất hoặc các kháng thể khác của chuột nhất hoặc của người, và ngay cả khi nhiều gốc tiếp xúc với CDR tiềm năng cũng dễ bị thể hoặc ngay cả khi các axit amin nằm trong các CDR có thể được biến đổi, ví dụ, bằng các gốc tìm thấy ở vị trí tương ứng của trình tự nhận của người dùng để cung cấp cho các khung của vùng biến đổi. Ngoài ra, các trình tự nhận biến đổi của người có thể được sử dụng, ví dụ, cho chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Nếu các trình tự nhận khác nhau được sử dụng, một hoặc nhiều quá trình đột biến ngược nêu trên không thể được thực hiện do các gốc cho và nhận tương ứng là như nhau khi không xảy ra đột biến ngược. Ví dụ, nếu sử dụng trình tự nhận của chuỗi nặng trong đó vị trí H13 đã được chiếm giữ bởi K thì không cần quá trình đột biến ngược.

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể nhân hóa, trong đó các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoàn chỉnh có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoàn chỉnh của kháng thể 16B5 nhân hóa H1L1 (lần lượt là các trình tự SEQ ID NO: 21 và 15) hoặc kháng thể 16B5 nhân hóa H1L3 (lần lượt là các trình tự SEQ ID NO: 23 và 15).

D. Các kháng thể thể khảm và được bọc

Sáng chế còn đề xuất các dạng thể khảm và được bọc của các kháng thể không phải kháng thể của người, đặc biệt là kháng thể 16B5.

Kháng thể thể khảm là kháng thể trong đó các vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể không phải kháng thể của người (ví dụ, chuột) được kết hợp với các vùng hằng định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người. Các kháng thể này hầu như hoặc hoàn toàn giữ được tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể của chuột nhất, và là khoảng hai phần ba trình tự của người.

Kháng thể được bọc là loại kháng thể nhân hóa mà vẫn giữ được một số và thường là toàn bộ các CDR và một số gốc khung của vùng biến đổi không phải của người của kháng thể không phải kháng thể của người nhưng thay thế các gốc khung của vùng biến đổi khác mà có thể liên quan tới các epitop tế bào B hoặc tế bào T, ví dụ, các gốc tiếp xúc (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) với các gốc từ các vị trí tương ứng của trình tự của kháng thể của người. Kết quả là, kháng thể trong đó các CDR hoàn toàn hoặc hầu như từ kháng thể không phải kháng thể của người và các khung của vùng biến đổi của kháng thể không phải kháng thể của người được tạo ra theo cách giống như của người bằng cách thể. Các dạng được bọc của kháng thể 16B5 cũng được nằm trong phạm vi của sáng chế.

E. Các kháng thể của người

Các kháng thể của người kháng tau được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật được bọc lộ dưới đây. Các phương pháp tạo ra các kháng thể của người bao gồm phương pháp trioma của Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, patent Mỹ số 4,634,664; và Engleman *et al.*, patent Mỹ 4,634,666, việc sử dụng chuột nhắt chuyển gen bao gồm các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, xem: WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US

5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806 của Lonberg và các đồng tác giả, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), WO 91/10741 của Kucherlapati (1991) và các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn (xem, ví dụ: WO 91/17271 của Dower và các đồng tác giả và WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 và US 5,565,332 của McCafferty và các đồng tác giả.

F. Lựa chọn vùng hằng định

Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và của chuỗi nhẹ của kháng thể khảm, được nhân hóa (kể cả được bọc), hoặc các kháng thể của người có thể được liên kết với ít nhất một phần vùng hằng định của người. Việc lựa chọn vùng hằng định phụ thuộc, một phần, vào việc muốn có độc tính tế bào hỗ trợ phụ thuộc vào kháng thể và/hoặc độc tính tế bào do tế bào hay không. Ví dụ, các đồng vị IgG1 và IgG3 của người có độc tính tế bào do thể tạo ra trong khi đó các isotyp IgG2 và IgG4 của người có ít hoặc không có độc tính tế bào do thể tạo ra. Các vùng hằng định của chuỗi nhẹ có thể là lamda hoặc kappa. Các kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng các tetrame chứa hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, là các chuỗi nặng, chuỗi nhẹ riêng rẽ, như Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, hoặc là các kháng thể chuỗi đơn trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết thông qua đoạn đệm.

Các vùng hằng định của người linh hoạt quá trình biến đổi dị kiểu và biến đổi đồng dị kiểu giữa các cá thể khác nhau, tức là các vùng hằng định có thể là khác nhau trong các cá thể khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí đa hình. Đồng dị kiểu khác biệt với dị kiểu ở chỗ huyết thanh nhận diện đồng dị kiểu liên kết với miền không đa hình của một hoặc nhiều isotyp. Việc đề cập đến vùng hằng định của người bao gồm vùng hằng định có dị kiểu tự nhiên bất kỳ hoặc hoán vị bất kỳ của các gốc chiếm giữ các vị trí đa hình trong các dị kiểu tự nhiên hoặc lên tới 3, 5 hoặc 10 đoạn thể để làm giảm hoặc làm tăng chức năng tác động như nêu dưới đây.

Một hoặc một vài axit amin ở đầu tận cùng amino hoặc carboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng, như lysin có đầu tận cùng C của chuỗi nặng, có thể bị khuyết hoặc được tạo dẫn xuất một phần hoặc toàn bộ các phân tử. Việc thể có thể được thực hiện

trong các vùng hằng định để làm giảm hoặc làm tăng chức năng tác động như độc tính tế bào do bổ thể tạo ra hoặc ADCC (xem, ví dụ: Patent Mỹ số 5,624,821 của Winter và các đồng tác giả; Patent Mỹ số 5,834,597 của Tso và các đồng tác giả; và Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài thời gian bán thải ở người (xem, ví dụ: Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004). Việc thế làm ví dụ bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (đánh số theo hệ EU được dùng trong đoạn này đối với vùng hằng định) để tăng thời gian bán thải của kháng thể. Việc thế ở vị trí bất kỳ hoặc tất cả các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 đều làm giảm ái lực đối với các thụ thể Fcγ, đặc biệt là thụ thể FcγRI (xem, ví dụ: US 6,624,821). Việc thế alanin ở vị trí 234, 235 và 237 của IgG1 của người được ưu tiên để làm giảm chức năng tác động. Tùy ý, các vị trí 234, 236 và/hoặc 237 ở IgG2 của người được thế bằng alanin và vị trí 235 được thế bằng glutamin. (xem, ví dụ: US 5,624,821.)

G. Biểu hiện các kháng thể tái tổ hợp

Các kháng thể thể khảm, được nhân hóa (kể cả được bọc) và kháng thể của người thường tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Các axit nucleic mã hóa các kháng thể có thể được tối ưu hóa bằng codon để biểu hiện trong loại tế bào mong muốn (ví dụ, CHO hoặc Sp2/0). Các axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ 16B5 được nhân hóa đã được bộc lộ trong bản mô tả này có các trình tự chứa hoặc cấu thành bởi, ví dụ, SEQ ID NO: 25 (mã hóa Hu16B5 H1), SEQ ID NO: 26 (mã hóa Hu16B5 L1), SEQ ID NO: 27 (mã hóa Hu16B5 L2), hoặc SEQ ID NO: 28 (mã hóa Hu16B5 L3). Đối với các vùng biến đổi bao gồm các peptit tín hiệu như SEQ ID NO. 10 và 16, axit nucleic có thể mã hóa vùng biến đổi có hoặc không có peptit tín hiệu. Các đoạn axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể có mặt trên phân tử axit nucleic liên kế tương tự hoặc trên các phân tử riêng rẽ. Các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được biểu hiện từ cùng một vector hoặc từ các vật truyền khác nhau. Các axit nucleic thường được tạo ra ở dạng phân lập.

Các axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng 16B5 được làm giống như axit của người có thể được liên kết với axit nucleic đoạn mã hóa vùng hằng định IgG1 của người, ví dụ, có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 30. Các axit nucleic như vậy còn có thể chứa intron nằm giữa các đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng hằng định

IgG1, tức là đầu tận cùng 5' tới đoạn mã hóa vùng hằng định. Trình tự axit nucleic làm ví dụ mã hóa vùng hằng định IgG1 của người và có intron của chuột nhất ở đầu tận cùng 5' của nó được nêu trong SEQ ID NO: 31.

Các axit nucleic mã hóa các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 16B5 được làm giống như axit của người có thể được liên kết với axit nucleic đoạn mã hóa vùng hằng định kappa của người, ví dụ, có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33. Các axit nucleic như vậy còn có thể chứa intron nằm giữa các đoạn mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng hằng định kappa (tức là đầu tận cùng 5' tới vùng hằng định kappa). Trình tự axit nucleic làm ví dụ mã hóa vùng hằng định kappa của người và có intron của người ở đầu tận cùng 5' của nó được nêu trong SEQ ID NO: 34.

Cấu trúc của axit nucleic tái tổ hợp thường bao gồm trình tự kiểm soát biểu hiện được liên kết linh hoạt với trình tự mã hoá của các chuỗi kháng thể, bao gồm miền chứa gen khởi đầu có liên quan trong tự nhiên hoặc khác loại. Tốt hơn, nếu các trình tự điều chỉnh biểu hiện là hệ gen khởi đầu của sinh vật có nhân điển hình trong vật truyền có khả năng biến nạp hoặc chuyển nhiễm các tế bào vật chủ của sinh vật có nhân điển hình. Ngay khi vật truyền được đưa vào vật chủ thích hợp, thì vật chủ này được duy trì trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện trình tự nucleotit ở mức cao, và thu gom và làm sạch các kháng thể phản ứng chéo. Vectơ hoặc các vectơ mã hóa các chuỗi kháng thể còn có thể chứa gen có khả năng chọn lọc, như dihydrofolat reductaza hoặc glutamin synthaza, để cho phép khuếch đại số lượng bản sao của các axit nucleic mã hóa chuỗi kháng thể.

E. coli là vật chủ chưa có nhân điển hình đặc biệt hữu dụng để biểu hiện các kháng thể, đặc biệt là các đoạn kháng thể. Các vi khuẩn, như nấm men cũng là hữu dụng để biểu hiện. *Saccharomyces* là vật chủ của nấm men được ưu tiên, chứa các vectơ thích hợp có trình tự kiểm soát biểu hiện, có nguồn gốc sao chép, các trình tự kết thúc và trình tự tương tự, nếu muốn. Các gen khởi đầu thông thường bao gồm 3-phosphoglycerat kinaza và enzym thủy phân glucoza khác. Các gen khởi đầu được tạo ra bởi nấm men bao gồm, trong số nhiều gen khác, các gen khởi đầu từ dehydrogenaza của rượu, isoxytochrom C, và các enzym liên quan đến việc sử dụng maltoza và galactoza.

Các tế bào của động vật có vú là tế bào vật chủ để biểu hiện các phân đoạn nucleotit mã hóa globulin miễn dịch hoặc các đoạn của chúng. Xem tài liệu của Winnacker, từ phần Gen đến phần Dòng, (VCH Publishers, NY, 1987). Nhiều dòng tế bào vật chủ thích hợp có khả năng tiết các protein khác loại nguyên vẹn đã được phát triển trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm các dòng tế bào CHO, các dòng tế bào COS khác nhau, tế bào HeLa, tế bào HEK293, tế bào L và tế bào u tủy không sản sinh kháng thể kể cả Sp2/0 và NS0. Tốt hơn, nếu các tế bào là tế bào không phải của người. Các vật truyền biểu hiện đối với các tế bào này có thể bao gồm trình tự kiểm soát biểu hiện, như có nguồn gốc từ quá trình sao chép, gen khởi đầu, gen tăng cường (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), và các vị trí thông tin xử lý cần thiết, như vị trí gắn kết ribosom, vị trí ghép ARN, vị trí polyadenyl hóa, và trình tự kết thúc phiên mã. Trình tự kiểm soát biểu hiện được ưu tiên là các gen khởi đầu có nguồn gốc từ các gen nội sinh, xytomegalovirut, SV40, adenovirut, papilomvirut của bò, và các loại tương tự. Xem tài liệu: Co *et al.*, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Khi (các) vật truyền đã được đưa vào để mã hóa kháng thể của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ vào môi trường tế bào, thì tập hợp các tế bào có thể được sàng lọc theo năng suất phát triển và chất lượng sản phẩm trong môi trường không có huyết thanh. Sau đó, tập hợp các tế bào sản sinh trên bề mặt có thể được tạo dòng tế bào đơn trên cơ sở FACS để tạo ra các dòng tế bào đơn dòng. Năng suất đặc hiệu lớn hơn 50pg/tế bào hoặc 100pg/tế bào trong một ngày, tương ứng với nồng độ của sản phẩm lớn hơn 7,5g/l môi trường, có thể được ưu tiên. Các kháng thể đã sản sinh bởi các dòng tế bào đơn lẻ cũng có thể được thử nghiệm về độ đục, các đặc tính lọc, PAGE, IEF, quét UV, HP-SEC, tạo bản đồ hydratecacbon-oligosacarit, quang phổ khối, và thử nghiệm gắn kết, như ELISA hoặc Biacore. Sau đó, dòng đã được chọn có thể được nuôi cấy trong nhiều lọ nhỏ và được bảo quản đông lạnh để sử dụng tiếp.

Ngay khi được biểu hiện, các kháng thể có thể được làm sạch theo các quy trình chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm kỹ thuật bắt giữ protein A, sắc ký cột (ví dụ, tương tác kỵ nước hoặc trao đổi ion), tiến hành ở độ pH thấp để làm bất hoạt virut và các quy trình tương tự (tổng quan: Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Phương pháp sản xuất công nghiệp các kháng thể có thể được sử dụng, bao gồm việc tối ưu hóa bằng codon, lựa chọn gen khởi đầu, các yếu tố phiên mã, và gen kết thúc, tách dòng tế bào đơn lẻ không chứa huyết thanh, thu gom tế bào, sử dụng các chất đánh dấu chọn lọc để khuếch đại nhiều bản sao, gen kết thúc CHO, tạo dòng tế bào đơn lẻ không chứa huyết thanh, cải thiện nồng độ protein (xem, ví dụ: US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, và WO2009/027471, và US 5,888,809).

IV. Tác nhân gây miễn dịch chủ động

Tác nhân được sử dụng để gây miễn dịch chủ động đóng vai trò tạo ra cùng loại kháng thể đã được mô tả liên quan đến quá trình gây miễn dịch thụ động nêu trên ở người bệnh. Các tác nhân được sử dụng cho quá trình gây miễn dịch chủ động có thể là cùng loại tác nhân gây miễn dịch dùng để tạo ra các kháng thể đơn dòng ở các động vật trong phòng thí nghiệm, ví dụ, peptit gồm 3 đến 15 hoặc 3 đến 12 hoặc 5 đến 12, hoặc 5 đến 8 axit amin liền kề từ vùng tau tương ứng với các gốc 23 đến 46, 25 đến 44, 28 đến 41 hoặc 30 đến 39 của trình tự SEQ ID NO. 1, ví dụ, peptit bao gồm các gốc 28 đến 30, 28 đến 31, 28 đến 32, 28 đến 33, 28 đến 34, 28 đến 35, 28 đến 36, 28 đến 37, 28 đến 38, 28 đến 39, 28 đến 40, 28 đến 41, 29 đến 31, 29 đến 32, 29 đến 33, 29 đến 34, 29 đến 35, 29 đến 36, 29 đến 37, 29 đến 38, 29 đến 39, 29 đến 40, 29 đến 41, 30 đến 32, 30 đến 33, 30 đến 34, 30 đến 35, 30 đến 36, 30 đến 37, 30 đến 38, 30 đến 39, 30 đến 40, 30 đến 41, 31 đến 33, 31 đến 34, 31 đến 35, 31 đến 36, 31 đến 37, 31 đến 38, 31 đến 39, 31 đến 40, 31 đến 41, 32 đến 34, 32 đến 35, 32 đến 36, 32 đến 37, 32 đến 38, 32 đến 39, 32 đến 40, 32 đến 41, 33 đến 35, 33 đến 36, 33 đến 37, 33 đến 38, 33 đến 39, 33 đến 40, 33 đến 41, 34 đến 36, 34 đến 37, 34 đến 38, 34 đến 39, 34 đến 40, 34 đến 41, 35 đến 37, 35 đến 38, 35 đến 39, 35 đến 40, 35 đến 41, 36 đến 38, 36 đến 39, 36 đến 40, 36 đến 41 của trình tự SEQ ID NO:1. Để tạo ra các kháng thể gắn kết với cùng một epitop hoặc epitop chồng lên nhau như 16B5, tính đặc hiệu epitop của các kháng thể này có thể được lập bản đồ (ví dụ, bằng cách gắn kết thử nghiệm với một loạt các peptit chồng lên nhau kéo dài tới tau). Sau đó, một đoạn tau cấu thành bởi hoặc bao gồm hoặc chồng lên nhau epitop có thể được dùng làm

tác nhân gây miễn dịch. Các đoạn như vậy thường được dùng ở dạng không được phosphoryl hóa.

