



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0038222

(51)^{2019.01} C07K 16/18; A61K 39/00; A61P 25/28 (13) B

(21) 1-2019-05938

(22) 16/04/2018

(86) PCT/US2018/027718 16/04/2018

(87) WO2018/194951 25/10/2018

(30) 62/487,550 20/04/2017 US

(45) 25/01/2024 430

(43) 30/01/2020 382A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) DEMATTOS, Ronald Bradley (US); LU, Jirong (US); TANG, Ying (CN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI AMYLOIT BETA N3PGLU NGƯỜI VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, dược phẩm bao gồm kháng thể N3pGlu A β này. Kháng thể N3pGlu A β này là hữu ích để điều trị bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β bao gồm bệnh Alzheimer lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, và bệnh mạch máu não tích tụ amyloid lâm sàng hoặc tiền lâm sàng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể gắn kết với peptit Amyloid Beta N3pGlu người. Các kháng thể này là hữu ích trong điều trị các bệnh liên quan đến peptit Amyloid Beta (trong bản mô tả này được gọi là A β hoặc Abeta).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc tách protein tiền thân Amyloid thu được các peptit A β có kích cỡ nằm trong khoảng từ 38 đến 43 axit amin. Việc chuyển hoá A β từ dạng hòa tan thành dạng không hòa tan có hàm lượng dải β cao và khả năng lắng đọng dạng không hòa tan này ở dạng mảng viêm thần kinh và mạch não trong não có liên quan tới nhiều tình trạng bệnh và bệnh lý, bao gồm bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease - AD), hội chứng Down, và bệnh mạch máu não tích tụ amyloid (cerebral amyloid angiopathy - CAA).

Các chất kết lắng tìm thấy trong các mảng bao gồm hỗn hợp không đồng nhất chứa các peptit A β . N3pGlu A β , còn được gọi là N3pE, pE3-X, hoặc A β _{p3-x}, là dạng bị cắt có đầu tận N của peptit A β và chủ yếu được tìm thấy trong mảng. N3pGlu A β thiếu hai gốc axit amin thứ nhất ở đầu tận N của A β người và có pyroglutamat có nguồn gốc từ axit glutamic ở vị trí axit amin thứ ba. Mặc dù peptit N3pGlu A β là thành phần thứ yếu của A β lắng đọng trong não, nhưng các nghiên cứu đã chứng minh được rằng peptit N3pGlu A β có đặc tính kết tụ mạnh và sớm tích tụ ở tầng lắng đọng.

Các kháng thể đối với N3pGlu A β là đã được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, Patent Mỹ số 8,679,498 bộc lộ các kháng thể N3pGlu A β người (ví dụ B12L; còn gọi là LY3002813) và các phương pháp điều trị bệnh, như bệnh

Alzheimer, bằng các kháng thể này. Thử nghiệm lâm sàng đã chứng minh mối quan tâm với các kháng thể kháng thuốc đối với kháng thể kháng N3pGlu A β (LY3002813). Các kháng thể kháng thuốc có mặt trong huyết tương ở hầu hết những người đã được điều trị trong thử nghiệm này, và vấn đề liên quan tới phản ứng miễn dịch là thời gian bán thải rút ngắn của LY3002813. Do đó, vẫn có nhu cầu về kháng thể kháng N3pGlu A β khác.

Các kháng thể theo sáng chế cố gắng tạo ra các kháng thể kháng N3pGlu A β gắn kết với N3pGlu A β , làm giảm lượng mảng (A β ₁₋₄₂) *in vivo*, mà còn chứng minh được tính sinh miễn dịch giảm. Các kháng thể kháng N3pGlu A β như vậy cũng có thể chứng minh được khả năng gắn kết không đặc hiệu giảm với các protein huyết tương. Ngoài ra, các kháng thể kháng N3pGlu A β này cũng có thể tạo ra đáp ứng Ab phụ thuộc T được dự đoán giảm. Các kháng thể kháng N3pGlu A β này cũng có thể tạo ra thời gian bán thải kháng thể gia tăng và profin an toàn cải thiện để điều trị tiềm năng cho người với được động học đối với liệu trình dùng liều tốt hơn. Các kháng thể thuộc phạm vi của sáng chế cố gắng có ít nhất một trong số các đặc tính mong muốn này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, bao gồm LCVR và HCVR, trong đó LCVR này bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, và trong đó HCVR này bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và trong đó các trình tự axit amin là SEQ ID NO:4 hoặc 5 đối với LCDR1, SEQ ID NO:6 hoặc 7 đối với LCDR2, SEQ ID NO:8 đối với LCDR3, SEQ ID NO:1 đối với HCDR1, SEQ ID NO:2 đối với HCDR2, và SEQ ID NO:3 đối với HCDR3. Theo phương án cụ thể, kháng thể kháng N3pGlu A β bao gồm các trình tự amin SEQ ID NO:4 đối với LCDR1, SEQ ID NO:6 đối với LCDR2, SEQ ID NO:8 đối với LCDR3, SEQ ID NO: 1 đối với HCDR1, SEQ ID NO: 2 đối với HCDR2, và SEQ ID NO:3 đối với HCDR3. Theo phương án cụ thể khác, kháng thể kháng N3pGlu A β bao gồm các

trình tự amin SEQ ID NO:5 đối với LCDR1, SEQ ID NO:7 đối với LCDR2, SEQ ID NO:8 đối với LCDR3, SEQ ID NO: 1 đối với HCDR1, SEQ ID NO:2 đối với HCDR2, và SEQ ID NO:3 đối với HCDR3.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light variable region - LCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11, và vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy variable region - HCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9. Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, và vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 11, và vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, bao gồm chuỗi nhẹ (light chain - LC) và chuỗi nặng (heavy chain - HC), trong đó trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 13 hoặc 14, và trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO: 12. Theo phương án cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, bao gồm chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 13, và trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO: 12. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, bao gồm chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), trong đó trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 14, và trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO: 12. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm hai LC và hai HC, trong đó trình tự axit amin của mỗi LC là SEQ ID NO: 13 hoặc 14, và trình tự axit amin của mỗi HC là SEQ ID NO: 12. Theo phương án cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm hai LC và hai HC, trong đó trình tự axit amin của mỗi LC là SEQ ID NO: 13, và trình tự axit amin của mỗi HC là SEQ ID NO:

12. Theo phương án cụ thể hơn, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm hai LC và hai HC, trong đó trình tự axit amin của mỗi LC là SEQ ID NO: 14, và trình tự axit amin của mỗi HC là SEQ ID NO: 12.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng. Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β , bao gồm việc cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β , bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Đặc biệt là, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh được chọn từ bệnh Alzheimer lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, và CAA lâm sàng hoặc tiền lâm sàng bao gồm cho bệnh nhân này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh Alzheimer lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, và CAA lâm sàng hoặc tiền lâm sàng bao gồm việc cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị dùng lượng hữu hiệu của dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước (đôi khi còn được gọi là chứng suy giảm nhận thức nhẹ liên quan tới A β , hoặc MCI), AD nhẹ, AD trung bình, và AD nặng, bao gồm việc cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình, và AD nặng, bao gồm việc cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer tiền lâm sàng, bệnh Alzheimer lâm sàng, hội chứng Down, hoặc bệnh mạch máu não tích tụ amyloid lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, bao gồm việc dùng dược phẩm bao gồm

kháng thể theo sáng chế. Cụ thể hơn, sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình và AD nặng, bao gồm việc dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer tiền lâm sàng, bệnh Alzheimer lâm sàng, hội chứng Down, hoặc bệnh mạch máu não tích tụ amyloid lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Cụ thể hơn, sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình và AD nặng, bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm chức năng ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer tiền lâm sàng hoặc bệnh Alzheimer lâm sàng, bao gồm việc dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Cụ thể hơn, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm chức năng ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình và AD nặng, bao gồm việc dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm chức năng ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer tiền lâm sàng hoặc bệnh Alzheimer lâm sàng, bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Cụ thể hơn, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm chức năng ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình và AD nặng, bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm tải lượng mảng A β amyloid ở não bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer tiền lâm sàng hoặc lâm sàng, bao gồm việc dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng

ché. Cụ thể hơn, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm tải lượng mảng A β amyloid ở não bệnh nhân được chẩn đoán mắc tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình hoặc AD nặng, bao gồm việc dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân không có triệu chứng bao gồm việc cho bệnh nhân dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh nhân có lượng A β 1-42 giảm ở dịch não tủy (CSF) hoặc các mảng A β trong não.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân không có triệu chứng đã biết là có thể đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer, bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân không có triệu chứng đã biết là có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A gây bệnh Alzheimer (thể đột biến Paisa), bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh nhân không có triệu chứng có thể đột biến di truyền, như thể đột biến ở gen APP, PSEN1, hoặc PSEN2, gây bệnh Alzheimer di truyền theo gen trội, bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân không có triệu chứng đã biết là có thể đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer, bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân không có triệu chứng đã biết là có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A gây bệnh Alzheimer (thể đột biến Paisa), bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác,

sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân không có triệu chứng có thể đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer di truyền theo gen trội, bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng được phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân không có triệu chứng đã biết là có thể đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer, bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng được phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân không có triệu chứng đã biết là có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A gây bệnh Alzheimer (thể đột biến Paisa), bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng được phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế. Theo phương án cụ thể khác, sáng chế mô tả phương pháp làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân không có triệu chứng có thể đột biến di truyền gây bệnh Alzheimer di truyền theo gen trội, bao gồm việc cho bệnh nhân này dùng được phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong trị liệu. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong điều trị bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β . Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong điều trị bệnh Alzheimer lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, hoặc bệnh mạch máu não tích tụ amyloid lâm sàng hoặc tiền lâm sàng. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong điều trị tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình và AD nặng. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong việc làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, hoặc bệnh mạch máu não tích tụ amyloid lâm sàng hoặc tiền lâm sàng. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể

theo sáng chế để dùng trong việc làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình, hoặc AD nặng.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong việc làm giảm tải lượng mảng A β amyloid ở não. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong việc điều trị tình trạng bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β ở bệnh nhân có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong việc điều trị chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong ngăn ngừa chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong việc ngăn ngừa tình trạng bệnh được chọn từ AD lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, và CAA lâm sàng hoặc tiền lâm sàng. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể theo sáng chế để dùng trong việc ngăn ngừa tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình, và AD nặng.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế để dùng trong trị liệu. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm kháng thể để dùng trong điều trị bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β .