Chất mang và chất hỗ trợ khác loại, nếu được sử dụng, có thể là giống nhau như được dùng để tạo ra kháng thể đơn dòng, nhưng còn có thể được chọn để tạo ra độ ổn định tốt hơn trong được phẩm để dùng cho người. Các chất mang thích hợp bao gồm albumin huyết thanh, hemoxyanin từ con hà, các phân tử globulin miễn dịch, thyroglobulin, lòng trắng trứng, biến độc tố uốn ván, hoặc biến độc tố từ vi khuẩn gây bệnh khác, như bệnh bạch hầu (ví dụ, CRM197), *E. coli*, bệnh tả, hoặc *H. pylori*, hoặc dẫn xuất độc tố đã bị suy yếu. Các epitop của tế bào T cũng là các phân tử mang thích hợp. Một số thể tiếp hợp có thể được tạo ra bằng các tác nhân liên kết theo sáng chế với phân tử polyme kích thích miễn dịch (ví dụ, tripalmitoyl-S-glyxerin xystein (Pam₃Cys), manan (polyme manosa), hoặc glucan (polyme β 1→2)), các xytokin (ví dụ, các peptit IL-1, IL-1 alpha và β , IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF), và các chất hóa ứng động (ví dụ, MIP1- α và β , và RANTES). Tác nhân gây miễn dịch có thể được liên kết với các chất mang có hoặc không có các axit amin đệm (ví dụ, gly-gly). Các chất mạng bao gồm các tiểu phân giống virus. Các tiểu phân giống virus (VLP), còn được gọi giả virus hoặc các tiểu phân có nguồn gốc từ virus, có cấu trúc siêu phân tử cấu thành bởi nhiều bản sao của capsit virus và/hoặc protein có vỏ có khả năng tự lắp ráp vào các VLP có tính đối xứng cầu đã được xác định *in vivo*. (Powilleit, *et al.*, (2007) PLoS ONE 2(5):e415). Theo cách khác, peptit gây miễn dịch có thể được liên kết với ít nhất một epitop tế bào T nhân tạo có khả năng liên kết với rất nhiều phân tử MHC thuộc Nhóm II, như epitop kéo dài DR ("PADRE"). PADRE được bộc lộ trong US 5,736,142, WO 95/07707, và tài liệu: Alexander J *et al*, *Immunity*, 1:751-761 (1994). Các tác nhân gây miễn dịch hoạt tính có thể có mặt dưới dạng multime trong đó nhiều bản sao của tác nhân gây miễn dịch và/hoặc chất mang của nó có mặt dưới dạng một phân tử đồng hóa trị duy nhất.

Các đoạn thường được dùng với chất hỗ trợ được dụng. Chất hỗ trợ làm tăng nồng độ của các kháng thể đã được tạo ra và/hoặc ái lực liên kết của các kháng thể đã được cảm ứng so với khi peptit được sử dụng riêng lẻ. Nhiều loại chất hỗ trợ có thể được sử dụng kết hợp với đoạn sinh miễn dịch của tau để tạo ra đáp ứng miễn dịch. Các chất hỗ trợ được ưu

tiên làm tăng đáp ứng nội tại với tác nhân gây miễn dịch mà không gây ra các thay đổi về cấu hình trong hợp chất gây miễn dịch mà ảnh hưởng tới khả năng đáp ứng. Tốt hơn, nếu các chất bổ trợ bao gồm các hợp chất nhôm, như nhôm hydroxit và nhôm phosphat, 3 De-O-axylat monophosphoryl lipit A (MPL™) (xem GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, nay là một phần của Corixa). Stimulon™ QS-21 là triterpen glycosit hoặc saponin phân lập được từ vỏ của cây Quillaja Saponaria Molina tìm thấy ở Nam Mỹ (xem tài liệu của Kensil và các đồng tác giả, trong *Vaccine Design: the Subunit và Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; hiện là Antigenics, Inc., New York, NY). Các chất bổ trợ khác là nhũ tương dầu trong nước (như squalen hoặc dầu lạc), tùy ý kết hợp với chất kích thích miễn dịch, như monophosphoryl lipit A (xem tài liệu: Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polyme pluronic, và vi khuẩn *mycobacteria* đã chết. Các tá dược ribi là nhũ tương dầu trong nước. Tá dược ribi chứa dầu dễ chuyển hóa (squalen) được nhũ hóa với nước muối chứa Tween 80. Ribi còn chứa các sản phẩm *mycobacteria* đã được tinh sạch làm các chất kích thích miễn dịch và monophosphoryl lipit A của vi khuẩn. Chất bổ trợ khác là CpG (WO 98/40100). Các chất bổ trợ có thể được dùng làm thành phần của dược phẩm dùng để điều trị bệnh chứa hoạt chất hoặc có thể được dùng riêng rẽ, trước, đồng thời với, hoặc sau khi dùng tác nhân điều trị bệnh.

Các chất tương tự của các đoạn tự nhiên chứa tau tạo ra các kháng thể kháng tau cũng có thể được sử dụng. Ví dụ, một hoặc nhiều hoặc tất cả các axit amin L có thể được thế bằng các axit amin D trong các peptit này. Ngoài ra, thứ tự của các axit amin cũng có thể đảo ngược (peptit retro). Tùy ý, peptit bao gồm tất cả các axit amin D theo thứ tự đảo ngược (peptit retro-inverso). Các peptit và các hợp chất khác không nhất thiết phải có mức độ tương đồng về trình tự axit amin với các peptit tau nhưng không có vai trò làm chất giống peptit tau và gây ra đáp ứng miễn dịch tương tự. Các kháng thể kháng kiểu idio kháng lại các kháng thể đơn dòng với tau như nêu trên cũng có thể được sử dụng. Các kháng thể kháng-Id giả kháng nguyên và tạo ra đáp ứng miễn dịch với nó (xem tài liệu: *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6th ed., p. 181).

Peptit (và tùy ý chất mang ngưng tụ với peptit này) cũng có thể được dùng ở dạng axit nucleic mã hóa peptit và được biểu hiện tại chỗ ở người bệnh. Đoạn axit nucleic mã hóa tác nhân gây miễn dịch thường được liên kết với các yếu tố điều khiển, như gen khởi đầu và gen tăng cường cho phép biểu hiện đoạn ADN trong các tế bào đích dự định của người bệnh. Để biểu hiện trong các tế bào máu, như muốn gây ra đáp ứng miễn dịch, gen khởi đầu và gen tăng cường từ các gen globulin miễn dịch của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng hoặc gen khởi đầu và gen tăng cường sớm trung gian chính của CMV là thích hợp để biểu hiện trực tiếp. Yếu tố điều khiển đã liên kết và các trình tự mã hóa thường được tách dòng vào vector. Các kháng thể cũng có thể được dùng ở dạng axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể. Nếu có mặt cả chuỗi nặng lẫn chuỗi nhẹ, thì tốt hơn nếu các chuỗi này được liên kết ở dạng kháng thể của chuỗi đơn. Các kháng thể để dùng thụ động còn có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách sắc ký ái lực từ huyết thanh của các người bệnh đã được điều trị bằng peptit gây miễn dịch.

ADN có thể được phân phối ở dạng trần (tức là không có nguyên liệu tạo keo hoặc nguyên liệu bao nang). Theo cách khác, nhiều hệ vật truyền virus có thể được sử dụng bao gồm các hệ retrovirus (ví dụ, xem tài liệu: Lawrie và Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); vật truyền adenovirus {ví dụ, xem tài liệu: Bett *et al.*, *J. Virol.* 67, 591-1 (1993)); vật truyền virus liên quan đến adeno {ví dụ, xem tài liệu: Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), các vector virus từ họ thủy đậu bao gồm virus đậu mùa và virus thủy đậu ở loài chim, các vector virus từ chi virus alpha như các virus thu được từ các virus Sindbis và Semliki rừng (ví dụ, xem tài liệu: Dubensky *et al.*, *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), virus gây bệnh viêm não ở ngựa Vê-nê-zua-la (xem US 5,643,576) và Rhabdovirus, như virus gây bệnh viêm miệng có nang (xem WO 96/34625) và virus gây u nhú (Ohe *et al.*, *Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); WO 94/12629 của Woo và các đồng tác giả và Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

ADN mã hóa tác nhân gây miễn dịch, hoặc vector chứa cùng, có thể được bao gói thành các liposom. Các lipid và các chất tương tự thích hợp liên quan được bộc lộ trong US 5,208,036, US 5,264,618, US 5,279,833 và US 5,283,185. Các vector và ADN mã hóa tác nhân gây miễn dịch cũng có thể hấp phụ lên hoặc liên quan đến tiểu phân mang, các ví dụ

về các chất này bao gồm các polyme polymetyl metacrylat và polylactit và poly(lactit-co-glycolit), (ví dụ, xem tài liệu: McGee *et al.*, *J. Micro Encap.* 1996).

V. Các phương pháp sàng lọc

Các kháng thể có thể được sàng lọc ban đầu về tính đặc hiệu gắn kết dự định như nêu trên. Các tác nhân gây miễn dịch hoạt tính có thể cũng được sàng lọc theo khả năng tạo ra các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết như vậy. Trong trường hợp này, tác nhân gây miễn dịch hoạt tính được dùng để gây miễn dịch cho động vật ở phòng thí nghiệm và huyết thanh thu được đã được thử nghiệm về tính đặc hiệu gắn kết thích hợp.

Sau đó, các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết mong muốn có thể được thử nghiệm ở mô hình tế bào và mô hình động vật. Tốt hơn, nếu các tế bào đã được sử dụng để sàng lọc như vậy là các tế bào thần kinh. Mô hình tế bào bị bệnh do tau gây ra đã được thông báo, trong đó các u nguyên bào thần kinh được biến nạp bằng vùng tau lặp lại bốn lần, tùy ý có đột biến liên quan đến bệnh do tau gây ra (ví dụ, delta K280, xem tài liệu: Khlistunova, *Current Alzheimer Research* 4, 544-546 (2007)). Trong mô hình khác, tau được tạo ra trong dòng tế bào u nguyên bào thần kinh N2a bằng cách bổ sung doxycyclin. Các mô hình tế bào cho phép tác giả sáng chế nghiên cứu độc tính của tau đối với các tế bào ở trạng thái hòa tan hoặc kết tụ, hình dạng của các khối kết tụ tau sau khi ngừng biểu hiện gen tau, khả năng hòa tan của các khối kết tụ tau sau khi ngừng tiếp sự biểu hiện gen, và hiệu quả của các kháng thể trong việc ức chế sự hình thành các khối kết tụ tau hoặc giải kết tụ chúng.

Các kháng thể hoặc các tác nhân gây miễn dịch hoạt tính cũng có thể được sàng lọc ở các mô hình động vật chuyển gen của các bệnh liên quan đến tau. Các động vật chuyển gen này có thể có gen chuyển tau (ví dụ, dạng đồng chức năng bất kỳ của người) và tùy ý gen chuyển APP của người trong số các loại gen khác, như kinaza để phosphoryl hóa tau, ApoE, presenilin hoặc alpha synuclein. Các động vật chuyển gen này được bố trí để phát triển ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng bệnh liên quan đến tau.

Động vật chuyển gen làm ví dụ là dòng K3 của chuột nhắt (Itner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(41):15997-6002 (2008)). Các con chuột nhắt này có gen chuyển tau

của người chứa đột biến K 369 I (đột biến liên quan đến bệnh Pick) và gen khởi đầu Thy 1.2. Mô hình này có thời gian thoái hóa thần kinh nhanh, khiếm khuyết vận động và thoái biến các sợi hướng tâm và các tế bào hạt trong não. Động vật làm ví dụ khác là dòng pR5 của chuột nhắt. Các con chuột nhắt này có gen chuyển tau của người chứa đột biến P301L (đột biến liên quan đến bệnh mất trí tiến đình thái dương) và gen khởi đầu Thy 1.2 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, *et al.*, *Nat Genet.* 25:402-405 (2000)). Các con chuột nhắt này bị thoái hóa thần kinh diễn ra từ từ hơn. Các con chuột có các đám rối sợi thần kinh phát triển ở một vài vùng não và dây tủy sống, được đưa vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn). Đây là mô hình tuyệt vời để nghiên cứu kết quả của việc phát triển đám rối và để sàng lọc điều trị mà có thể ức chế sự tạo ra các khối kết tụ này. Lợi ích khác của các mô hình trên động vật này là bệnh lý phát triển tương đối sớm. Để làm đồng nhất, các bất thường về hành vi liên quan đến bệnh lý do tau có thể quan sát được trong thời gian sớm ít nhất 3 tháng, nhưng các động vật vẫn có sức khỏe tương đối tốt cho tới ít nhất 8 tháng tuổi. Nói cách khác, khi được 8 tháng tuổi, các động vật có thể tự di chuyển, tự ăn được, và có thể thực hiện được các hành vi đủ linh hoạt để cho phép kiểm soát được hiệu quả điều trị bệnh. Quá trình gây miễn dịch hoạt tính cho các con chuột nhắt này trong thời gian từ 6 đến 13 tháng có nồng độ tạo AI wI KLH-PHF-1 khoảng 1.000 và chỉ ra rằng xuất hiện một số đám rối sợi thần kinh, lượng nhỏ pSer422, và giảm cân nhẹ so với các động vật đối chứng không được điều trị.

Hoạt tính của các kháng thể hoặc các hoạt chất có thể được đánh giá theo các tiêu chuẩn khác nhau bao gồm mức giảm lượng tau toàn phần hoặc tau đã được phosphoryl hóa, giảm các đặc tính gây bệnh khác, như các mảng A β dạng tinh bột, và ức chế hoặc trì hoãn hoặc khiếm khuyết về hành vi. Các tác nhân gây miễn dịch hoạt tính cũng có thể được thử nghiệm về khả năng tạo ra kháng thể trong huyết thanh. Cả tác nhân gây miễn dịch thụ động lẫn chủ động có thể được thử nghiệm về khả năng di chuyển của các kháng thể qua hàng rào máu não vào não động vật chuyển gen. Các kháng thể hoặc các đoạn tạo ra kháng thể cũng có thể được thử nghiệm ở động vật linh trưởng không phải là người mà tự nhiên có hoặc bằng cách tạo ra các triệu chứng của bệnh đặc trưng bởi tau. Các thử nghiệm trên kháng thể hoặc hoạt chất thường được thực hiện cùng với chất đối chứng trong đó một thử nghiệm song song được tiến hành với điều kiện không có mặt kháng thể

hoặc hoạt chất (ví dụ, thay bằng chất dẫn). Việc làm giảm, trì hoãn hoặc ức chế dấu hiệu hoặc triệu chứng bệnh có thể do kháng thể hoặc hoạt chất gây ra trong quá trình thử nghiệm sau đó có thể được đánh giá so với nhóm đối chứng.

VI. Người bệnh cần được điều trị

Sự có mặt của các đám rối sợi thần kinh đã được tìm thấy ở một vài bệnh bao gồm bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, hội chứng Parkinson sau viêm não, chứng mất trí sau chấn thương hoặc chứng mất trí do chấn thương, bệnh Niemann-Pick typ C, chứng liệt trên nhân, bệnh mất trí tiền đình thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ/chứng mất trí kết hợp với bệnh Parkinson của Guam, và chứng liệt trên nhân tiến triển PSP. Các phác đồ theo sáng chế cũng có thể được dùng trong quá trình điều trị hoặc phòng bệnh bất kỳ trong số các bệnh này. Do mối liên quan mật thiết giữa các bệnh thần kinh và tình trạng bệnh lý và tau, các phác đồ theo sáng chế có thể được dùng trong việc điều trị hoặc phòng bệnh cho đối tượng bất kỳ có lượng tau gia tăng hoặc tau đã được phosphoryl hóa (ví dụ, trong CSF) so với trị số trung bình trong các cá thể không bị bệnh thần kinh. Các phác đồ theo sáng chế cũng có thể được dùng trong việc điều trị hoặc phòng bệnh thần kinh ở các cá thể có đột biến ở tau liên quan đến bệnh thần kinh. Các phương pháp theo sáng chế là đặc biệt thích hợp để điều trị hoặc phòng bệnh Alzheimer, và đặc biệt là ở người bệnh.

Người bệnh cần điều trị bao gồm các cá thể có nguy cơ mắc bệnh nhưng không có triệu chứng, cũng như các người bệnh có triệu chứng. Các người bệnh có nguy cơ mắc bệnh bao gồm các bệnh nhân có nguy cơ di truyền đã biết của bệnh. Các cá thể này bao gồm các cá thể có liên quan đã từng mắc bệnh này, và các cá thể có nguy cơ đã được xác định theo phân tích chất đánh dấu di truyền hoặc sinh hóa. Các dấu hiệu di truyền về nguy cơ bao gồm các đột biến ở tau, như các dạng nêu trên, cũng như các đột biến ở các gen khác liên quan đến bệnh thần kinh. Ví dụ, alen ApoE4 ở dạng dị hợp tử và tốt hơn là ở dạng đồng hợp tử liên quan đến nguy cơ mắc bệnh Alzheimer. Các dấu hiệu khác về nguy cơ mắc bệnh Alzheimer bao gồm các đột biến ở gen APP, đặc biệt là các đột biến ở vị trí 717 và vị trí 670 và 671 lần lượt được gọi là các đột biến Hardy và Swedish, các đột biến ở gen presenilin, PS1 và PS2, tiền sử gia đình bị AD, tăng cholesterol trong máu hoặc chứng

xơ vữa động mạch. Các cá thể đã mắc bệnh Alzheimer có thể được nhận diện bằng cách chụp ảnh PET, do chứng mất trí đặc trưng gây ra, cũng như khi có mặt các yếu tố nguy cơ nêu trên. Ngoài ra, nhiều thử nghiệm chẩn đoán là sẵn có để xác định các cá thể có mắc AD hay không. Các thử nghiệm này bao gồm việc đo nồng độ CSF tau hoặc phospho-tau và A β 42. Nồng độ tau hoặc phospho-tau tăng và nồng độ A β 42 giảm chứng tỏ có mặt AD. Một số đột biến liên quan đến bệnh Parkinson. Ala30Pro hoặc Ala53, hoặc các đột biến ở các gen khác liên quan đến bệnh Parkinson như kinaza chứa đoạn lặp giàu leuxin, PARK8. Các cá thể cũng có thể được chẩn đoán bởi các bệnh thần kinh bất kỳ nêu trên theo các tiêu chuẩn của DSM IV TR.

Ở bệnh nhân không có triệu chứng, việc điều trị có thể bắt đầu ở độ tuổi bất kỳ (ví dụ, 10, 20, 30). Tuy nhiên, thường không nhất thiết phải bắt đầu việc điều trị cho đến khi người bệnh 40 tuổi, 50 tuổi, 60 tuổi hoặc 70 tuổi. Việc điều trị thường đòi hỏi dùng nhiều liều trong một khoảng thời gian. Việc điều trị bệnh có thể được theo dõi bằng cách thử nghiệm nồng độ kháng thể theo thời gian. Nếu không có đáp ứng, liều cao hơn được chỉ định. Trong trường hợp bệnh nhân mắc hội chứng Down, việc điều trị bệnh có thể bắt đầu trước khi sinh bằng cách dùng tác nhân điều trị bệnh cho người mẹ hoặc sau khi sinh một thời gian ngắn.

VII. Dược phẩm và phương pháp điều trị bệnh

Trong các ứng dụng phòng bệnh, kháng thể hoặc tác nhân tạo ra kháng thể hoặc dược phẩm chứa chúng được dùng bởi người bệnh mắc bệnh, hoặc theo cách khác có nguy cơ mắc bệnh (ví dụ, bệnh Alzheimer) theo phác đồ (liều lượng, tần suất dùng và đường dùng) hữu hiệu để làm giảm nguy cơ, giảm nhẹ mức độ trầm trọng bệnh, hoặc trì hoãn sự khởi phát của ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng bệnh. Cụ thể, tốt hơn nếu phác đồ này là hữu hiệu để ức chế hoặc trì hoãn sự hình thành tau hoặc phospho-tau và các sợi tạo cặp trong não, và/hoặc ức chế hoặc trì hoãn độc tính của nó và/hoặc ức chế/hoặc trì hoãn sự phát triển của các thiếu hụt về hành vi. Trong các ứng dụng điều trị, kháng thể hoặc tác nhân tạo ra kháng thể được dùng bởi người bệnh dễ mắc, hoặc đã mắc bệnh (ví dụ, bệnh Alzheimer) theo phác đồ (liều lượng, tần suất dùng và đường dùng) hữu hiệu để làm giảm hoặc ít nhất ức chế sự phá hủy tiếp ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng bệnh.

Cụ thể, tốt hơn nếu phác đồ này là hữu hiệu để làm giảm hoặc ít nhất ức chế mức làm tăng tiếp lượng tau, phospho-tau, hoặc các sợi tạo cặp được tạo ra từ đó, các độc tính có liên quan và/hoặc các thiếu hụt về hành vi.

Phác đồ được xem là có tác dụng điều trị hoặc phòng bệnh nếu một bệnh nhân đã được điều trị đạt kết quả có lợi hơn so với kết quả trung bình của nhóm đối chứng gồm các bệnh nhân so sánh không được điều trị bằng các phương pháp theo sáng chế, hoặc nếu kết quả có lợi hơn đã được chứng minh ở bệnh nhân đã được điều trị so với các bệnh nhân đối chứng ở thử nghiệm lâm sàng có kiểm soát (ví dụ, thử nghiệm pha II, pha II/III hoặc pha III) ở mức $p < 0,05$ hoặc $0,01$ hoặc ngay cả ở mức $0,001$.

Liều lượng hữu hiệu thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm đường dùng, vị trí đích, tình trạng sinh lý của bệnh nhân, bệnh nhân có phải là người mang ApoE hay không, bệnh nhân là người hay động vật, các thuốc khác đã dùng, và xem việc điều trị là có tác dụng điều trị hay phòng bệnh.

Khoảng liều lượng làm ví dụ đối với các kháng thể nằm trong khoảng từ $0,01\text{mg/kg}$ đến 5mg/kg , và thường nằm trong khoảng từ $0,1\text{mg/kg}$ đến 3mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ $0,15\text{mg/kg}$ đến 2mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ $0,15\text{mg/kg}$ đến $1,5\text{mg/kg}$ thể trọng bệnh nhân. Kháng thể có thể được dùng với các liều như vậy hằng ngày, cách ngày, hằng tuần, hai tuần một lần, hằng tháng, ba tháng một lần, hoặc theo liệu trình khác bất kỳ xác định được bằng cách phân tích theo kinh nghiệm. Việc điều trị làm ví dụ đòi hỏi cần dùng nhiều liều trong khoảng thời gian dài, ví dụ, ít nhất sáu tháng. Các phác đồ điều trị bệnh khác làm ví dụ đòi hỏi cần dùng một lần trong hai tuần hoặc một lần trong một tháng hoặc một lần trong thời gian 3 tháng đến 6 tháng.

Lượng của tác nhân hoạt tính nằm trong khoảng từ $0,1\mu\text{g/người bệnh}$ đến $500\mu\text{g/người bệnh}$ và tốt hơn là nằm trong khoảng từ $1\mu\text{g}$ đến $100\mu\text{g}$ hoặc $1\mu\text{g}$ đến $10\mu\text{g}$ mỗi lần tiêm khi dùng cho người. Thời điểm tiêm có thể thay đổi đáng kể từ một lần một ngày, tới một lần một năm, tới một lần mười năm. Phác đồ thông thường bao gồm việc gây miễn dịch, sau đó tiêm liều cao cách nhau theo thời gian, như cách nhau 6 tuần hoặc hai tháng. Phác đồ khác bao gồm việc gây miễn dịch, tiếp theo tiêm liều cao sau đó 1 tháng, 2 tháng và 12 tháng. Phác đồ khác đòi hỏi tiêm cách nhau hai tháng trong suốt cuộc đời.

Theo cách khác, việc tiêm liều cao có thể được tiến hành không theo quy tắc nào do được tiến hành bằng cách theo dõi đáp ứng miễn dịch.

Tốt hơn, nếu các kháng thể hoặc các tác nhân tạo ra các kháng thể được dùng qua đường ngoại biên (tức là đường dùng, trong đó kháng thể đã dùng hoặc đã được tạo ra đi qua hàng rào máu não tới vị trí đã định trong não). Các đường dùng bao gồm dùng khu trú, tĩnh mạch, đường miệng, dưới da, trong động mạch, trong sọ, trong vỏ, trong màng bụng (IP), qua mũi hoặc trong cơ. Các đường dùng kháng thể được ưu tiên là đường dùng trong tĩnh mạch và dưới da. Các đường gây miễn dịch hoạt tính được ưu tiên là đường dùng trong tĩnh mạch và dưới da. Vị trí tiêm hầu hết thường được tiến hành ở cơ tay hoặc chân. Trong một số phương pháp, các tác nhân được tiêm trực tiếp vào mô cụ thể trong đó các chất lắng đọng được tích tụ, ví dụ, khi tiêm trong sọ.

Tốt hơn, nếu dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa là vô trùng và hầu như đẳng trương và được sản xuất theo tiêu chuẩn GMP. Dược phẩm có thể được bào chế ở dạng liều đơn vị (tức là liều để dùng một lần duy nhất). Dược phẩm có thể được bào chế bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất hỗ trợ dược dụng. Quy trình bào chế là tùy thuộc vào đường dùng đã chọn. Để tiêm, các kháng thể có thể được bào chế ở dạng dung dịch nước, tốt hơn là trong dung dịch đệm tương thích về mặt sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc nước muối sinh lý hoặc dung dịch đệm axetat (để làm giảm sự khó chịu ở vị trí tiêm). Dung dịch này có thể chứa các chất cấu thành như chất tạo hỗn dịch, chất làm ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo cách khác, các kháng thể có thể ở dạng đông khô nhanh để tạo ra với chất dẫn thuốc thích hợp, ví dụ, nước vô trùng không chứa chất gây sốt, trước khi dùng.

Các phác đồ theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với các tác nhân khác có tác dụng điều trị hoặc phòng bệnh cần điều trị. Ví dụ, trong trường hợp bệnh Alzheimer, các phác đồ theo sáng chế có thể được kết hợp với liệu pháp miễn dịch khác A β (WO/2000/072880), các chất ức chế cholinesteraza hoặc memantin hoặc trong trường hợp bệnh Parkinson cần kết hợp với liệu pháp miễn dịch kháng alpha synuclein nêu trong WO/2008/103472 của Levodopa, các chất chủ vận dopamin, các chất ức chế COMT, các chất ức chế MAO-B, Amantadine, hoặc các tác nhân chống tiết axetylcholin.

VIII. Tạo ảnh *in vivo*, phương pháp chẩn đoán bệnh, và tối ưu hóa liệu pháp miễn dịch

Sáng chế mô tả các phương pháp tạo ảnh *in vivo* các mảng lắng đọng protein tau (ví dụ, các đám rối sợi thần kinh và thể vùi tau) ở người bệnh. Các phương pháp được tiến hành bằng cách cho người bệnh dùng chất phản ứng, như kháng thể mà liên kết với tau (ví dụ, kháng thể 16B5, đã được bọc, nhân hóa, thể khảm hoặc của chuột), và sau đó phát hiện tác nhân sau khi nó đã được gắn kết. Các kháng thể gắn kết với epitop của tau nằm trong các axit amin từ 24 đến 46 là được ưu tiên. Trong một số phương pháp, kháng thể gắn kết với epitop nằm trong các axit amin từ 25 đến 44, hoặc nằm trong các axit amin từ 30 đến 39. Đáp ứng rõ ràng với các kháng thể đã dùng có thể tránh được hoặc giảm được bằng cách sử dụng các đoạn kháng thể không chứa vùng hằng định có chiều dài đầy đủ, như các Fab. Trong một số phương pháp, kháng thể tương tự có thể dùng làm chất phản ứng điều trị lần chẩn đoán bệnh.

Các chất phản ứng dùng để chẩn đoán bệnh có thể được dùng bằng cách tiêm qua đường tĩnh mạch vào cơ thể người bệnh, hoặc dùng trực tiếp vào não bằng cách tiêm trong sọ hoặc bằng cách khoan lỗ qua sọ. Liều lượng của chất phản ứng nên nằm trong cùng khoảng như đối với các phương pháp điều trị bệnh. Thông thường, chất phản ứng được gắn nhãn, mặc dù trong một số phương pháp, chất phản ứng sơ cấp có ái lực với tau không được gắn nhãn và chất gắn nhãn thứ cấp được sử dụng để gắn kết với chất phản ứng sơ cấp. Việc lựa chọn dấu phụ thuộc vào cách thức dò. Ví dụ, dấu huỳnh quang là thích hợp đối với việc dò quang học. Việc sử dụng các dấu thuận từ là thích hợp để dò cắt lớp mà không có sự can thiệp của việc phẫu thuật. Các dấu có hoạt tính phóng xạ cũng có thể được dò bằng cách sử dụng PET hoặc SPECT.

Phương pháp tạo ảnh *in vivo* các mảng lắng đọng protein tau là hữu ích để chẩn đoán hoặc chẩn đoán xác nhận bệnh do tau gây ra, như bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, chứng liệt trên nhân tiến triển và bệnh Pick, hoặc có nguy cơ dễ mắc các bệnh này. Ví dụ, các phương pháp có thể được sử dụng trên người bệnh có các triệu chứng mất trí. Nếu có các đám rối sợi thần kinh bất thường, thì người bệnh có thể đã mắc bệnh Alzheimer. Theo cách khác, nếu người bệnh có thể vùi tau bất thường, thì tùy theo vị trí của các thể vùi, người bệnh có thể mắc bệnh thoái hóa thùy trán thái dương. Các

phương pháp cũng có thể được sử dụng cho các bệnh nhân không có triệu chứng. Sự có mặt của các mảng lắng đọng protein tau bất thường biểu thị nguy cơ dễ mắc bệnh có triệu chứng trong tương lai. Các phương pháp này còn là hữu dụng để theo dõi quá trình tiến triển của bệnh và/hoặc khả năng đáp ứng với việc điều trị ở các người bệnh đã được chẩn đoán trước đó là mắc bệnh liên quan đến tau.

Việc chẩn đoán có thể được thực hiện bằng cách so sánh số lượng, kích thước, và/hoặc mật độ của vị trí đã gắn nhãn, so với trị số nền tương ứng. Các trị số nền cơ bản có thể biểu thị mức trung bình trong nhóm gồm các cá thể không mắc bệnh. Các trị số nền cũng có thể biểu thị các mức đã xác định được trước đó ở cùng người bệnh. Ví dụ, các trị số nền có thể được xác định ở người bệnh trước khi bắt đầu liệu pháp miễn dịch tau, và các trị số đo được sau đó được so sánh với các trị số nền. Việc giảm trị số so với các trị số nền chứng tỏ có đáp ứng dương với việc điều trị.

Ở một số người bệnh, việc chẩn đoán bệnh do tau gây ra có thể được trợ giúp bằng cách tiến hành quét PET. Việc quét PET có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, bộ tạo ảnh PET thông thường và thiết bị trợ giúp. Việc quét thường bao gồm một hoặc nhiều vùng của não thường đã biết là liên quan đến các mảng lắng đọng protein tau và một hoặc nhiều vùng, trong đó quét vài vùng nếu các khối kết tụ bất kỳ thường có mặt có tác dụng làm đối chứng.

Tín hiệu phát hiện được trong quá trình quét PET có thể được thể hiện ở dạng ảnh đa chiều. Ảnh đa chiều có thể ở dạng ảnh hai chiều có mặt cắt qua não, ở dạng ảnh ba chiều, thể hiện không gian ba chiều của não, hoặc ở dạng bốn chiều thể hiện các thay đổi về không gian ba chiều của não sau một khoảng thời gian. Tỷ lệ màu có thể được dùng với các màu khác nhau biểu thị lượng nhãn khác nhau và, do vậy, các mảng lắng đọng protein tau phát hiện được. Kết quả của việc quét cũng có thể thể hiện được về mặt số lượng, trong đó số lượng liên quan đến lượng nhãn đã phát hiện được và từ đó biết được các mảng lắng đọng protein tau. Nhãn có mặt trong vùng não đã biết là liên quan đến các mảng lắng đọng của bệnh lý cụ thể do tau gây ra (ví dụ, bệnh Alzheimer) có thể được so sánh với nhãn có mặt trong vùng đã biết không liên quan đến các mảng lắng đọng để thu được tỷ lệ là dấu hiệu thể hiện mức độ của các mảng lắng đọng nằm trong vùng trước đó. Đối với phổi tử đã

được gắn nhãn phóng xạ tương tự, các tỷ lệ này có thể làm thước đo so sánh các mảng lắng đọng protein tau và mức thay đổi của chúng giữa các người bệnh khác nhau.

Trong một số phương pháp, quá trình quét PET được thực hiện đồng thời cùng với hoặc trong cùng một lần thăm khám bệnh nhân như khi quét MRI hoặc CAT. Việc quét MRI hoặc CAT đưa ra các chi tiết giải phẫu của não chi tiết hơn so với việc quét PET. Tuy nhiên, hình ảnh thu được từ việc quét PET có thể bị chồng lên hình ảnh quét MRI hoặc CAT thể hiện chính xác hơn vị trí của phổi tử PET và từ đó các mảng lắng đọng tau được so sánh với cấu trúc giải phẫu trong não. Một số thiết bị có thể thực hiện được cả việc quét PET lẫn quét MRI hoặc CAT mà không cần thay đổi vị trí của người bệnh giữa các lần quét để thuận tiện cho việc chồng hình ảnh.

Các phổi tử PET thích hợp bao gồm các kháng thể gắn nhãn đồng vị phóng xạ theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 16B5, đã được bọc nhân hóa, thể khảm hoặc của chuột). Đồng vị phóng xạ được sử dụng có thể, ví dụ, là C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} , hoặc I^{123} . Khoảng cách giữa các lần dùng phổi tử PET và tiến hành quét có thể phụ thuộc vào phổi tử PET và đặc biệt là tốc độ hấp thu và khả năng làm sạch não, và thời gian bán thải của dấu đồng vị phóng xạ của nó.

Việc quét PET cũng có thể được tiến hành làm thước đo phòng bệnh ở bệnh nhân không có triệu chứng hoặc ở các người bệnh có các triệu chứng suy giảm nhận thức nhẹ nhưng vẫn chưa được chẩn đoán là bị bệnh do tau gây ra nhưng có nguy cơ cao phát triển bệnh do tau gây ra. Đối với các bệnh nhân không có triệu chứng, việc quét là đặc biệt hữu dụng để cá thể xem xét nguy cơ cao bị bệnh do tau gây ra do tiền sử gia đình, các yếu tố nguy cơ di truyền hoặc sinh hóa, hoặc độ tuổi trưởng thành. Việc quét nhằm phòng bệnh có thể được thực hiện, ví dụ, ở người bệnh có độ tuổi từ 45 đến 75. Ở một số người bệnh, việc quét lần đầu tiên được thực hiện ở độ tuổi 50.

Việc quét để phòng bệnh có thể được thực hiện với khoảng thời gian, ví dụ, từ sáu tháng đến mười năm, tốt hơn là từ 1 năm đến 5 năm. Ở một số người bệnh, việc quét để phòng bệnh được thực hiện hằng năm. Nếu việc quét PET được thực hiện là thước đo phòng bệnh thể hiện lượng kết tụ protein tau lớn bất thường, thì liệu pháp miễn dịch có thể được bắt đầu và sau đó, tiến hành quét PET như ở các người bệnh đã được chẩn đoán bị

bệnh do tau gây ra. Nếu việc quét PET được thực hiện là thước đo phòng bệnh thể hiện lượng kết tụ protein tau nằm trong mức bình thường, thì có thể được thực hiện quét PET tiếp ở các khoảng thời gian từ sáu tháng đến 10 năm, và tốt hơn là từ 1 năm đến 5 năm như nêu trên, hoặc đáp lại sự xuất hiện của các dấu hiệu và các triệu chứng của bệnh do tau gây ra hoặc suy giảm nhận thức nhẹ. Bằng cách kết hợp việc quét để phòng bệnh với việc dùng liệu pháp miễn dịch hướng trực tiếp đến tau, nếu và khi mức bình thường nêu trên của các mảng lắng đọng protein tau phát hiện được, thì lượng kết tụ protein tau có thể được làm giảm, hoặc tiến gần tới mức thông thường, hoặc ít nhất ức chế sự gia tăng tiếp theo, và người bệnh có thể không bị bệnh do tau gây ra trong thời gian dài nếu không quét để phòng bệnh và tiếp nhận liệu pháp miễn dịch hướng trực tiếp tới tau (ví dụ, ít nhất 5 năm, 10 năm, 15 năm hoặc 20 năm, hoặc trong phần đời còn lại của người bệnh).