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc điều trị bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β . Theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc điều trị bệnh Alzheimer lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, và bệnh mạch máu não tích tụ amyloid lâm sàng hoặc tiền lâm sàng. Theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc điều trị AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình hoặc AD nặng. Theo phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để làm chậm

chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc tình trạng bệnh được chọn từ bệnh Alzheimer lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, và bệnh mạch máu não tích tụ amyloid lâm sàng hoặc tiền lâm sàng. Theo phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để làm chậm chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình và AD nặng.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để làm giảm tải lượng mảng A β amyloid ở não. Theo phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị tình trạng bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β ở bệnh nhân có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A. Theo phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A. Theo phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để ngăn ngừa chứng mất trí nhớ hoặc chứng suy giảm nhận thức ở bệnh nhân. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh nhân có thể đột biến di truyền PSEN1 E280A. Theo phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để ngăn ngừa tình trạng bệnh được chọn từ AD lâm sàng hoặc tiền lâm sàng, hội chứng Down, và CAA lâm sàng hoặc tiền lâm sàng. Theo phương án khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc để ngăn ngừa tình trạng bệnh được chọn từ AD báo trước, AD nhẹ, AD trung bình, và AD nặng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến

phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, và chứa trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, và phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, và phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14. Theo phương án cụ thể, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 là SEQ ID NO: 15 và trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13 là SEQ ID NO: 16. Theo phương án cụ thể, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 là SEQ ID NO: 15, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 là SEQ ID NO: 17, và trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13 là SEQ ID NO: 16.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 và phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13 hoặc 14. Tốt hơn nếu tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Theo phương án khác, tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14. Theo một phương án, dòng tế bào động vật

có vú là dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO) hoặc dòng tế bào của thận phôi chuột đồng (Hamster embryonic kidney - HEK).

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:12 và/hoặc phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể bao gồm HC có trình tự axit amin SEQ ID NO:12 và LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Tốt hơn nếu tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:12 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Sáng chế cũng đề cập đến tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:12 và/hoặc phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể bao gồm HC có trình tự axit amin SEQ ID NO:12 và LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Tốt hơn nếu tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:12 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13. Theo một phương án, dòng tế bào động vật có vú là dòng tế bào CHO hoặc HEK.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể bao gồm LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO:9, trong đó quy trình này bao gồm việc nuôi cấy tế bào động vật có vú bao gồm ADN mã hóa LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và/hoặc ADN mã hóa HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO:9 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay ở trên. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể bao gồm LCVR có

trình tự axit amin SEQ ID NO: 11 và HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO:9, trong đó quy trình bao gồm nuôi cấy tế bào động vật có vú bao gồm ADN mã hóa LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 11 và/hoặc HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO:9 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay ở trên.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể bao gồm LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13 và HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, trong đó quy trình này bao gồm việc nuôi cấy tế bào động vật có vú bao gồm ADN mã hóa LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13 và/hoặc HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm cả kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay ở trên. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể bao gồm LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12, trong đó quy trình bao gồm việc nuôi cấy tế bào động vật có vú bao gồm ADN mã hóa LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14 và/hoặc HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm cả kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay ở trên.

Sáng chế bao gồm quy trình sản xuất kháng thể, mà kháng thể này bao gồm hai HC và hai LC, trong đó trình tự axit amin của một trong hai HC là SEQ ID NO: 12, và trình tự axit amin của một trong hai LC là SEQ ID NO: 13, và quy trình này bao gồm: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú theo sáng chế, như được mô tả trên đây, trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và b) thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm cả kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay ở trên. Sáng chế cũng bao gồm cả quy trình sản xuất kháng thể, mà kháng thể này bao gồm hai HC và hai LC, trong đó trình tự

amin của một trong hai HC là SEQ ID NO: 12 và trình tự axit amin của một trong hai LC là SEQ ID NO: 14, và mà quy trình này bao gồm: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú theo sáng chế, như được mô tả trên đây, trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và b) thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm cả kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay ở trên.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kháng thể theo sáng chế gắn kết với N3pGlu A β . Trình tự của N3pGlu A β là trình tự axit amin SEQ ID NO: 22, và các biến thể có đầu tận carboxyl của chúng. Ví dụ về các biến thể có đầu tận carboxyl của N3pGlu A β bao gồm A β _{p3-40} và A β _{p3-43}.

Như được sử dụng ở đây, “kháng thể” là phân tử globulin miễn dịch gồm hai chuỗi nặng (HC) và hai chuỗi nhẹ (LC) được kết nối với nhau bằng các liên kết disulfua. Phần đầu tận amin của mỗi LC và HC chứa vùng biến đổi phụ trách việc nhận diện kháng nguyên thông qua các vùng quyết định bổ trợ complementarity determining region - (CDR) được chứa trong đó. Các vùng CDR nằm xen kẽ với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung. Việc gán các axit amin vào các miền CDR nằm trong vùng LCVR và HCVR của kháng thể theo sáng chế dựa trên quy tắc đánh số Kabat đã được biết đến rộng rãi (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), và quy tắc đánh số North (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)).