Lượng thông thường của các mảng lắng đọng protein tau có thể được xác định bằng lượng của các đám rối sợi thần kinh hoặc thể vùi tau trong não của mẫu đại diện của cá thể ở nhóm khỏe mạnh không được chẩn đoán là mắc bệnh cụ thể do tau gây ra (ví dụ, bệnh Alzheimer) và không có nguy cơ cao phát triển bệnh này (ví dụ, mẫu đại diện là cá thể không mắc bệnh dưới 50 tuổi). Theo cách khác, lượng thông thường có thể được nhận diện ở từng người bệnh nếu tín hiệu PET theo các phương pháp theo sáng chế nằm trong vùng não trong đó đã biết rằng các mảng lắng đọng protein tau phát triển không khác nhau (nằm trong độ chính xác của phép đo) so với tín hiệu thu được từ vùng não trong đó đã biết rằng các mảng lắng đọng này phát triển không bình thường. Nồng độ tăng cao ở cá thể có thể được nhận diện bằng cách so sánh với nồng độ thông thường (ví dụ, trị số trung bình nằm ngoài và biến thiên của sai số chuẩn) hoặc đơn giản là so sánh với tín hiệu gia tăng nằm ngoài sai số thử nghiệm trong vùng não liên quan đến các mảng lắng đọng protein tau so với vùng không biết là liên quan đến các mảng lắng đọng. Nhằm các mục đích so sánh nồng độ của các mảng kết tụ protein tau ở cá thể và nhóm cá thể, tốt hơn nếu các mảng lắng đọng protein tau được xác định trong cùng một vùng của não, các vùng này bao gồm ít nhất một vùng mà tạo ra các mảng lắng đọng protein tau liên quan đến bệnh cụ thể do tau gây ra (ví dụ, bệnh Alzheimer) là đã biết. Người bệnh có nồng độ các mảng lắng đọng protein tau tăng cao là người dự tuyển để bắt đầu liệu pháp miễn dịch.

Sau khi bắt đầu liệu pháp miễn dịch, việc giảm nồng độ của các mảng lắng đọng protein tau có thể được quan sát trước tiên là dấu chỉ ra rằng việc điều trị này là thu được tác dụng mong muốn. Mức giảm quan sát được có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1% đến 100%, nằm trong khoảng từ 1% đến 50%, hoặc nằm trong khoảng từ 1% đến 25% trị số nền. Tác dụng này có thể được xác định được trong một hoặc nhiều vùng não trong đó đã biết rằng các mảng lắng đọng được tạo ra hoặc có thể được xác định so với trị số trung bình của các vùng này. Tác dụng điều trị toàn phần có thể được ước tính bằng cách cộng tỷ lệ phần trăm mức giảm so với đường nền với mức tăng trung bình của các mảng kết tụ protein tau xuất hiện theo cách khác ở người bệnh không được điều trị.

Việc duy trì các mảng lắng đọng protein tau ở mức hằng định hoặc thậm chí là làm tăng nhẹ các mảng lắng đọng protein tau cũng có thể là dấu chỉ ra khả năng đáp ứng với việc điều trị cho dù đáp ứng này là dưới mức tối ưu. Các đáp ứng như vậy có thể được so sánh với tiến trình theo thời gian của lượng các mảng lắng đọng protein tau ở các người bệnh mắc bệnh cụ thể do tau gây ra (ví dụ, bệnh Alzheimer) không nhận được việc điều trị, để xác định liệu liệu pháp miễn dịch có hiệu quả trong việc ức chế sự gia tăng tiếp của các mảng lắng đọng protein tau hay không.

Việc kiểm tra các thay đổi về các mảng lắng đọng protein tau cho phép dùng liệu pháp miễn dịch hoặc dùng phác đồ khác đáp ứng với việc điều trị. Việc kiểm tra PET cung cấp chỉ dấu của bản chất và mức độ đáp ứng với việc điều trị. Tiếp đó, việc xác định có thể được thực hiện xem có cần điều chỉnh việc điều trị hay không và nếu việc điều trị mong muốn có thể được điều chỉnh để đáp ứng với việc kiểm tra PET hay không. Do đó, việc kiểm tra PET cho phép liệu pháp miễn dịch hướng trực tiếp tới tau hoặc dùng phác đồ điều trị khác cần được điều chỉnh trước khi các chất đánh dấu sinh học khác, MRI hoặc việc đánh giá về nhận thức có đáp ứng có thể phát hiện được. Mức thay đổi có nghĩa là so sánh trị số của thông số sau khi điều trị so với trị số nền để đưa ra một số chứng cứ rằng việc điều trị thu được hoặc không thu được hiệu quả có lợi. Trong một số trường hợp, mức thay đổi về trị số của thông số ở chính người bệnh đã đưa ra một số chứng cứ rằng việc điều trị thu được hoặc không thu được hiệu quả có lợi. Trong các trường hợp khác, mức thay đổi về trị số, nếu có, ở người bệnh, được so sánh với mức thay đổi về trị số, nếu có, ở nhóm

bệnh nhân đối chứng đại diện không dùng liệu pháp miễn dịch. Mức chênh lệch về đáp ứng ở người bệnh cụ thể so với đáp ứng thông thường ở bệnh nhân đối chứng (ví dụ, trị số trung bình cộng với phương sai của sai số chuẩn) cũng có thể đưa ra chứng cứ rằng phác đồ theo liệu pháp miễn dịch đạt được hoặc không đạt được hiệu quả có lợi ở người bệnh.

Ở một số người bệnh, việc kiểm soát biểu thị mức giảm có thể phát hiện được ở các mảng lắng đọng protein tau nhưng lượng các mảng lắng đọng protein tau vẫn ở mức cao hơn bình thường. Ở các người bệnh này, nếu không xuất hiện tác dụng phụ không thể chấp nhận được, thì phác đồ điều trị có thể được tiếp tục như ban đầu hoặc thậm chí là tăng ở tần suất dùng và/hoặc liều lượng nếu chưa đạt tới liều lượng tối đa được khuyến cáo.

Nếu việc kiểm tra chỉ ra lượng các mảng lắng đọng protein tau ở người bệnh giảm so với lượng các mảng lắng đọng protein tau ở mức bình thường, hoặc gần mức bình thường, thì phác đồ theo liệu pháp miễn dịch có thể được điều chỉnh từ một trong số quá trình tạo ra (tức là làm giảm lượng các mảng lắng đọng protein tau) thành một trong số quá trình duy trì (tức là duy trì các mảng lắng đọng protein tau ở lượng gần như hằng định). Phác đồ như vậy có thể được tác động bằng cách làm giảm liều lượng và hoặc tần suất dùng liệu pháp miễn dịch.

Ở các người bệnh khác, việc kiểm tra có thể chứng tỏ được rằng liệu pháp miễn dịch thu được một số tác dụng điều trị bệnh nhưng là tác dụng dưới mức tối ưu. Tác dụng tối ưu có thể được xác định ở dạng tỷ lệ phần trăm của mức giảm lượng mảng lắng đọng protein tau trên một nửa hoặc một phần tư so với mức thay đổi về các mảng lắng đọng protein tau (đo được hoặc tính được trong toàn bộ não hoặc (các) vùng tương ứng của chúng trong đó đã biết rằng các mảng lắng đọng protein tau được tạo ra) được đưa ra bởi mẫu đại diện của bệnh nhân mắc bệnh do tau gây ra đã dùng liệu pháp miễn dịch ở thời điểm nhất định sau khi bắt đầu điều trị. Người bệnh có mức giảm nhỏ hoặc người bệnh có các mảng lắng đọng protein tau vẫn ở mức hằng định hoặc thậm chí tăng, nhưng cao hơn không đáng kể so với mong muốn khi không dùng liệu pháp miễn dịch (ví dụ, như được suy ra từ nhóm bệnh nhân đối chứng không được dùng liệu pháp trị liệu miễn dịch) có thể được phân loại thành nhóm dương tính với bệnh nhưng chỉ có đáp ứng dưới mức tối ưu.

Các người bệnh này có thể tùy ý được điều chỉnh phác đồ trong đó liều và hoặc tần suất dùng tác nhân được tăng lên.

Ở một số người bệnh, các mảng lắng đọng protein tau có thể làm tăng mảng lắng đọng tau ở mức tương tự hoặc lớn hơn so với các người bệnh không dùng liệu pháp miễn dịch. Nếu mức tăng này vẫn tiếp diễn trong một khoảng thời gian, như 18 tháng hoặc 2 năm, thậm chí sau khi tăng bất kỳ về tần suất hoặc liều của các tác nhân, thì việc dùng liệu pháp miễn dịch nếu muốn có thể dừng lại để tiến hành việc điều trị bệnh khác.

Phần mô tả về việc chẩn đoán, kiểm tra, và điều chỉnh phác đồ điều trị đối với các bệnh liên quan tới tau nêu trên chủ yếu nhằm vào việc sử dụng các kỹ thuật quét PET. Tuy nhiên, kỹ thuật khác bất kỳ để hiển thị và/hoặc xác định các mảng lắng đọng protein tau mà chấp nhận việc sử dụng các kháng thể tau theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 16B5, đã được bọcnhân hóa, thể khảm hoặc của chuột) cũng có thể được sử dụng thay cho kỹ thuật quét PET để thực hiện các phương pháp này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

VÍ DỤ 1. Tạo kháng thể 16B5

Kháng thể pan 16B5, nhận diện tau ở dạng được hoặc không được phosphoryl hóa, được gọi ra gắn kết với tau được tinh sạch và được lựa chọn dựa trên các đặc tính bất giữ ái lực cao của nó trong thử nghiệm ELISA.

VÍ DỤ 2. Tạo dòng và giải trình tự của kháng thể 16B5

ARN được lấy ra từ các tế bào kết vón biểu hiện kháng thể 16B5 bằng cách sử dụng Trizol LS (do Invitrogen cung cấp). Nồng độ ARN được đo bằng cách sử dụng kit Quant-IT (do Invitrogen cung cấp).

5'-RACE được dùng để khuếch đại đầu tận cùng 5' của ARN thông tin của IgG bằng cách sử dụng kit Smart RACE (do Clontech cung cấp). Khoảng 1 µg ARN được sử dụng cho phản ứng RT và các bể ADN bổ trợ được khuếch đại tiếp bằng cách sử dụng đoạn mồi vạn năng kèm theo kit Smart RACE và các đoạn mồi đặc hiệu gen (GSP) được thiết kế ở ExonBIO.

Các trình tự đoạn môi:

Đoạn môi vụn nặng: CTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO: 7)

Các GSP:

IgG1 và IgG2a: CTC AAT TTT CTT GTC CAC CTT GGT GC (SEQ ID NO: 8)

IgG2b: CTC AAG TTT TTT GTC CAC CGT GGT GC (SEQ ID NO: 9)

Các sản phẩm PCR được tinh sạch gel và được tạo dòng vào vector pSUPER-blunt (Adexon, www.adexonbiotech.com). Đối với chuỗi nặng, 15 khuẩn lạc được chuẩn bị ở mức mini và được giải trình tự. Đối với chuỗi nhẹ, PCR của khuẩn lạc được thực hiện để phân biệt chuỗi nhẹ kháng thường nội sinh, và chỉ có các dòng không được khuếch đại từ PCR của khuẩn lạc được giải trình tự. Các kết quả giải trình tự được phân tích trên vật truyền NTI. Chất thích ứng và các trình tự đoạn môi GSP được đánh dấu trên bản đồ. Các vùng nằm giữa chất thích ứng và các trình tự GSP là các trình tự của chuỗi nặng IgG bao gồm đoạn dẫn đầu, peptit tín hiệu và miền V và phần của vùng hằng định. ORF được đánh dấu trên bản đồ.

VÍ DỤ 3. Lập bản đồ epitop của kháng thể 16B5

Xác định epitop bằng cách phân tích đoạn peptit. Trình tự tau của người chứa 4 đoạn lặp gắn kết vi ống và không có đoạn chen có đầu tận cùng N, và chứa đột biến P301L (rTau), được thể hiện ở *E. coli* và được tinh sạch. Dạng này của tau có trình tự nêu trong SEQ ID NO:3, bằng cách thế leuxin bằng prolin ở vị trí 243 (tương ứng với P301L bằng cách sử dụng quy ước đánh số dựa trên dạng đồng chức năng dài nhất của tau). Quá trình phân giải bằng enzym c200ug tau được thực hiện bằng một trong số bốn proteaza khác nhau: trypsin (phân cắt ở đầu carboxyl của arginin và lysin), chymotrypsin (phân cắt sơ bộ ở đầu tận cùng carboxyl của tyrosin, tryptophan, phenylalanin và leuxin), LysC (phân cắt ở đầu tận cùng carboxyl của lysin), hoặc GluC (phân cắt sau các gốc glutamat và hiếm khi phân cắt sau các gốc aspartat). Tất cả các proteaza đều mua được từ Thermo Scientific, và quá trình phân giải được thực hiện trong thời gian 16 giờ ở 37°C. Các đoạn peptit thu được

được ủ với 10 μ g 16B5, và được làm kết tủa bằng cách sử dụng hạt từ tính protein G (NEB). Các chất kết tủa được rửa cẩn thận trong PBS chứa 300mM NaCl và 0,5% NP-40, sau đó được rửa giải bằng dung dịch tách 1M NaCl trong 100mM glyxin, độ pH=2,8. Dịch rửa giải được sấy khô trong chân không và được tạo huyền phù lại trong dung dịch axit trifloaxetic 0,1% (TFA). Dịch rửa giải đã được tạo huyền phù lại được nạp vào cột C18 4,6x50mm, sau đó được phân đoạn theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) (thiết bị Agilent 1260 Infinity) bằng cách sử dụng gradien tuyến tính chứa axetonitril với 0,075% TFA. Các phân đoạn pic được thu gom, sấy khô và được tạo huyền phù lại trong nước cất. Các khối peptit và mức độ tương đồng được xác định bằng MALDI-TOF/TOF. Pic tương ứng với các gốc 25 đến 44 của trình tự SEQ ID NO:1 được xác định trong phổ LysC MS. Các pic tương ứng với các gốc 25 đến 44 của trình tự SEQ ID NO:1 và 24 đến 44 được xác định trong phổ Trypsin MS. Không thu được tín hiệu nào từ quá trình phân giải chymotrypsin và GluC, chứng tỏ rằng một số epitop có thể chứa gốc 29 của trình tự SEQ ID NO:1 và/hoặc gốc 37 của trình tự SEQ ID NO:1.

Xác định epitop bằng cách phân tích đột biến. Bằng cách sử dụng các kết quả xác định được bằng cách phân tích đoạn peptit (nêu trên), tạo đột biến khuyết rTau được thực hiện bằng cách khuếch đại toàn bộ plasmit bằng cách sử dụng các phương pháp sinh học phân tử tiêu chuẩn. Protein được biểu hiện trong thể tích môi trường nuôi cấy vi khuẩn nhỏ, và thể tích tương đương của dịch phân giải trong chứa vi khuẩn được điện di, tạo vết, và được nhuộm bằng kháng thể 16B5. Để tiến hành đối chứng nhằm nạp mẫu, Tau46, kháng thể có tính đặc hiệu với vùng đầu tận cùng C của tau (epitop có đầu tận cùng C), được sử dụng để nhuộm các vết kép. Cả hai kháng thể được sử dụng ở nồng độ 0,2 μ g/ml. Các ảnh được bắt giữ bằng cách sử dụng máy quét huỳnh quang Licor Odyssey. Các đột biến khuyết của tau dưới đây được tạo ra và phân tích theo cách này: Δ 5-24, Δ 23-32, Δ 25-44, Δ 30-39, và Δ 37-46. Như được thể hiện trên các Hình 1 và 2, các đột biến khuyết của tau Δ 25-44 và Δ 30-39 không được dò bằng kháng thể 16B5, chứng tỏ rằng epitop đã được nhận diện bởi 16B5 nằm trong các gốc đó. Đột biến khuyết của tau Δ 37-46 chỉ phát hiện được với lượng không đáng kể bằng 16B5, chứng tỏ rằng một số gốc nằm trong số 37 đến 46 (ví dụ, gốc 37) có thể đóng vai trò gắn kết 16B5 với tau. Kháng thể 16B5 đã nhuộm đột biến khuyết của tau Δ 23-32 yếu hơn so với Δ 5-24 và mạnh hơn so với

các đột biến khuyết $\Delta 25-44$ và $\Delta 30-39$, từ đó chứng tỏ rằng 16B5 còn có thể liên kết với peptit chứa các gốc 33 đến 36, 30 đến 36, 33 đến 37, 30 đến 37 hoặc 33 đến 39. Tóm lại, dữ liệu thu được từ các đột biến khuyết tau gợi ý rằng epitop nhận diện được bởi 16B5 có thể bao gồm một vài hoặc tất cả các gốc 23 đến 32 của trình tự SEQ ID NO:1 và một vài hoặc tất cả các gốc 37 đến 46 của trình tự SEQ ID NO:1. Ví dụ, 16B5 có thể nhận diện epitop nằm trong các gốc 32-38 hoặc 28 đến 41 của trình tự SEQ ID NO:1.

Xác định epitop bằng cách quét alanin. Các gốc đơn lẻ trong vùng của tau kéo dài tới các gốc 30 đến 42 được tạo đột biến tiếp thành alanin bằng cách sử dụng kỹ thuật tạo đột biến PCR. Các protein đã được tạo đột biến được biểu hiện, và các dịch phân giải được phân giải bằng kỹ thuật điện di và tạo vết bằng kháng thể 16B5 hoặc kháng thể Tau46, như nêu trên. Kết quả của phân tích này được thể hiện trên Hình 3. Đột biến điểm cụ thể được phân tích, bao gồm T30A, M31A, H32A, Q33A, D34A, Q35A, E36A, G37A, D38A, T39A, D40A, A41L và G42A, được liệt kê trên đây dưới dạng vết. Các gốc cụ thể được bọc trong hộp nằm trên mỗi vết. Khả năng gắn kết có thể phát hiện được của 16B5 được loại trừ hoàn toàn bởi đột biến Q33A của tau và hầu như được giảm bởi đột biến G37A của tau, từ đó chứng tỏ rằng gốc 33, và gắn kết yếu hơn so với gốc 37, có thể là các thành phần quan trọng của epitop đã được nhận diện bởi 16B5. Các gốc khác có thể là các thành phần quan trọng của epitop đã được nhận diện bởi 16B5 trong phân tích Biacore.

VÍ DỤ 4. Gây miễn dịch thụ động ở mô hình chuột chuyển gen hTau.P301L mắc bệnh do tau gây ra

[0143] Gây miễn dịch. Các con chuột nhắt cái hTau.P301L-Tg 3 tháng tuổi trên nền tảng di truyền FVB/N được sử dụng đối với thử nghiệm này. 10mg/kg kháng thể thử nghiệm và kháng thể đối chứng được dùng qua đường trong khoang màng bụng, một lần một tuần. Thời gian điều trị bệnh khoảng 5 tháng. Sau khi tiêm 23 lần, kết thúc nghiên cứu này bằng cách giết chuột nhắt. Bảng 1 thể hiện kháng thể thử nghiệm và đối chứng dùng trong thử nghiệm này.

Bảng 1

Phác đồ liều

	Nhóm K	Nhóm M
Kháng thể	16B5	6F10
Tính đặc hiệu gắn kết	Nằm trong số 23 đến 46 (xem Ví dụ 3)	Kháng thể đối chứng isotyp IgG1 không tạo miễn dịch
N	22	22
Điều trị	N2	N3
Liều lượng	10mg/kg hằng tuần	10mg/kg hằng tuần
Liều lượng theo thể tích	1,724ml/kg	2,381ml/kg

Hiện tượng chết do sinh non là kiểu hình quan sát được ở mô hình loài gặm nhấm chuyển gen mắc bệnh do tau gây ra. Mô hình cụ thể dùng trong thử nghiệm này phát triển tau đã được siêu phosphoryl hóa ở 6 tháng tuổi, mặc dù việc khởi phát có tính biến thiên mạnh. Chuột nhất cũng bị khiếm khuyết vận động như khả năng giữ chân sau và giảm vận động toàn thân, và chết do sinh non ở độ tuổi 8 tháng đến 11 tháng (dữ liệu chưa được công bố reMYND, Terwel *et al.*, 2005). Chuột nhất có các triệu chứng bệnh trong giai đoạn muộn, được đặc trưng bởi sự có mặt của kiểu giữ chân và giảm cân, được giết. Một số lượng lớn chuột nhất không mong muốn đã chết do sinh non không có các triệu chứng này. Nguyên nhân gây ra cái chết trong các trường hợp này được xem là không liên quan đến bệnh do tau gây ra trong giai đoạn muộn hoặc thử nghiệm kháng thể, và thay vào đó là liên quan đến nền tảng FVB/N bẩm sinh.

Bảng 2 thể hiện tổng quan về khả năng sống sót hoàn toàn của tất cả các con chuột nhất trong quá trình nghiên cứu.

Bảng 2

Khả năng sống sót trong quá trình điều trị (mọi nguyên nhân dẫn đến tử vong)

		N tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu	N còn sống tại thời điểm đem giết	% sống sót

Bảng 2

Khả năng sống sót trong quá trình điều trị (mọi nguyên nhân dẫn đến tử vong)

Nhóm K	N2	22(23)*	11	50(47)
Nhóm M	N3	22	13	59

*Một con chuột trong Nhóm K cần được thay thế khi bắt đầu nghiên cứu. Dữ liệu này có thể được phân tích có hoặc không có con chuột thay thế này.

Sau khi giết, chuột nhất được mổ giải phẫu và thân não và não giữa được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng máy đồng nhất cơ học bằng gốm (VOS 14 S40, tốc độ 750 vòng/phút; VWR) trong 10 trọng lượng-thể tích chứa dung dịch đệm trong nước đá chứa chất ức chế Tris-proteinaza-phosphatase (dung dịch đệm TPPI) chứa: 20mM Tris-HCl (độ pH=8,1); 150mM NaCl; 1mM axit etylen điamin tetraaxetic (EDTA, Merck); 1mM axit etylen glycol tetraaxetic (EGTA, do Sigma-Aldrich cung cấp); 5mM natri pyrophosphat (do Sigma cung cấp); 30mM natri florua (Sigma-Aldrich); 1mM PMSF (do Sigma cung cấp); 2mM natri vanadat (do Sigma cung cấp); 10mM 1,10-ortho-phenanthrolinmonohydrat (Sigma-Aldrich); 5µg/ml chất ức chế trypsin từ đồ tương; 5µg/ml pepstatin; và hỗn hợp gồm các chất ức chế proteinaza (CPI, Roche Diagnostics GmbH, Germany). Thể tích cố định 140µl và 100µl dịch đồng nhất thân não và não giữa (TotH), lần lượt (khoảng một nửa tổng thể tích) được ly tâm ở tốc độ 136000xg, trong thời gian 60 phút ở 4°C (bộ phận quay TLA-55, OptimaTMTLX Ultracentrifuge, Beckman Coulter) để tạo ra phân đoạn hòa tan Tris (SF), và phần còn lại của tổng lượng dịch đồng nhất cần được bảo quản ở -80°C. Do số lượng vòng kẹp hạn chế (N=12), các mẫu được phân chia một cách ngẫu nhiên để cân bằng máy ly tâm và chia các nhóm điều trị bệnh khác nhau vào các giai đoạn ly tâm khác nhau.

Dịch nổi trên bề mặt (S1, còn được gọi là “phân đoạn hòa tan” hoặc “SF”) được tách ra khỏi cặn vón (P1), được phân chia và bảo quản ở -80°C. Cặn vón P1 được hòa tan trong 10 thể tích trọng lượng chứa dung dịch có nồng độ muối cao (0,85M NaCl chứa dung dịch đệm TPPI) và được ly tâm ở tốc độ 20000xg (200.000m/s^2), trong thời gian 30

phút ở 4°C. Cặn vón có nồng độ muối cao thu được (P2) được bảo quản ở -80°C. Dịch nổi trên bề mặt (S2) được cho vào 1% Sarkosyl với một phần mười của 10% Sarkosyl và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 60 phút trong máy trộn quay kiểu đảo đỉnh, sau đó được ly tâm ở tốc độ 136000xg ($1.360.000\text{m/s}^2$), trong thời gian 60 phút ở 4°C. Dịch nổi trên bề mặt đã hòa tan Sarkosyl (S3) được bảo quản ở -80°C và cặn vón không hòa tan sarkosyl (P3, còn được gọi là “phân đoạn không hòa tan” hoặc “IF”) được tạo huyền phù lại trong 30µl dung dịch đệm TPPI và được phân chia. Dịch đồng nhất toàn phần (TotH), các phân đoạn chứa thân não hòa tan Tris (SF), và phân đoạn không hòa tan Sarkosyl (IF) được tạo ra bằng quy trình phân đoạn nêu trên được dùng trong các phân tích điện di gel poly-acrylamit và thâm tách Western dưới đây.

Điện di gel poly-acrylamit và thâm tách Western. Để sử dụng SDS-PAGE và thâm tách Western thông thường, các mẫu được làm biến tính và được khử bằng cách ủ ở 95°C trong thời gian 10 phút, sau đó được tách trên 7,5% gel Tris-HCl (Criterion XT Precast Gel, đĩa dạng tổ ong có 26 lỗ, 15µl, 1,0mm; Biorad). Sau khi truyền điện khô (iBlot™ Invitrogen) vào màng PVDF (iBlot™ Gel Transfer Stacks, PVDF, Regular, Invitrogen), các màng này được rửa trong 0,4% PFA trong thời gian 30 phút và sau đó được rửa bằng dung dịch chứa nước muối đệm Tris. Tiếp theo, các màng này được ủ trong nước muối đệm Tris (TBS, độ pH=7,6) chứa 5% (trọng lượng/thể tích) sữa khô không chứa chất béo và 0,1% (thể tích) Tween-20 trong thời gian 1 giờ. Các vết được ủ với các kháng thể chính kháng tau khác nhau qua đêm, ở nồng độ làm việc được thể hiện trong Bảng 3. Sau khi rửa và ủ với kháng thể phụ đã tiếp hợp với HRP kháng chuột hoặc kháng thỏ (IgG của dê kháng chuột hoặc dê kháng thỏ, DAKO), các vết được phát triển bởi thiết bị dò ECL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, product 34096, Thermo Scientific). Hình ảnh được ghi ở dạng số (VisionWorks Acquisition, UVP) với các thời điểm phơi nhiễm khác nhau, và phần mềm đặc trưng (VisionWorks Analysis, UVP) được sử dụng đối với phân tích các vết. Để so sánh, gel quy chiếu giữa các gen được chạy với các phân chứa bốn phân đoạn cần chạy trên mỗi gel để so sánh. Các kháng thể đơn dòng chính kháng tau được sử dụng để dò bao gồm AT100 (phospho-Tau, Thermo Scientific; tỷ lệ pha loãng 1:250), AT8 (phospho-Tau, Thermo Scientific; tỷ lệ pha loãng 1:500), HT7 (pan Tau, Pierce; tỷ lệ pha loãng 1:1000), và 1F5 (epitop chưa biết đối với

Testing Facility, Neotope, tỷ lệ pha loãng 3:500). Các vết được thử nghiệm lại bằng kháng GAPDH (Abcam 9485; tỷ lệ pha loãng 1:2500) làm đối chứng tải. Các kháng thể Pan Tau là không đặc hiệu với phospho-Tau.

Bảng 3

Tóm tắt về các kháng thể được sử dụng đối với phân tích hóa sinh

mAb	Nhà cung cấp	Tính đặc hiệu (người)	Nồng độ gốc	Nồng độ làm việc
AT100	Thermo Scientific	Phospho-PHF- tau pSer212/Thr21 4	200µg/ml	0,8µg/ml
AT 8	Thermo Scientific	Phospho-PHF- tau pSer202/Thr20 5	200µg/ml	0,4µg/ml
HT7	Pierce	nằm giữa gốc 159 và gốc 163	200µg/ml	0,2µg/ml
1F5*	Neotope	pS ⁴⁰⁴	1mg/ml	6µg/ml
GAPDH	Abcam	Người	1mg/ml	0,4µg/ml

*dạng đồng chức năng IgG2b, thể lai JH131-1F5.4.1, lô số NB-0081

Như được thể hiện trên Hình 4, mức giảm lượng tau đáng kể về mặt thống kê được quan sát thấy ở các phân đoạn thân não không hòa tan sarkosyl thu được từ các con vật đã được điều trị bằng kháng thể 16B5, so với các con vật được điều trị bằng kháng thể đối chứng 6F10. Mức ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm t Student, $p < 0,05$. Mức làm giảm được quan sát đối với cả các kháng thể đặc hiệu với phospho-tau (AT8, ô bên trái phía trên; AT100, ô bên trái phía dưới; 1F5, ô bên phải phía trên) và các kháng thể pan-tau (HT7, ô bên phải phía dưới). Phân tích các vết thấm tách Western của dịch đồng nhất toàn phần cũng chỉ ra mức giảm đáng kể về tỷ lệ giữa phospho-tau và tau toàn phần ở các con vật đã được điều trị bằng 16B5 so với các con vật đối chứng đã được điều trị bằng kháng thể 6F10, khi phát hiện được bằng kháng thể đặc

hiệu với phospho. Xem Hình 5, ô bên trái (thể hiện tín hiệu phát hiện được bằng kháng thể kháng phospho-tau AT8 chia cho tín hiệu đã được phát hiện bằng kháng thể HT7 pan tau). Trái lại, không có sự thay đổi có ý nghĩa về tỷ lệ giữa tau toàn phần và nồng độ GAPDH trong dịch đồng nhất toàn phần của các con vật đã được điều trị bằng 16B5 so với các con vật đối chứng đã được điều trị bằng kháng thể 6F10. Xem Hình 5, ô bên phải (thể hiện tín hiệu phát hiện được bằng kháng thể HT7 pan tau chia cho tín hiệu phát hiện được bằng kháng thể GAPDH). Các dữ liệu này chứng tỏ rằng nồng độ của phospho-Tau chứ không phải tau toàn phần được giảm trong các dịch đồng nhất.

Phân tích mô. Phân tích hóa mô miễn dịch nhờ sử dụng các kháng thể kháng phospho-tau được thực hiện trong vùng bất định bổ sung của nhân trong vùng dưới đồi (STH/ZI) và nhân tiểu não cài xen, phần trước và sau, nhân tiểu não bên bổ sung (IntA/P/LAT). Các phần mô tế bào đối xứng dọc (40 μ m) được bảo quản trong PBS bằng dung dịch natri azit 0,1% ở 4°C cho tới khi sử dụng. Tám phần trên mỗi con chuột, ở thóp chỉ định, được nhuộm nổi bằng các mAb AT8, AT100 hoặc 1F5. Phần được chọn để nhuộm bằng các kháng thể chỉ định như được liệt kê trong Bảng 4 dưới đây. Các phần của tất cả các con vật đã chọn để nhuộm cụ thể được phân chia một cách ngẫu nhiên để nhuộm và định lượng được làm mù.

Các phần nổi tự do trên bề mặt được ủ ở Netwells™. Sau đó, các phần này được rửa hai lần bằng PBS và ủ trong thời gian 20 phút trong dung dịch 1,5% hydro peroxid trong PBS và metanol (theo tỷ lệ 1:1) để loại bỏ hoạt tính peroxidaza nội sinh. Sau khi rửa các phần này, ba lần trong PBS chứa 0,1% Triton X100 (PBST), các phần này được phong bế trong 10% huyết thanh bào thai bê (FCS) trong PBST trong thời gian 30 phút, tiếp theo ủ qua đêm với các kháng thể chính AT8, AT100 (Thermo scientific), bằng cách sử dụng lần lượt nồng độ 0,4 μ g/ml và nồng độ 0,05 μ g/ml, trong PBST với 10% FCS. Sau khi rửa, các phần này được ủ với kháng thể của kháng thể phụ (DAKO, 1/500 trong PBST, 10% FCS) của gắn nhãn peroxidaza kháng chuột (GAMPO) và tín hiệu được phát triển bằng 3,3'-diaminobenzidin tetrahydroclorua (DAB, 1 viên nén/10ml Tris-HCl với 3 μ l H₂O₂/10ml). Các phần đã được nhuộm ngược bằng hematoxylin Mayer, được loại bỏ nước

trong năm bước (50, 70, 95 và 2x100%) trong etanol và xylen (Merck Eurolab) và được thiết lập trong Depex (Môi trường thiết lập Depex, Phòng thí nghiệm BDH).

Bảng 4

Tóm tắt về các kháng thể dùng đối với phân tích miễn dịch mô hóa học

mAb	Nhà cung cấp	Tính đặc hiệu	Vật chủ	Nồng độ gốc	Nồng độ làm việc
AT8	Thermo	Người	Chuột	200 μ g/ml	0,4 μ g/ml
AT100	Thermo	Người	Chuột	200 μ g/ml	0,05 μ g/ml

Hình ảnh thu được bằng kính hiển vi Olympus BX41 có lắp máy quay màu Color view II Olympus và phân tích bằng máy tính bằng cách sử dụng phần mềm Phân tích Five – Cell[^]D. Cường độ chiếu sáng và các thiết lập về bộ tụ ánh sáng đối với kính hiển vi được giữ ổn định trong toàn bộ quá trình tạo ảnh. Toàn bộ các hình ảnh thu được được đưa đến cùng một chương trình phụ trên máy tính để giảm đến mức tối thiểu độ lệch trong khi nghiên cứu. Việc tạo ngưỡng về mật độ của các lớp được ứng dụng đồng nhất trong toàn bộ phân tích.

Vùng quan tâm như được xác định dưới đây được chọn để định lượng tự động (các) tín hiệu đã được nhuộm. Nhân của vùng dưới đồi và vùng bất định được mô tả lần lượt bằng cuống não hướng về phía bụng và bằng chất trắng hướng về phía lưng, cũng như dựa trên khác biệt về mật độ tế bào (phần não ở thóp trước đối xứng dọc 1,32 đến 1,92). Nhân tiểu não cài xen, phần trước và sau, và nhân não bên được mô tả bằng chất trắng và các thay đổi về mật độ tế bào và não thất thứ ba (phần não đối xứng dọc, thóp trước 1,92 đến 2,64 đối với LAT và 0,84 đến 1,8 đối với IntA/P). Đối với mỗi lần nhuộm, 6 phần não chứa STH/ZI và 16 phần chứa IntA/P/LAT/mỗi động vật nằm trong phân tích.

Như được thể hiện trên Hình 6, lượng phospho-tau phát hiện được trong nhân tiểu não và vùng dưới đồi của động vật được điều trị bằng kháng thể 16B5 bị giảm đáng kể so với lượng phospho-tau phát hiện được trong cùng các cấu trúc ở động vật đối chứng đã

được điều trị bằng kháng thể 6F10. Mức ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm t Student, $p < 0,05$.

VÍ DỤ 5. Nhân hóa 16B5

Trình tự phân tích cho thấy rằng kháng thể 16B5 là vùng kappa (Vk) biến đổi có trình tự nêu trong SEQ ID NO:16, thuộc phân nhóm 1 theo Kabat của chuột, và tương ứng với phân nhóm theo Kabat của người. Các CDR Kabat được gạch chân. vùng chuỗi nặng biến đổi (Vh) của kháng thể 16B5 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:10, thuộc phân nhóm 2b theo Kabat của chuột, và tương ứng với phân nhóm 1 theo Kabat của người (Kabat *et al.* (1991), *Sequences of proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition; NIH Publication 91-3242). Các CDR Kabat được gạch chân.

Vùng Vk của 16B5 bao gồm trình tự CDR-L1 có 17 gốc (KSSQSLLNSRTRKNYLA, SEQ ID NO: 17), trình tự CDR-L2 có 7 gốc (WASTRES, SEQ ID NO: 18), và 8 gốc CDR-L3 (KQSYTLRT, SEQ ID NO: 19). Trình tự CDR-L1 thuộc nhóm tiêu chuẩn 3, và các trình tự CDR-L2 và CDR-L3 thuộc Nhóm 1 (Martin & Thornton (1996), *J. Mol. Biol.* 263:800-15).