Các kháng thể theo sáng chế bao gồm kappa LC và IgG HC. Theo phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế là IgG1.

Các kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng (“mAb”).

Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra, chẳng hạn, bằng các công nghệ lai, công nghệ tái tổ hợp, công nghệ biểu hiện bằng thể thực khuẩn, công nghệ tổng hợp, ví dụ, ghép CDR, hoặc sự kết hợp của các công nghệ như vậy hoặc các công nghệ khác đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể, hoặc các axit nucleic mã hóa kháng thể, được tạo ra ở dạng phân lập. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân lập” chỉ protein, peptit hoặc axit nucleic mà không được phát hiện trong tự nhiên và không chứa hoặc hầu như không chứa các đại phân tử khác được phát hiện trong môi trường tế bào. “Về cơ bản không chứa”, như được sử dụng ở đây có nghĩa là protein, peptit hoặc axit nucleic quan tâm chứa nhiều hơn 80% (trên cơ sở mol) của các đại phân tử có mặt, tốt hơn là nhiều hơn 90% và tốt hơn nữa là nhiều hơn 95%.

Sau khi biểu hiện và tiết kháng thể, môi trường được làm trong để loại bỏ các tế bào và môi trường đã làm trong được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật thường được sử dụng. Kháng thể đã tinh chế có thể được bào chế thành dược phẩm theo các phương pháp đã được biết rõ để bào chế protein và kháng thể để dùng ngoài đường tiêu hóa, cụ thể là để dùng dưới da, nội tủy mạc hoặc dùng trong tĩnh mạch. Kháng thể có thể được làm đông khô, cùng với tá dược được dùng thích hợp, và sau đó được hoàn nguyên với dung dịch pha loãng trên cơ sở nước trước khi sử dụng. Theo cách khác, kháng thể có thể được bào chế trong dung dịch nước và được bảo quản tới 1 đến 3 năm trước khi sử dụng. Trong bất kỳ trường hợp nào, dạng bảo quản và dạng được tiêm của dược phẩm chứa kháng thể sẽ có thể chứa một hoặc nhiều tá dược được dùng, là các thành phần khác ngoài kháng thể. Xem xét thành phần là thành phần được dùng tùy thuộc vào hiệu quả của nó về mặt an toàn và hiệu lực hay độ tinh khiết, và hiệu lực của dược phẩm hay không. Nếu một thành phần được cho là có tác dụng bất lợi đến độ an toàn hoặc tác dụng (hoặc đến độ tinh khiết, hoặc tính hiệu nghiệm) đủ để cam đoan là nó không nên được sử dụng trong chế phẩm để dùng cho người, thì

thành phần này không phải là thành phần được dùng để dùng trong dược phẩm chứa kháng thể.

Dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân có nguy cơ, hoặc biểu hiện bệnh hoặc rối loạn nêu trong bản mô tả qua các đường ngoài tiêu hóa (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ). Đường dùng dưới da và trong tĩnh mạch được ưu tiên. Dược phẩm theo sáng chế chưa lượng “hữu hiệu” của kháng thể theo sáng chế. Lượng hữu hiệu dùng để chỉ lượng cần thiết (theo liều và trong các khoảng thời gian và cho các phương pháp dùng) để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng hữu hiệu của kháng thể có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và thể trọng của cá thể, và khả năng tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể của kháng thể. Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi bác sĩ chẩn đoán hoặc chuyên gia chăm sóc sức khỏe, được xem là người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được. Số lần dùng liều phụ thuộc vào dược động học và dược lực học thực tế ở người. Khoảng thời gian điều trị sẽ thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố và sẽ được xác định bởi người cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe chẩn đoán hoặc điều trị bệnh của bệnh nhân, dựa trên kinh nghiệm và kỹ năng trong lĩnh vực. Số lần dùng và khoảng thời gian điều trị có thể thay đổi theo chỉ định. Thuật ngữ “sự điều trị”, “việc điều trị” hoặc “điều trị” và các thuật ngữ tương tự bao gồm ngăn chặn, làm chậm, hoặc chấm dứt sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng, tình trạng bệnh, bệnh, hoặc rối loạn ở bệnh nhân. Thuật ngữ “bệnh nhân” dùng để chỉ người. Thuật ngữ “việc ngăn ngừa” và “ngăn ngừa” có nghĩa là việc dùng kháng thể phòng ngừa theo sáng chế cho bệnh nhân không có triệu chứng để giữ cho bệnh nhân không có các triệu chứng hoặc các dấu hiệu lâm sàng của bệnh thoái hóa thần kinh như AD.

Thuật ngữ “tình trạng bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β ,” là bệnh tức là bệnh lý được đặc trưng bởi chất kết lắng A β trong não hoặc trong hệ mạch não. Thuật ngữ này bao gồm các bệnh như bệnh Alzheimer, hội chứng

Down, và bệnh mạch máu não dạng bột. Việc chẩn đoán, phân chia giai đoạn hoặc sự tiến triển trên lâm sàng của bệnh Alzheimer có thể dễ dàng xác định được bởi bác sĩ chẩn đoán hoặc chuyên gia chăm sóc sức khỏe, được xem là người có kỹ năng trong lĩnh vực, bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được. Thuật ngữ này thường bao gồm một số dạng chụp ảnh mảng não, đánh giá nhận thức hoặc tâm thần (ví dụ, đánh giá bệnh sa sút trí tuệ lâm sàng – tóm tắt các mục (CDR-SB), thử nghiệm tình trạng nhận thức kém (Mini-Mental State Exam - MMSE) hoặc thang điểm đánh giá bệnh Alzheimer-nhận thức (Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive - ADAS-Cog)) hoặc đánh giá chức năng (ví dụ, thử nghiệm phối hợp vận động ở bệnh Alzheimer trong cuộc sống hằng ngày (Alzheimer's Disease Cooperative Study-Activities of Daily Living - ADCS-ADL). “Bệnh Alzheimer lâm sàng” như được sử dụng ở đây là giai đoạn chẩn đoán được của bệnh Alzheimer. Nó bao gồm các tình trạng được chẩn đoán như bệnh Alzheimer tiền triệu chứng, bệnh Alzheimer nhẹ, bệnh Alzheimer vừa và bệnh Alzheimer nặng. Thuật ngữ “bệnh Alzheimer tiền lâm sàng” là trạng thái trước của bệnh Alzheimer lâm sàng, trong đó các thay đổi có thể xác định được ở các chất đánh dấu sinh học (như mức CSF A β 42 hoặc tải lượng mảng được lắng đọng ở não bởi amyloid PET) chỉ ra các dấu hiệu sớm nhất của bệnh nhân bị Alzheimer, tiến triển thành bệnh Alzheimer lâm sàng. Giai đoạn này thường xuất hiện trước các triệu chứng như mất trí nhớ và nhầm lẫn trở nên đáng chú ý.

Các ví dụ và thử nghiệm dưới đây chứng tỏ rằng các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để điều trị bệnh được đặc trưng bởi quá trình lắng đọng A β , như của bệnh Alzheimer, hội chứng Down, và CAA. Tuy nhiên, cần hiểu rằng, các ví dụ sau được đưa ra chỉ để minh họa và không mang tính giới hạn, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể tiến hành các cải biến khác nhau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Biểu hiện và tinh chế các kháng thể N3pGlu A β được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền

Các kháng thể N3pGlu A β theo sáng chế có thể được biểu hiện và được tinh chế về cơ bản là như sau. Vector biểu hiện glutamin synthetaza (GS) chứa trình tự ADN mã hóa trình tự axit amin LC SEQ ID NO: 13 hoặc 14, và trình tự ADN mã hóa trình tự axit amin HC SEQ ID NO: 12 được sử dụng để chuyển nhiễm dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) bằng cách điện di. Vector biểu hiện mã hóa đoạn khởi đầu sớm SV (virus Simian 40E) và gen GS. Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được chọn lọc lượng lớn bằng 0-50 μ M L-methionin sulfoximin (MSX). Các tế bào đã được chọn lọc lượng lớn hoặc các lỗ chính sau đó được mở rộng trong môi trường hỗn dịch, không chứa huyết thanh cần sử dụng cho sản xuất.

Môi trường đã cạn trong mà kháng thể tiết vào đó được đưa lên cột ái lực Protein A mà đã được cân bằng bằng dung dịch đệm tương hợp, như nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4). Cột này được rửa bằng 1 M NaCl để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể N3pGlu A β đã gắn kết được rửa giải, ví dụ, bằng natri xitrat ở độ pH (xấp xỉ) 3,5 và các phân đoạn được trung hòa bằng dung dịch đệm Tris 1M. Các phân đoạn kháng thể N3pGlu A β được phát hiện, như bằng cách SDS-PAGE hoặc loại trừ kích cỡ phân tích, và sau đó được gộp lại. Kháng thể N3pGlu A β theo sáng chế được cô trong dung dịch đệm PBS ở độ pH 7,4 hoặc dung dịch đệm 10 mM NaXitrat, 150 mM NaCl ở độ pH khoảng 6. Nguyên liệu cuối có thể là nguyên liệu vô trùng được lọc bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường. Độ tinh khiết của kháng thể N3pGlu A β lớn hơn 95%. Kháng thể N3pGlu A β theo sáng chế có thể được làm đông lạnh ngay lập tức ở -70°C hoặc được bảo quản ở 4°C trong vài tháng. SEQ ID NO của axit amin đối với các kháng thể được lấy làm ví dụ theo sáng chế được chỉ ra dưới đây.

Bảng 1. Các trình tự axit amin của các kháng thể N3pGlu A β được lấy làm ví dụ.