Vùng Vh của 16B5 bao gồm trình tự CDR-H1 có 5 gốc (YHGMD, SEQ ID NO: 11) theo cách đánh số Kabat hoặc trình tự CDR-H1 có 10 gốc (GYPFTYHGMD, SEQ ID NO: 24) theo cách đánh số Kabat và Chothia kết hợp, trình tự CDR-H2 có 17 gốc (WINT-YSGVPTYADDFKG, SEQ ID NO: 12), và trình tự CDR-H3 có 8 gốc (RRDFTMDF, SEQ ID NO: 13). Trình tự CDR-H1 thuộc nhóm tiêu chuẩn 1 và trình tự CDR-H2 thuộc Nhóm 2 (Martin & Thornton (1996), *J. Mol. Biol.* 263:800-15). Trình tự CDR-H3 không có nhóm tiêu chuẩn, nhưng chắc chắn có bazơ xoắn theo quy luật của Shirai *et al.* (1999), *FEBS Lett.* 455:188-97.

Các gốc trên bề mặt chung giữa miền Vk và miền Vh là các gốc thông thường đối với các vị trí này ở chuột nhất.

Nghiên cứu đã được thực hiện trên các trình tự protein trên cơ sở dữ liệu PDB (Deshpande *et al.* (2011), *J. Virol.* 85:1820-33) để tìm ra các cấu trúc tạo ra mô hình cấu trúc thô của kháng thể 16B5. Cấu trúc của kháng thể gây độc trị bệnh tả chứa đoạn Fab

Te33 (mã pdb 1ZEA_H) được sử dụng đối với VL với độ phân giải bằng 1,78Å. Nó vẫn có cùng cấu trúc tiêu chuẩn đối với các vòng như 16B5. Cấu trúc tinh thể của Fab trong phức thể Dsbb-Fab (mã pdb 2ZUQ_B) được sử dụng để xây dựng miền VH của 16B5. Nó được thực hiện ở độ phân giải là 3,3Å và chứa cùng cấu trúc tiêu chuẩn đối với CDR-H1 và CDR-H2, và cũng có cùng chiều dài CDR-H3 có bazơ xoắn. Chương trình BioLuminate được sử dụng để xây dựng cấu trúc thô của 16B5 Fv.

Nghiên cứu về cơ sở dữ liệu trình tự protein không dư thừa từ NCBI có trình tự Fv của 16B5 được CDR“X” cho phép chọn các khung thích hợp của người để ghép các CDR của các loài gặm nhấm. Đối với Vk, chuỗi nhẹ kappa của người có số hiệu lưu giữ NCBI ACJ71718.pro được chọn (SEQ ID NO:20). Trình tự của chuỗi nhẹ kappa của người này có cùng nhóm tiêu chuẩn đối với CDR-L2 và L3. Đối với Vh, BAC02002.1 của chuỗi nặng Ig của người được chọn (SEQ ID NO:14). Nó có chung dạng tiêu chuẩn CDR-H1 và H2, và H3 của 16B5 là 8 gốc có bazơ xoắn đã được dự đoán.

Các thiết kế về chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nhân hóa và các đột biến ngược dựa trên các khung của người này được lần lượt thể hiện trong các bảng 5 và 6.

Chuỗi nặng biến đổi (H1) được nhân hóa của 16B5 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 được thiết kế. Thiết kế này bao gồm ba đột biến ngược: R13K; V48M; và Y98F. K ở vị trí 13 được chọn do nó thường xuất hiện nhiều hơn so với R ở người. M ở vị trí 48 được chọn do nó thường xuất hiện nhiều hơn so với V ở người. F ở vị trí 98 đã được chọn vì nó nằm trên bề mặt chung, khiến cho nó giữ được gốc mong muốn của chuột nhất.

Ba trình tự chuỗi nhẹ biến đổi được nhân hóa của 16B5 được thiết kế:

Phiên bản 1 (L1) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21 và bao gồm ba đột biến ngược: D1N; M4L; và Y36F. N ở vị trí 1 đã được chọn vì nó tạo liên kết hydro tiềm năng với N61 trong HCDR2. L ở vị trí 4 đã được chọn vì nó tiếp xúc với K96, Q97 và S98 trong LCDR3; nó cũng tiếp xúc với gốc bề mặt F104. F ở vị trí 36 đã được chọn vì Y có thể liên kết hydro với D106 trong HCDR3, trong khi đó F lại không thể liên kết. Liên kết hydro có thể giúp xảy ra quá trình tương tác ngoài mà có thể ảnh hưởng tới chức năng của HCDR3, và do đó tốt hơn nếu tránh được quá trình này.

Phiên bản 2 (L2) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22 và bao gồm bốn đột biến ngược: D1N; M4L; Y36F; và P43S. Việc phân tích nguyên nhân đối với D1N, M4L, và Y36F là tương tự như đối với phiên bản 1. S ở vị trí 43 đã được chọn vì S tạo ra liên kết nguyên tử hydro với Q110 trong VH, mà nằm gần với HCDR3.

Phiên bản 3 (L3) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23 và bao gồm ba đột biến ngược: M4L; Y36F; và P43S. Việc phân tích nguyên nhân đối với mỗi đột biến này là tương tự như đối với các phiên bản 1 và 2.

Bảng 5
Trình tự để nhân hóa chuỗi nặng của 16B5

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyến tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:10 của mAb chuột bố mẹ	VH nhận Fr B2 SEQ ID NO:14	Thiết kế VI R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
1	1	Fr1	Q	Q	Q
2	2	Fr1	I	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L
5	5	Fr1	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G
9	9	Fr1	P	S	S
10	10	Fr1	E	E	E
11	11	Fr1	L	L	L
12	12	Fr1	K	K	K
13	13	Fr1	K	R	K
14	14	Fr1	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G
16	16	Fr1	E	A	A
17	17	Fr1	T	S	S
18	18	Fr1	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K
20	20	Fr1	I	V	V
21	21	Fr1	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G
27	27	Fr1	Y	Y	Y
28	28	Fr1	P	S	T
29	29	Fr1	F	F	F
30	30	Fr1	T	T	T
31	31	CDR-H1	Y	S	Y
32	32	CDR-H1	H	Y	H

Bảng 5
Trình tự để nhân hóa chuỗi nặng của 16B5

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyến tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:10 của mAb chuỗi bố mẹ	VH nhận Fr B2 SEQ ID NO:14	Thiết kế VI R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
33	33	CDR-H1	G	A	G
34	34	CDR-H1	M	V	M
35	35	CDR-H1	D	N	D
35A		CDR-H1			
35B		CDR-H1			
36	36	Fr2	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q
40	40	Fr2	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P
42	42	Fr2	W	G	G
43	43	Fr2	G	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W
48	48	Fr2	M	V	M
49	49	Fr2	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I
52	52	CDR-H2	N	N	N
52A	53	CDR-H2	T	T	T
52B	54	CDR-H2	Y	N	Y
52C	55	CDR-H2	S	T	S
52D	56	CDR-H2	G	G	G
52E	57	CDR-H2	V	N	V
52F	58	CDR-H2	P	P	P
53	59	CDR-H2	T	T	T
54	60	CDR-H2	Y	Y	Y
55	61	CDR-H2	A	A	A
56	62	CDR-H2	D	Q	D
57	63	CDR-H2	D	G	D
58	64	CDR-H2	F	F	F

Bảng 5
Trình tự để nhân hóa chuỗi nặng của 16B5

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyến tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:10 của mAb chuột bố mẹ	VH nhận Fr B2 ID NO:14	Thiết kế VI R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
59	65	CDR-H2	K	T	K
60	66	CDR-H2	G	G	G
66	67	Fr3	R	R	R
67	68	Fr3	F	F	F
68	69	Fr3	A	V	V
69	70	Fr3	F	F	F
70	71	Fr3	S	S	S
71	72	Fr3	L	L	L
72	73	Fr3	E	D	D
73	74	Fr3	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S
75	76	Fr3	V	V	V
76	77	Fr3	G	S	S
77	78	Fr3	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A
79	83	Fr3	Y	Y	Y
80	84	Fr3	L	L	L
81	85	Fr3	Q	Q	Q
82	86	Fr3	I	I	I
82A	87	Fr3	N	S	S
82B	88	Fr3	N	S	S
82C	89	Fr3	L	L	L
83	90	Fr3	K	K	K
84	91	Fr3	N	A	A
85	92	Fr3	E	A	E
86	93	Fr3	D	D	D
87	94	Fr3	T	T	T
88	95	Fr3	A	A	A
89	96	Fr3	T	V	V
90	97	Fr3	Y	Y	Y
91	98	Fr3	F	Y	F
92	99	Fr3	C	C	C
93	100	Fr3	A	A	A
94	101	Fr3	R	R	R

Bảng 5
Trình tự để nhân hóa chuỗi nặng của 16B5

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyến tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:10 của mAb chuột bố mẹ	VH nhận Fr B2 SEQ ID NO:14	Thiết kế VI R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO:15
95	102	CDR-H3	R	A	R
96	103	CDR-H3	R	R	R
97	104	CDR-H3	D	G	D
98	105	CDR-H3	F	Q	F
99	106	CDR-H3	T	N	T
100	107	CDR-H3	M	G	M
100A		CDR-H3		M	
100B					
100C					
100D					
100E					
100F					
100G					
100H					
100I					
100J					
100K					
101	108	CDR-H3	D	D	D
102	109	CDR-H3	F	V	F
103	110	Fr4	W	W	W
104	111	Fr4	G	G	G
105	112	Fr4	Q	Q	Q
106	113	Fr4	G	G	G
107	114	Fr4	T	T	T
108	115	Fr4	S	T	T
109	116	Fr4	V	V	V
110	117	Fr4	T	T	T
111	118	Fr4	V	V	V
112	119	Fr4	S	S	S
113	120	Fr4	S	S	S

Bảng 6
Trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 16B5 được nhân hóa

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyên tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:16 của mAb chuột bố mẹ	Đoạn VL nhận của người SEQ ID NO:20	Thiết kế v1 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	Thiết kế v2 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Thiết kế v3 được nhân hóa (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
1	1	Fr1	N	D	N	N	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	L	M	L	L	L
5	5	Fr1	S	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	S	D	D	D	D
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	A	A	A	A
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	S	S	S	S
15	15	Fr1	P	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	K	R	R	R	R
19	19	Fr1	V	A	A	A	A
20	20	Fr1	T	T	T	T	T
21	21	Fr1	M	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	N	N	N	N
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	V	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	N	Y	N	N	N
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S

Bảng 6
Trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ16B5 được nhân hóa

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyên tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:16 của mAb chuột bố mẹ	Đoạn VL nhận của người SEQ ID NO:20	Thiết kế v1 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	Thiết kế v2 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Thiết kế v3 được nhân hóa (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
27F	33	CDR-L1	R	S	R	R	R
28	34	CDR-L1	T	N	T	T	T
29	35	CDR-L1	R	N	R	R	R
30	36	CDR-L1	K	K	K	K	K
31	37	CDR-L1	N	N	N	N	N
32	38	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	39	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	40	CDR-L1	A	A	A	A	A
35	41	Fr2	W	W	W	W	W
36	42	Fr2	F	Y	F	F	F
37	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
38	44	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	45	Fr2	K	K	K	K	K
40	46	Fr2	P	P	P	P	P
41	47	Fr2	G	G	G	G	G
42	48	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	49	Fr2	S	P	P	S	S
44	50	Fr2	P	P	P	P	P
45	51	Fr2	K	K	K	K	K
46	52	Fr2	L	L	L	L	L
47	53	Fr2	L	L	L	L	L
48	54	Fr2	I	I	I	I	I
49	55	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	56	CDR-L2	W	W	W	W	W
51	57	CDR-L2	A	A	A	A	A
52	58	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	59	CDR-L2	T	T	T	T	T
54	60	CDR-L2	R	R	R	R	R
55	61	CDR-L2	E	E	E	E	E
56	62	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	63	Fr3	G	G	G	G	G
58	64	Fr3	V	V	V	V	V
59	65	Fr3	P	P	P	P	P
60	66	Fr3	D	D	D	D	D

Bảng 6
Trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ16B5 được nhân hóa

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyến tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:16 của mAb chuột bố mẹ	Đoạn VL nhận của người SEQ ID NO:20	Thiết kế v1 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	Thiết kế v2 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Thiết kế v3 được nhân hóa (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
61	67	Fr3	R	R	R	R	R
62	68	Fr3	F	F	F	F	F
63	69	Fr3	T	S	S	S	S
64	70	Fr3	G	G	G	G	G
65	71	Fr3	S	S	S	S	S
66	72	Fr3	G	G	G	G	G
67	73	Fr3	S	S	S	S	S
68	74	Fr3	G	G	G	G	G
69	75	Fr3	T	T	T	T	T
70	76	Fr3	D	D	D	D	D
71	77	Fr3	F	F	F	F	F
72	78	Fr3	T	T	T	T	T
73	79	Fr3	L	L	L	L	L
74	80	Fr3	T	T	T	T	T
75	81	Fr3	I	I	I	I	I
76	82	Fr3	S	S	S	S	S
77	83	Fr3	S	S	S	S	S
78	84	Fr3	V	L	L	L	L
79	85	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q
80	86	Fr3	A	A	A	A	A
81	87	Fr3	E	E	E	E	E
82	88	Fr3	D	D	D	D	D
83	89	Fr3	L	V	V	V	V
84	90	Fr3	A	A	A	A	A
85	91	Fr3	V	V	V	V	V
86	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	93	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	94	Fr3	C	C	C	C	C
89	95	CDR-L3	K	Q	K	K	K
90	96	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	97	CDR-L3	S	Y	S	S	S
92	98	CDR-L3	Y	Y	Y	Y	Y
93	99	CDR-L3	T	S	T	T	T
94	100	CDR-L3	L	T	L	L	L

Bảng 6
Trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ 16B5 được nhân hóa

Số gốc theo Kabat	Số gốc tuyến tính	FR hoặc CDR	SEQ ID NO:16 của mAb chuột bố mẹ	Đoạn VL nhận của người SEQ ID NO:20	Thiết kế v1 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO:21	Thiết kế v2 được nhân hóa (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Thiết kế v3 được nhân hóa (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
95		CDR-L3		P			
95A		CDR-L3					
95B		CDR-L3					
95C		CDR-L3					
95D		CDR-L3					
95E		CDR-L3					
95F		CDR-L3					
96	101	CDR-L3	R	Q	R	R	R
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	N	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K
107	113	Fr4	R	R	R	R	R

VÍ DỤ 6. Ái lực tau của các kháng thể 16B5 được nhân hóa

Dữ liệu gắn kết đối với các kháng thể 16B5 được nhân hóa có thiết kế H1L1 hoặc H1L2 được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây. Để so sánh, dữ liệu gắn kết đối với 16B5 thể khảm cũng được thể hiện. Dữ liệu này được tạo ra bằng cách sử dụng thiết bị Biacore. Chứng tỏ rằng phiên bản H1L2 có ái lực mạnh nhất – về cơ bản là tương tự như ái lực của 16B5 thể khảm. Các phiên bản H1L1 và H1L3 được làm giống như phiên bản của người của 16B5 cũng có ái lực thích hợp.

Các phép đo cộng hưởng plasmon bề mặt được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 (GE Lifesciences). Tất cả các thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng pha đệm chứa 10mM HEPES, độ pH = 7,4, 150mM NaCl, và 0,05% Tween-20 ở 30 μ l/phút, qua chip cảm biến CM5 đã được chuẩn bị bằng cách liên hợp amin kháng thể bắt giữ kháng chuột hoặc kháng người. 16B5 (dạng thể khảm hoặc được nhân hóa) được gắn kết với kháng thể bắt giữ cố định, và nồng độ biến đổi của hTau-P301L tái tổ hợp đã được tinh sạch được dùng cho kháng thể phức trong nhiều lần lặp lại liên tiếp. Các bước lặp lại được tách riêng so với các bước tái tạo có nồng độ muối cao hoặc độ pH thấp. Các thử nghiệm này được lặp lại bằng các chế phẩm khác nhau chứa kháng thể và kháng nguyên. Phân tích đã được thực hiện bằng phần mềm Biacore trên máy.

Bảng 7

Dữ liệu Biacore

	K_D (M)	$K_{bắt}(1/Ms)$	Sai số $K_{bắt}$	$K_{tắt}(1/giây)$	Sai số $K_{tắt}$
Chi16B5	232 pM	$1,43 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$3,33 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-5}$
Hu16B5H1L1	617 pM	$3,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$2,15 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-6}$
Hu16B5H1L2	286 pM	$1,2 \times 10^7$	$4,6 \times 10^4$	$3,42 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-5}$
Hu16B5H1L3	320pM	$1,25 \times 10^7$	$6,2 \times 10^4$	$3,98 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-5}$

VÍ DỤ 7. Phát hiện sự kết tủa miễn dịch của tau bằng các kháng thể 16B5 được nhân hóa

Mẫu vỏ não trái thu được từ bệnh nhân bị bệnh Alzheimer sau khi chết với điểm số Braak là 6 lần lượt được lấy ra từ các dung dịch đệm có độ hòa tan tăng dần, theo thứ tự sau: (i) Dung dịch muối đệm có nồng độ cao (20mM Tris, 5mM EDTA, 1mM DTT, 10% sucroza, 7500mM NaCl có độ pH=7,4), (ii) dung dịch đệm Triton (20mM Tris, 5mM EDTA, 1mM DTT, 10% sucroza, 1% Triton X100, 500mM NaCl có độ pH=7,4), và (iii) dung dịch đệm Sarkosyl (10mM Tris, 5mM EDTA, 1mM DTT, 10% sucroza, 500mM NaCl, 1% Sarkosyl, độ pH=7,4).

Đối với mỗi mẫu, 200 microgam dung dịch muối hòa tan có nồng độ cao, hoặc 20 microgam sarkosyl không hòa tan, các phân đoạn được pha loãng thành 400 microlit dung dịch đệm kết tủa miễn dịch (10mM Tris, 150mM NaCl, 0,5% Triton X100, 1mM EGTA, 1mM EDTA, độ pH=7,4). Các mẫu này được tinh sạch sơ bộ bằng hạt từ tính protein G (do New England Biolabs cung cấp), và 5 microgam kháng thể được bổ sung vào mỗi ống. Các kháng thể được sử dụng bao gồm: 1) kháng thể IgG không tạo miễn dịch của chuột (mIgG), làm kháng thể đối chứng; 2) kháng thể IgG không tạo miễn dịch của người (hIgG), làm kháng thể đối chứng; 3) kháng thể 16B5 thể khảm (Chi16B5); 4) 16B5 được nhân hóa, phiên bản H1L2 (h16B6-H1L2); và 16B5 được nhân hóa, phiên bản H1L3 (h16B6-H1L3). Các dịch phân giải đã được tinh sạch sơ bộ và các kháng thể này được ủ trong thời gian 2 giờ ở 4°C. Các phức thể kháng thể/kháng nguyên được làm kết tủa bằng cách sử dụng các hạt protein G có từ tính, và chất kết tủa được rửa kỹ bằng dung dịch chứa PBS/350mM NaCl. Sau khi rửa giải bằng cách sử dụng dung dịch đệm Laemmli, dịch rửa giải được phân giải bằng SDS-PAGE và tạo vết bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng tau (DAKO).

Như được thể hiện trên Hình 7, H1L2 và H1L3 của 16B5 thể khảm và 16B5 được nhân hóa đã nhận diện tau trong cả các phân đoạn hòa tan và không hòa tan từ não của người bị bệnh Alzheimer.

VÍ DỤ 8. Xác định đặc tính hóa mô miễn dịch của các kháng thể tau của 16B5 được nhân hóa và loài gặm nhấm trên não của người bị bệnh Alzheimer

Kháng thể đơn dòng kháng tau 16B5 của loài gặm nhấm và hai biến thể của nó nhân hóa - h16B5-H1L2 và h16B5-N1D, còn được thử nghiệm hóa mô miễn dịch trên các phần vỏ não của người mới được làm đông lạnh từ người cho mắc bệnh Alzheimer và người đối chứng cao tuổi, không mắc bệnh.

Phương pháp:

Mô não của người

Vỏ não trước nhận được từ Viện nghiên cứu sức khỏe Mặt trời (Sun Health Research Institute). Các trường hợp bao gồm sáu người bệnh (độ tuổi trung bình $86,8 \pm$

0,40 SEM) được chẩn đoán là mắc bệnh Alzheimer và được xác nhận bằng việc đánh giá thần kinh bệnh học sau khi qua đời, và ba người đối chứng cao tuổi không mắc bệnh (độ tuổi trung bình $77 \pm 9,7$ SEM). Nhân khẩu học của các trường hợp này được liệt kê trong Bảng 8 sau. Quá trình hóa mô miễn dịch được thực hiện trên các phần cắt nhỏ đông lạnh 10um, đã cố định nhẹ bằng axeton.

Bảng 8

Nhân khẩu học đối với các trường hợp được kiểm tra bằng hóa mô miễn dịch

Trường hợp	Chẩn đoán	Tuổi (năm)	Giới tính	Khoảng thời gian sau khi qua đời (giờ)
11 đến 21	AD	88	Nữ	2,28
03 đến 34	AD	88	Nữ	3,3
08 đến 06	AD	86	Nam	2,66
03 đến 52	AD	86	Nam	2,2
01 đến 16	AD	87	Nam	3
01 đến 18	AD	86	Nam	3
10 đến 63	Đối chứng	79	Nam	3
10 đến 39	Đối chứng	93	Nam	3
10 đến 22	Đối chứng	59	Nữ	3,2

Hóa mô miễn dịch

Phương pháp peroxidaza miễn dịch là phương pháp phát hiện thành phần chính, bao gồm polyme đã được gắn nhãn peroxidaza đã tiếp hợp với các globulin miễn dịch của dê kháng chuột (Polyme gắn nhãn EnVision+ hệ thống HRP; Dako K4001) hoặc thiết bị

khuếch đại vật truyền ABC đối với các kháng thể nhân hóa đã được biotinyl hóa một cách trực tiếp (ABC Elite Standard; PK-6100; Vector Laboratories). Quá trình nhuộm được quan sát bằng mắt bằng chất tạo sắc DAB (DAB lỏng + Hệ thống chất tạo sắc cơ chất; Dako K3468), mà tạo ra chất lắng đọng màu nâu.

Đối chứng âm tính bao gồm việc thực hiện quy trình hóa mô miễn dịch nguyên vẹn trên phân liên kê với kháng thể đối chứng isotyp IgG hoặc không có kháng thể sơ cấp.

Gắn nhãn miễn dịch huỳnh quang

Quá trình nhuộm miễn dịch huỳnh quang kép được tiến hành để xác định mối quan hệ giữa các thể biến thể của kháng thể được nhân hóa và loài gặm nhấm, các kháng thể tau khác nhận diện các epitop đã được phosphoryl hóa khác nhau, và beta dạng tinh bột. Các phần mô được nhuộm song song với cốc tai chứa kháng thể chứa các biến thể 16B5 được nhân hóa được biotinyl hóa hoặc được đánh dấu FITC (1ug/ml) và kháng thể của loài gặm nhấm (16B5 đơn dòng (1ug/ml), AT8 (theo tỷ lệ 1:1000), AT100 (theo tỷ lệ 1:1000), hoặc 3D6 (1ug/ml). Các kháng thể của loài gặm nhấm được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng chuột của dê tiếp hợp với huỳnh quang 488 hoặc 635 (do Invitrogen cung cấp). Các kháng thể nhân hóa đã được biotinyl hóa được phát hiện bằng streptavidin 635.

Hấp thụ sơ bộ

Để đánh giá tính đặc hiệu của các kháng thể với các kháng nguyên của nó, 1ug/ml kháng thể 16B5 được hấp thụ sơ bộ bằng 50ug/ml tau P301L hoặc synuclein kiểu đại (protein không liên quan) đã được tinh chế của người qua đêm ở 4°C. Sau đó, các kháng thể này được dùng cho mô và quy trình hóa mô miễn dịch được thực hiện như nêu trên.

Phân tích hình ảnh

Các lát cắt được chụp ảnh bằng kính hiển vi Olympus BX61, Olympus Nanozoomer 2.0HT, hoặc hệ phổ cộng tiêu Leica SPE. Hình ảnh thu được là tài liệu dạng TIFF.

Kết quả

Như được thể hiện trong Bảng 9 sau, kháng thể đơn dòng 16B5 của chuột và cả hai biến thể nhân hóa có hoạt tính đối với mô nhiễm bệnh Alzheimer, mạng lưới sợi thần kinh nhuộm nổi bật, một số đám rối sợi thần kinh (chủ yếu là hình cầu), và một số mảng viêm dây thần kinh dương tính với tau. Hầu hết các bệnh AD dạng sợi liên quan đến 16B5 bị giới hạn ở chất xám, nhưng một vài hoạt tính cũng phát hiện được trong chất trắng. Trái lại, mô đối chứng không mắc bệnh lại có hoạt tính nền khuếch tán nhưng là âm tính đối với bệnh lý bất kỳ tìm thấy ở mô AD.

Các thử nghiệm về sự gắn nhãn kép được thực hiện bằng phiên bản đơn dòng của 16B5 của loài gặm nhấm và bằng cả (1) biến thể được nhân hóa, lẫn (2) kháng thể nhận diện tau ở các epitop được phosphoryl hóa khác nhau, và (3) beta dạng tinh bột để xác định tiếp đặc tính của bệnh lý nhận diện được bởi các biến thể của kháng thể.

Cả h16B5-H1L2 lẫn h16B5-N1D định vị đồng thời bởi kháng thể đơn dòng 16B5 có mức độ tương đồng cao về mặt cấu trúc gây bệnh dạng sợi AD. H16B5-H1L2 cũng phát hiện được bệnh lý có hoạt tính miễn dịch với các epitop tau đã được phosphoryl hóa khác nhau bao gồm serin 202 và threonin 205 (AT8), serin 212 và threonin 214 (AT100), và serin 396 (kháng thể sở hữu nội bộ, 20H1). Cuối cùng, việc gắn nhãn kép bằng kháng thể beta dạng tinh bột kháng thể nhận diện trình tự axit amin có đầu tận cùng N (3D6; aa 1 đến 5) và 16B5 thể hiện sự đồng xuất hiện rất nhỏ giữa các cấu trúc có hoạt tính miễn dịch A β và 16B5 trên các mảng tinh bột.

Nếu hoạt tính miễn dịch của 16B5 được so sánh với kháng thể đơn dòng kháng tau có đặc tính đã biết có bán trên thị trường (Dako), thì cả hai loại này đã bị bệnh AD dạng sợi đều có các mảng viêm dây thần kinh dương tính với tau, sợi của mạng lưới thần kinh, và các đám rối sợi thần kinh.

Tính đặc hiệu của kháng thể được đánh giá bằng cách hấp thụ sơ bộ với tau P301L tái tổ hợp đã được tinh sạch. Mức giảm trong quá trình nhuộm được quan sát thấy khi 16B5 được hấp thụ sơ bộ bằng tau P301L, nhưng quá trình nhuộm không bị ảnh hưởng nếu các kháng thể được hấp thụ sơ bộ bằng protein không có liên quan (synuclein kiểu đại) với cùng một nồng độ mol.

Cả kháng thể đối chứng isotyp IgG lẫn các phần không chứa kháng thể sơ cấp đều âm tính đối với quá trình nhuộm trên tất cả các mô đã được thử nghiệm.

Bảng 9

Các kháng thể 16B5 được xác định đặc tính hóa mô miễn dịch

Kháng thể	Số lô	Nhuộm mô AD	Nồng độ
Loài gặm nhấm 16B5	NB-0174A	Có	1ug/ml
16B5 thể khảm	061512	Có	1ug/ml
h16B5-H1L2	NB-0248	Có	1ug/ml
H16B5-N1D	011113	Có	1ug/ml

Toàn bộ các công bố (bao gồm cả số hiệu lưu giữ tại ngân hàng Gen - GenBank, số hiệu lưu giữ UniProtKB/Swiss-Prot và các số hiệu tương tự), patent và đơn yêu cầu cấp patent đã nêu được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn đối với mọi mục đích ở mức độ nếu mỗi công bố đơn, patent và đơn yêu cầu cấp patent được chỉ ra một cách cụ thể và riêng biệt cũng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đối với mọi mục đích. Trong trường hợp có sự thay đổi bất kỳ về các trình tự liên quan đến các số hiệu lưu giữ tại ngân hàng Gen và số UniProtKB/Swiss-Prot và số hiệu tương tự, đơn này đưa ra các trình tự liên quan đến các số hiệu lưu giữ đã nêu như ngày nộp đơn thích hợp của đơn, tức là ngày nộp đơn thực và ngày sớm hơn của đơn ưu tiên bộc lộ số hiệu lưu giữ có liên quan. Dấu hiệu, bước, yếu tố, phương án, hoặc khía cạnh bất kỳ của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với dấu hiệu, bước, yếu tố, phương án, hoặc khía cạnh bất kỳ khác nếu không có quy định cụ thể nào khác. Mặc dù sáng chế đã được bộc lộ một cách chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích làm rõ và hiểu rõ hơn, tuy nhiên rõ ràng rằng các thay đổi và cải biến nhất định có thể được thực hiện trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng nhân hóa, thể khả hoặc được bọc và gắn kết với tau, trong đó kháng thể này chứa CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:17, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:18, CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:19 và CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:11 hoặc SEQ ID NO:24, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:12 và CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin giống ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh giống ít nhất 90% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:22.

3. Kháng thể theo điểm 2, với điều kiện là ít nhất một trong các vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F và ít nhất một trong các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S hoặc với điều kiện là các vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F và hai trong số các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S, hoặc với điều kiện là các vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F, và ít nhất ba trong số các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S, hoặc, với điều kiện là các vị trí H13, H48 và H91 lần lượt được chiếm giữ bởi K, M và F, và các vị trí L1, L4, L36 và L43 lần lượt được chiếm giữ bởi N, L, F và S trong đó các vị trí này được xác định theo Kabat.

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 đến 3, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin giống ít nhất 95% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh giống ít nhất 95% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:22.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 đến 4, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ, một cách tùy ý, trong

đó vùng hằng định chuỗi nặng là dạng đột biến của vùng hằng định tự nhiên của người mà có sự gắn kết giảm với thụ thể $Fc\gamma$ so với vùng hằng định tự nhiên của người hoặc trong đó vùng hằng định chuỗi nặng là thuộc isotyp IgG1.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 đến 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin giống ít nhất 98% với trình tự nêu trong SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin giống ít nhất 98% với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22.

7. Kháng thể theo điểm 1 trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh được mã hóa bởi trình tự nêu trong SEQ ID NO:25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được mã hóa bởi trình tự nêu trong SEQ ID NO:27.

8. Polynucleotit bao gồm axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được mô tả trong các điểm 2 đến 7.

9. Phương pháp nhân hóa kháng thể bao gồm các bước:

xác định trình tự của các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhất;

tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được nhân hóa chứa các CDR của chuỗi nặng của kháng thể của chuột nhất và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được nhân hóa chứa các CDR của chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột nhất; và

biểu hiện các axit nucleic trong tế bào chủ để tạo ra kháng thể nhân hóa,

trong đó các CDR là như được xác định theo điểm 1, và

trong đó kháng thể của chuột nhất được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự nêu trong SEQ ID NO:10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:16.

10. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1 và chất mang dược dụng.
11. Axit nucleic hoặc các axit nucleic chứa đoạn mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25 và đoạn mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27.
12. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, trong đó chuỗi nặng của kháng thể này chứa vùng hằng định IgG1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 với điều kiện là có thể thiếu lysin ở đầu tận cùng C, và chuỗi nhẹ của kháng thể này chứa vùng hằng định kappa của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Seubert, Peter
 Dolan, Philip James III
 Liu, Yue
 Barbour, Robin
 <120> LIỆU PHÁP MIỄN DỊCH LIÊN QUAN ĐẾN TAU

 <130> 057450/442367
 <140> PCT/US2014/025044
 <141> 2014-03-12
 <150> US 61/780,624
 <151> 2013-03-13
 <150> US 61/800,382
 <151> 2013-03-15
 <160> 34
 <170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0
 <210> 1
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp
 50 55 60
 Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val Asp
 65 70 75 80
 Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu Ile
 85 90 95
 Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Pro Ser Leu
 100 105 110
 Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys
 115 120 125
 Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp
 130 135 140
 Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln
 145 150 155 160
 Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro
 165 170 175
 Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
 180 185 190
 Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
 195 200 205
 Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
 210 215 220
 Val Val Arg Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln
 225 230 235 240
 Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile
 245 250 255

Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
 260 265 270
 Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Gly Ser
 275 280 285
 Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
 290 295 300
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 305 310 315 320
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 325 330 335
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
 340 345 350
 Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
 355 360 365
 Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala
 370 375 380
 Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg
 385 390 395 400
 His Leu Ser Asn Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro
 405 410 415
 Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln
 420 425 430
 Gly Leu

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

```

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

```

<210> 4

<211> 404

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

```

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

<210> 5

<211> 375

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro
 115 120 125
 Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr
 130 135 140
 Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser
 145 150 155 160
 Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 165 170 175
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 180 185 190
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 195 200 205
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 210 215 220
 Lys Ser Lys Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 245 250 255
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 260 265 270
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Ser Lys
 275 280 285
 Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
 290 295 300
 Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys
 305 310 315 320
 Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly
 325 330 335
 Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp
 340 345 350
 Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala
 355 360 365
 Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375
 <210> 6
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60
 Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95
 Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
 115 120 125
 Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
 130 135 140
 Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175
 Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190
 Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
 195 200 205
 Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
 210 215 220
 Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
 225 230 235 240
 His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
 245 250 255
 Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 260 265 270
 His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 275 280 285
 Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
 290 295 300
 Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
 305 310 315 320
 Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
 325 330 335
 Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 340 345 350

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 7

ctaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 8

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

ctcaattttc ttgtccacct tgggtgc

26

<210> 9

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

ctcaagtttt ttgtccaccg tgggtgc

<210> 10

<211> 225

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

```
Met Asp Trp Val Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1           5           10           15
Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
          20           25           30
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe
          35           40           45
Thr Tyr His Gly Met Asp Trp Val Lys Gln Ala Pro Trp Gly Gly Leu
          50           55           60
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala
65           70           75           80
Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Gly
          85           90           95
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
          100          105          110
Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Arg Asp Phe Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln
          115          120          125
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
          130          135          140
Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
145          150          155          160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
          165          170          175
Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
          180          185          190
Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
          195          200          205
Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
          210          215          220
Ser
225
```

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 11

```
Tyr His Gly Met Asp
 1           5
```

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 12

Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys
1				5				10						15	

Gly

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 13

Arg	Arg	Asp	Phe	Thr	Met	Asp	Phe
1				5			

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 14

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

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 15

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5				10						15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Tyr	His
			20					25					30		

Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Arg Asp Phe Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 16

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asn Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Thr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp
 165 170 175
 Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys
 195 200 205
 Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys
 210 215 220
 Thr Ser Thr Ser Pro Ile
 225 230

<210> 17
 <211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 17

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Arg	Thr	Arg	Lys	Asn	Tyr	Leu
1				5					10					15	

Ala

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 18

Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser
1				5		

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 19

Lys	Gln	Ser	Tyr	Thr	Leu	Arg	Thr
1				5			

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 20

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

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

Ser	Asn	Asn	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50				55					60					

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

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

Tyr	Tyr	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
			100					105					110		

Lys Arg

<210> 21
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 21

```

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

```

<210> 22
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 22