SEQ ID NO của kháng thể				
Kháng thể	Chuỗi nhẹ	Chuỗi nặng	LCVR	HCVR
201c	13	12	10	9
201cYD	14	12	11	9

SEQ ID NO của kháng thể			
Kháng thể	LCDR1	LCDR2	LCDR3
201c	4	6	8
201cYD	5	7	8

SEQ ID NO của kháng thể			
Kháng thể	HCDR1	HCDR2	HCDR3
201c và 201cYD	1	2	3

Động học và ái lực gắn kết

Động học và ái lực gắn kết của kháng thể N3pGlu A β với peptit pE3-42 A β được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng Biacore® 3000 (GE Healthcare). Ái lực gắn kết được đo bằng cách bất động khoảng 120 RU peptit pE3-42 A β bằng cách ngẫu hợp amin trên chip Biacore® CM5, và chảy kháng thể N3pGlu A β , từ 500 nM trong dung dịch pha loãng theo dãy gấp 2 lần xuống 15,6 nM. Các thử nghiệm được thực hiện ở 25°C trong dung dịch đệm HBS-EP (GE Healthcare BR100669; 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, độ pH=7,4). Đối với mỗi chu kỳ, 250 μ L mẫu kháng thể được chảy qua tế bào dòng 1 và 2 ở 50 μ L/phút, và sau đó được phân ly trong 10 phút. Bề mặt chip được tái tạo với 5 μ L dung dịch đệm glyxin tiêm ở độ pH 1,5 với tốc độ chảy 10 μ L/mL. Dữ liệu được phù hợp với mô hình gắn kết Langmuir 1:1 để suy ra k_{on} , k_{off} , và để tính toán K_D . Các phương pháp sau về cơ bản như

được mô tả trên đây, các thông số sau (được thể hiện trong Bảng 2) được quan sát.

Bảng 2. Động học và ái lực gắn kết.

Kháng thể		k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
201c	Trung bình	1,64E+03	6,98E-05	4,57E-08
	S. D.	3,88E+02	1,36E-05	2,06E-08
201cYD	Trung bình	2,41E+03	6,39E-05	2,67E-08
	S. D.	2,01E+02	2,15E-06	2,61E-09

Các dữ liệu này chứng tỏ rằng các kháng thể theo sáng chế gắn kết với pE3-42 A β .

Tương tác với đích *Ex Vivo*

Để xác định tương tác với đích *ex vivo* trên các phần não từ não PDAPP cố định, phân tích mô miễn dịch được thực hiện với các kháng thể N3pGlu A β được bổ sung ngoại sinh theo sáng chế hoặc kháng thể 201c H3B. Kháng thể 201c H3B khác một axit amin so với kháng thể 201c, và sự khác biệt này nằm ở chuỗi nặng HCDR3 (Tyr ở vị trí 10 trong 201c HCDR3 là Phe trong 201c H3B). Kháng thể 201c H3B bao gồm trình tự axit amin của chuỗi nặng được nêu bởi SEQ ID NO: 20 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được nêu bởi SEQ ID NO: 13.

Các phần vành chuỗi điều nhiệt từ chuột nhắt PDAPP già (26 hoặc 20 tháng tuổi) được ủ với 5 μ g/mL hoặc 20 μ g/mL kháng thể N3pGlu A β được lấy làm ví dụ theo sáng chế (201c hoặc 201cYD). Các chất phản ứng HRP thứ cấp đặc hiệu đối với IgG người được sử dụng và các mảng lắng đọng được hiển thị hóa bằng DAB-Plus (DAKO). Kháng thể 3D6 của chuột, được biotinyl hóa, sau đó là Step-HRP thứ cấp được sử dụng làm đối chứng dương.

Các kháng thể N3pGlu A β được lấy làm ví dụ theo sáng chế được đánh dấu A β lắng đọng trong các phần não này. Tuy nhiên, việc nhuộm nền ở mức lớn hơn đối với kháng thể 201c H3B ở nồng độ 20 μ g/ml ngoại sinh được quan sát. Các

nghiên cứu mô này đã chứng minh rằng các kháng thể N3pGlu A β được lấy làm ví dụ theo sáng chế được tương tác với đích A β được lắng đọng *ex vivo*.

Thực bào *ex vivo*

Thử nghiệm thực bào *ex vivo* được thực hiện để nghiên cứu xem các kháng thể N3pGlu A β theo sáng chế có thể dễ dàng thực bào tiểu thần kinh đệm của mảng hay không. Các phần đông lạnh từ não người bị bệnh Alzheimer (20 μ m) được ủ sơ bộ với 10 μ g/mL kháng thể N3pGlu A β được lấy làm ví dụ theo sáng chế (201c hoặc 201cYD), các đối chứng, hoặc kháng thể 201c H3B trong một giờ ở 37°C trong các đĩa 24 lỗ. Có bốn lỗ/lần điều trị. Các tế bào tiểu thần kinh đệm của loài gặm nhấm sơ cấp (8×10^5 ; C57/BL6) sau đó được bổ sung và được ủ trong 24 giờ. Mô trong mỗi lỗ được làm đồng nhất trong dung dịch đệm guanidin 5,2 M và hàm lượng A β_{1-42} được đánh giá bằng ELISA. Do hàm lượng A β có thể thay đổi trong nhiều phần, nên đối chứng phản tương ứng được thực hiện đối với mỗi lỗ thử nghiệm và hàm lượng của lỗ thử nghiệm được chuẩn hóa thành hàm lượng của phản tương ứng.

Khi so sánh với mẫu đối chứng dương, các kháng thể N3pGlu A β được lấy làm ví dụ theo sáng chế (201c và 201cYD) và 201c H3B có A β_{1-42} giảm đáng kể. Mẫu đối chứng âm có độ thanh thải không đáng kể chứa A β_{1-42} lắng đọng. Do đó, các phân tích thực bào *ex vivo* chỉ ra rằng các kháng thể N3pGlu A β được lấy làm ví dụ theo sáng chế có thể làm sạch mảng *ex vivo* bằng cách thực bào.

Tương tác với đích *in vivo*

Khả năng đi qua hàng rào máu não của các kháng thể N3pGlu A β theo sáng chế và khả năng gắn kết với mảng lắng đọng *in vivo* được xác định. Chuột nhắt chuyển gen PDAPP già (18,5 đến 32 tháng tuổi) được tiêm trong màng bụng (IP) kháng thể N3pGlu A β (201c) hoặc IgG đối chứng âm. Sáu con chuột nhắt/nhóm nhận một lần tiêm 40 mg/kg kháng thể vào ngày 1 và vào ngày 3. Tương tác với

đích *in vivo* được xác định vào ngày 6, khi chuột nhất được giết và não được thu gom để phân tích mô học.

Mức độ tương tác với đích *in vivo* được xác định bằng phần trăm diện tích dương để tương tác kháng thể N3pGlu A β *in vivo* được chuẩn hóa thành tổng diện tích mảng như được xác định bằng cách nhuộm miễn dịch kháng thể 3D6 ngoại sinh trên các phần tương ứng (tỷ lệ TE). Tỷ lệ TE được tạo ra bằng cách xác định phần trăm diện tích được gắn kết bởi kháng thể này và chuẩn hóa giá trị so với tổng phần trăm diện tích của đích tiềm năng (tổng A β lắng đọng được quan sát bởi hóa mô miễn dịch ngoại sinh với kháng thể đối chứng dương (3D6) trên phần tương ứng).

Các phương pháp sau về cơ bản như được mô tả trên đây, kháng thể 201c có tỷ lệ TE là 2,8%. Kháng thể 201c đã chứng minh được khả năng tương tác với đích *in vivo* ở vùng dưới đồi và tới phạm vi giới hạn ở vỏ não, trong khi đó các động vật được tiêm IgG đối chứng có nhuộm mảng không đặc hiệu.

Khả năng làm sạch mảng *in vivo*

Các nghiên cứu được tiến hành bằng kháng thể khả năng thay thế với LCVR và HCVR của 201c hoặc 201c H3B được ngưng tụ thành vùng kappa hằng định của loài gặm nhấm và IgG2a Fc để đánh giá khả năng làm sạch mảng *in vivo* ở chuột nhất PDAPP già. Chuột nhất PDAPP già (21-tháng tuổi, n = 23 đến 25/nhóm) được tiêm dưới da một lần một tuần trong 7 tuần với 12,5 mg/kg kháng thể 201c khảm, kháng thể 201c H3B khảm, hoặc IgG đối chứng. Chuột nhất PDAPP già đối chứng (được giết ở lúc thiết lập nghiên cứu) được sử dụng để đánh giá mức độ lắng đọng sẵn có trước khi điều trị trị liệu.

Ở giai đoạn kết luận nghiên cứu, nồng độ được chất cuối được xác định trong huyết tương, và não được đánh giá bằng ELISA đối với nồng độ A β ₁₋₄₂. Chuột nhất PDAPP già ở nồng độ mảng tối đa như được chứng minh bởi mức tích tụ A β ₁₋₄₂ không đáng kể trong khoảng thời gian điều trị 7 tuần bằng IgG đối chứng.

Nhóm kháng thể khảm 201c và nhóm kháng thể khảm 201c H3B có A β ₁₋₄₂ giảm đáng kể (lần lượt là 26%, $p < 0,0182$ và 26%, $p = 0,0121$) so với đối chứng. Nồng độ tiếp xúc với kháng thể được xác định ở giai đoạn cuối của khoảng thời gian dùng liều 7 tuần, và kháng thể khảm 201c có nồng độ là 91 $\mu\text{g/mL}$, và 201c H3B có nồng độ là 56 $\mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu này đã chứng minh được rằng kháng thể N3pGlu A β khảm 201c được lấy làm ví dụ có thể làm giảm mảng bám (A β ₁₋₄₂) *in vivo*.

Thiếu hụt khả năng gắn kết huyết tương với ái lực thấp

Các nghiên cứu *in vitro* được tiến hành để nghiên cứu sự tương tác ái lực thấp tiềm năng của kháng thể kháng N3PG theo sáng chế (201c và 201cYD) với các protein huyết tương. Kháng thể 201c, 201cYD, hoặc 201c H3B được liên kết đồng hòa trị với các hạt Sepharoza và được ủ với 10mL huyết tương người khỏe mạnh trong 2 giờ ở 37°C trước khi tiến hành sắc ký cột. Hỗn hợp hạt/huyết tương được đóng gói trong các cột và rửa. Các protein gắn kết có chọn lọc được rửa giải bằng glyxin (độ pH = 2,5) ở các phân đoạn khác nhau. Sau đó, mỗi phân đoạn được phân tích trên gradien gel (4% đến 16%) điện di gel natri dodecyl sulfat (SDS)–polyacrylamit (PAGE) rửa giải cao. Vết bạc được sử dụng để quan sát các protein và các dải quan tâm được tiến hành và được phân tích bằng phổ khối. Đồng thời, nhiều kháng thể IgG1 người đối chứng được phân tích.