```

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

```

<210> 23
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 23

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

Arg

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr	Tyr	His	Gly	Met	Asp
1				5				10	

<210> 25

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 25

cagggtccagt	tgggtgcagtc	tggatctgag	ctgaagaagc	ctggagcctc	cgctcaaggtg	60
tcctgcaagg	cttctgggta	tcccttcaca	taccatggaa	tggactgggt	gcgtcaggct	120
cctgggtcagg	gttttagagt	gatgggctgg	ataaacacct	actctggagt	gccaacatat	180
gctgatgact	tcaagggacg	atttgtgttc	tctttggaca	cctctgtctc	tactgcctat	240
ttgcagatct	cttctctcaa	agccgaggac	acggccgtgt	atttttgtgc	aagacggcgt	300
gattttacaa	tggacttctg	gggtcaagga	accaccgtga	ccgtctctc	a	351

<210> 26

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 26

aacatcgtgc	tgaccagag	ccccgatagc	ctggccgtga	gcctgggcga	gagagccacc	60
atcaactgca	agagcagcca	gagcctgctg	aacagcagga	ccaggaagaa	ctacctggcc	120
tggttccagc	agaagcccgg	ccagccccc	aagctgctga	tctactgggc	cagcaccagg	180

gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300
 agaaccttcg gcggcggcac caaggtggaa attaaacgt 339

<210> 27

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 27

aacatcgtgc tgaccagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcca gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcagga ccaggaagaa ctacctggcc 120
 tggttccagc agaagcccg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccagg 180
 gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300
 agaaccttcg gcggcggcac caaggtggaa attaaacgt 339

<210> 28

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 28

gacatcgtgc tgaccagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcca gagagccacc 60
 atcaactgca agagcagcca gagcctgctg aacagcagga ccaggaagaa ctacctggcc 120
 tggttccagc agaagcccg ccagagcccc aagctgctga tctactgggc cagcaccagg 180
 gagagcggcg tgcccgatag gttcagcggc agcggcagcg gcaccgattt caccctgacc 240
 atcagcagcc tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcaagcagag ctacaccctg 300
 agaaccttcg gcggcggcac caaggtggaa attaaacgt 339

<210> 29

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 29

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

130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu		160
	165	170
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		175
	180	185
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		190
	195	200
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		205
	210	215
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		220
225	230	235
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		240
	245	250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		255
	260	265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		270
	275	280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		285
	290	295
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		300
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		320
	325	330

<210> 30

<211> 990

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 30

```

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagttt tcctcttccc ccaaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
gaggtcacat gcgtgggtggg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggagggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaa gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa

```

<210> 31

<211> 1343

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 31

```

ggtgagtgga tccgcgccg ctaaactctg agggggctcg atgacgtggc cattctttgc 60
ctaaagcatt gagtttactg caaggtcaga aaagcatgca aagccctcag aatggctgca 120
aagagctcca acaaaacaat ttagaacttt attaaggaat agggggaagc taggaagaaa 180
ctcaaaacat caagatttta aatacgcttc ttgggtctcct tgctataatt atctgggata 240
agcatgctgt tttctgtctg tccctaacat gccctgtgat tatccgcaa caacacaccc 300
aagggcagaa ctttgttact taaacaccat cctgtttgct tctttcctca gcctccacca 360
agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg 420
ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg tggaaactcag 480
gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact 540
ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc tacatctgca 600
acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc aaatcttgtg 660
acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct 720
tcctcttccc ccaaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat 780
gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg 840
gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc 900
gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt 960
gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag 1020
ggcagccccg agaaccacag gtgtacacgc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga 1080
accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt 1140
gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg 1200
acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga 1260
acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc 1320
tctccctgtc cccgggtaaa tga 1343

```

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 32

```

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

```

<210> 33

<211> 318

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 33

```

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
caciaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt caciaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgt                                     318

```

<210> 34

<211> 671

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

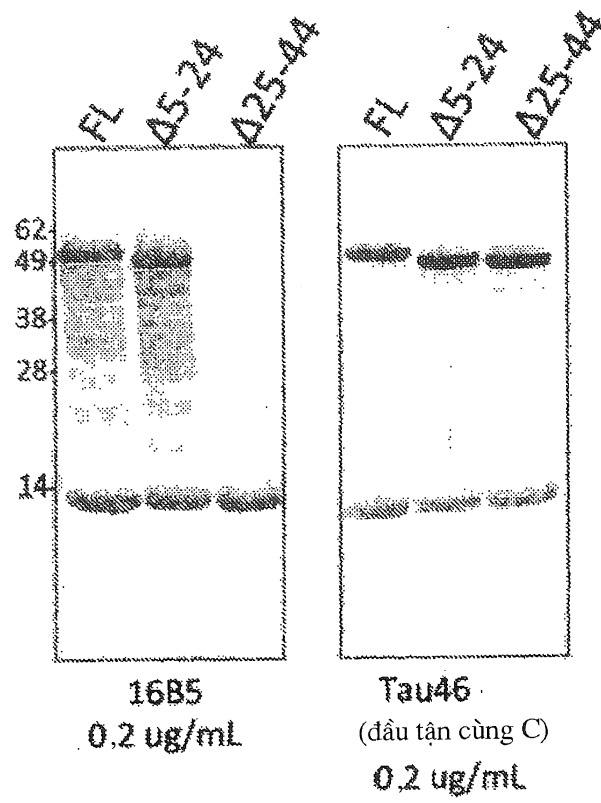
<400> 34

```

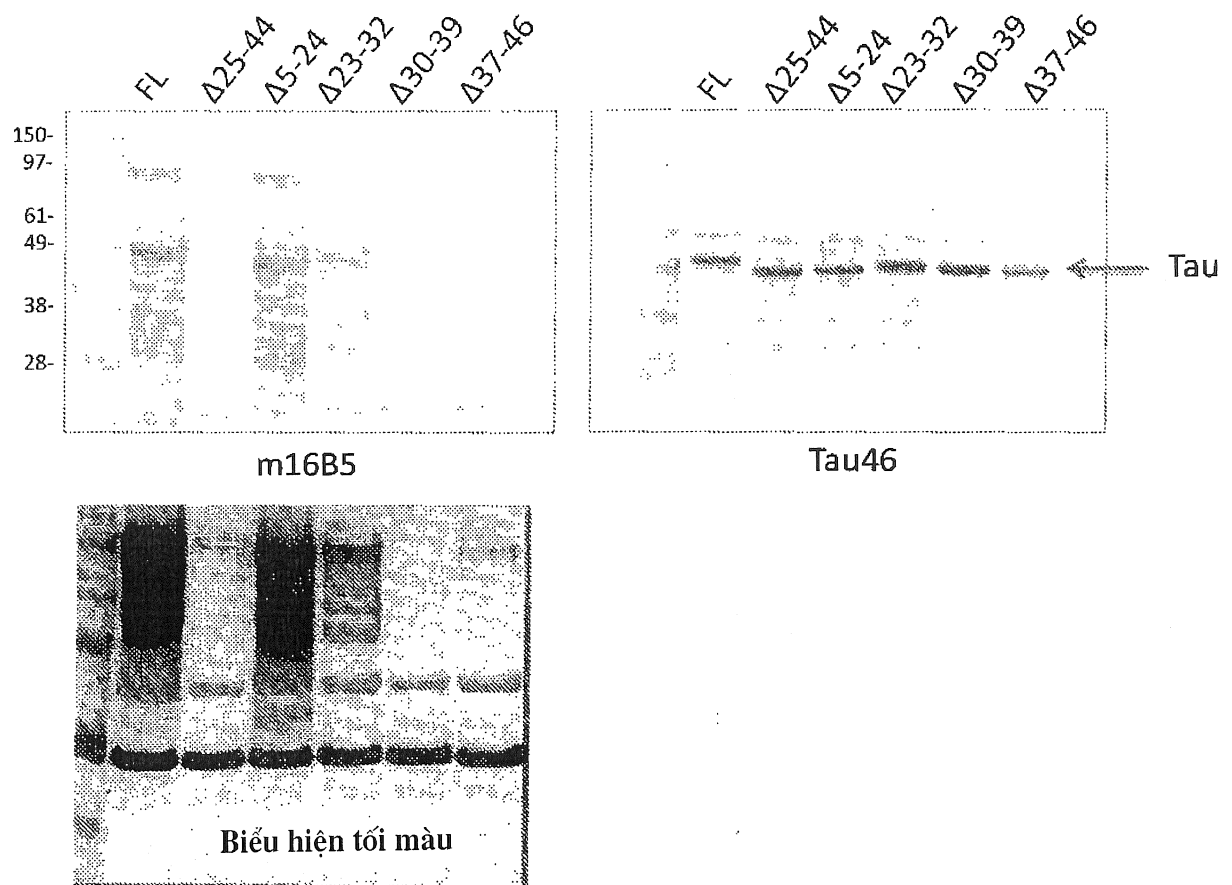
cgtgagtgga tccgcggccg ctaaactctg aggggggtcgg atgacgtggc cattctttgc 60
ctaaagcatt gagtttactg caaggtcaga aaagcatgca aagccctcag aatggctgca 120
aagagctcca acaaaacaat ttagaacttt attaaggaat agggggaagc taggaagaaa 180
ctaaaaacat caagatttta aatacgcttc ttggctctcct tgctataatt atctgggata 240
agcatgctgt tttctgtctg tccctaacat gccctgtgat tatccgcaa caacacaccc 300
aagggcagaa ctttgttact taaacacccat cctgtttgct tctttcctca ggaactgttg 360
ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccggccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct 420
ctgttggtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggttg 480
ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca 540
gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaaag 600
tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag agcttcaaca 660
ggggagagtg t                                     671

```

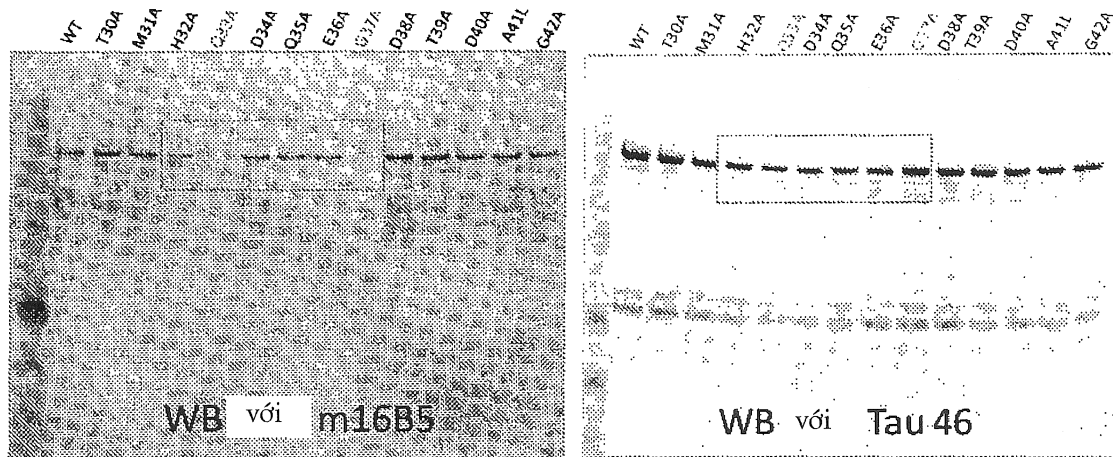
Hình 1



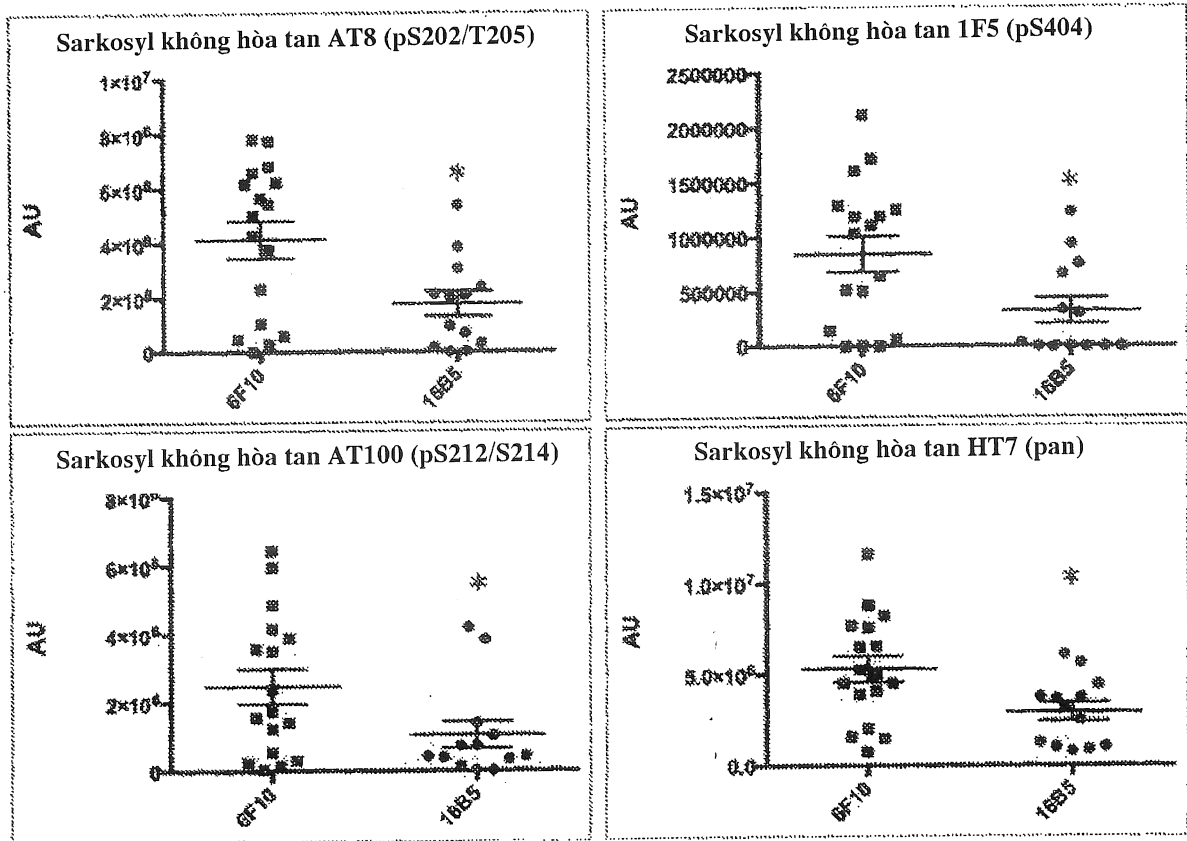
Hình 2



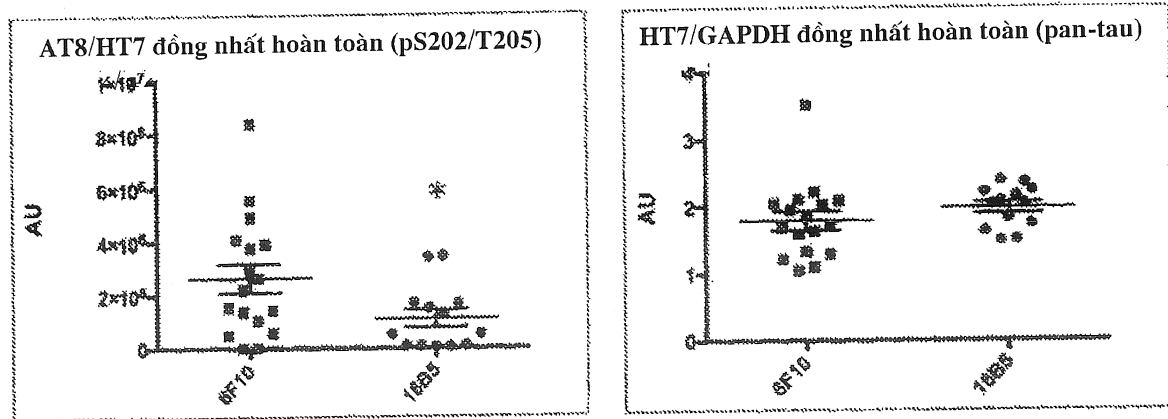
Hình 3



Hình 4

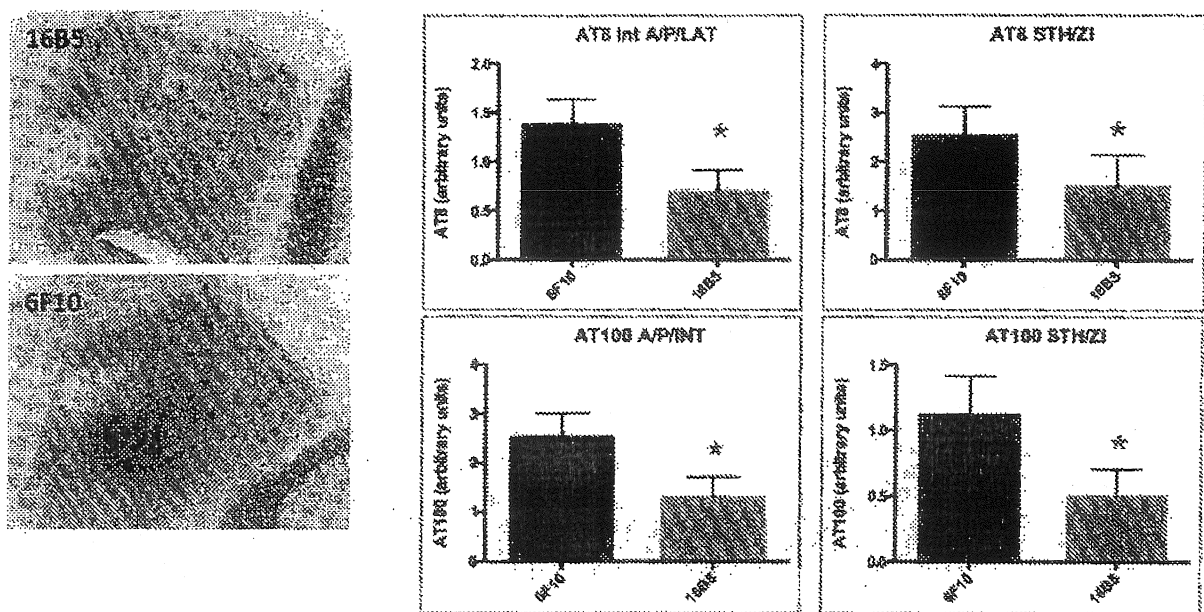


Hình 5



6/7

Hình 6



Hình 7