Các phương pháp sau về cơ bản như được mô tả trên đây, việc quan sát gel được tạo vết bạc đã chứng minh được sự có mặt của glycoprotein giàu histidin (dải ~64kDa), chuỗi alpha fibrinogen (dải ~60kDa), và chuỗi beta fibrinogen (dải ~50kDa) trong phân đoạn 5 từ dịch rửa giải kháng thể 201c H3B khi so sánh với các kháng thể IgG1 đối chứng. Ngược lại, các kháng thể 201c và 201cYD lacked khả năng gắn kết ái lực thấp đáng kể với các protein huyết tương người khi so sánh với IgG đối chứng và kháng thể 201c H3B.

Thử nghiệm EpiScreen về quá trình tăng sinh tế bào T *ex vivo*

Thử nghiệm tế bào T EpiScreen® *ex vivo* người được sử dụng để xác định quá trình hoạt hóa (quá trình tăng sinh, tiết xytokin) của các tế bào T CD4+ người để đáp ứng với kháng thể N3pGlu Aβ được lấy làm ví dụ theo sáng chế (201c) hoặc kháng thể 201c H3B. EpiScreen® sử dụng các mẫu từ 50 người cho khỏe mạnh biểu hiện tốt nhất số lượng và số lần allotyp HLA-DR và DQ được biểu hiện trong quần thể người châu Âu/Bắc Mỹ và thế giới. Hai đối chứng dương được bao gồm trong thử nghiệm: A33 được làm giống như của người, kháng thể tiêu chuẩn lâm sàng có mức độ sinh miễn dịch cao trên lâm sàng (73%) và đáp ứng tế bào T 20-30% cảm ứng thông thường trong thử nghiệm EpiScreen®, và KLH (keyhole limpet hemocyanin), protein tương tự phân bào chứa các kháng nguyên mới. Đối chứng âm chứa dung dịch đệm được làm phù hợp cũng bao gồm trong thử nghiệm.

Phần trăm của quá trình tăng sinh tế bào T được tính toán từ phần trăm trung bình của tất cả các đáp ứng của người cho dương được quan sát trong khoảng thời gian (ngày 5-8). Phần trăm của quá trình tăng sinh tế bào T lần lượt là 20% và 94% đối với đối chứng dương A33 và KLH, và là 24% đối với 201c H3B. Tuy nhiên, phần trăm của quá trình tăng sinh tế bào T là 10% đối với 201c. Các dữ liệu này chứng tỏ rằng kháng thể 201c có mức đáp ứng tế bào T thấp hơn so với đối chứng dương và kháng thể 201c H3B.

Phân tích sinh miễn dịch in silico

Thử nghiệm EpiMatrix® quét các trình tự protein đối với các epitop tế bào T tiềm năng và sử dụng thuật toán để dự đoán tính sinh miễn dịch. Nó cũng xem xét hàm lượng Tregitope và mức độ ảnh hưởng đến đáp ứng sinh miễn dịch điều hòa âm. Các trình tự axit amin của các kháng thể 201c, 201cYD, và B12L (kháng thể B12L bao gồm chuỗi nặng được nêu bởi SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ được nêu bởi SEQ ID NO: 24) được phân tích bằng EpiMatrix®. EpiMatrix® dự đoán các điểm số được chỉ ra trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Điểm số EpiMatrix®.

Kháng thể	Điểm số protein EpiMatrix	Điểm số protein EpiMatrix được điều chỉnh bởi Tregitope	Đáp ứng Ab phụ thuộc T được dự đoán
201c	39,14	-35,49	0,28%
201cYD	24,76	-49,87	0,00%
B12L	0,44	-17,92	4,03%

Các dữ liệu này chứng tỏ rằng đáp ứng kháng thể phụ thuộc tế bào T được dự đoán là nhỏ hơn đối với các kháng thể N3pGlu A β theo sáng chế (201c và 201cYD) khi so sánh với kháng thể B12L.

Thiếu hụt khả năng nhận diện kháng thể kháng dược chất (Anti-Drug Antibody - ADA)

Thử nghiệm cầu rửa giải bắt giữ ái lực (Affinity Capture Elution - ACE) bằng cách sử dụng 201c được đánh dấu biotin và ruteni hoặc 201cYD được đánh dấu biotin và ruteni được thực hiện để đánh giá xem các kháng thể kháng thuốc kháng lại trực tiếp kháng thể LY3002813 có thể gắn kết với 201c hoặc 201cYD hay không.

Trong thử nghiệm này, cầu ADA giữa hai kháng thể được đánh dấu (ví dụ, 201c được đánh dấu biotin và ruteni). Sau đó, phức chất gắn kết với đĩa được phủ bằng streptavidin (qua kháng thể được đánh dấu biotin) và việc phát hiện sử dụng Ruteni để tạo ra tín hiệu trên nền Mesoscale. Nếu ADA không nhận diện kháng thể 201c hoặc 201cYD, thì tín hiệu không được tạo ra. IgG kháng người của thỏ hầu như ưu tiên gắn kết với Fc, và được dùng làm đối chứng dương để chỉ ra rằng 201c hoặc 201cYD được đánh dấu có thể gắn kết với các kháng thể.

Các kháng thể trực tiếp kháng lại LY3002813 bao gồm cả ái lực kháng thể được tinh chế từ hai mẫu bệnh nhân từ thử nghiệm lâm sàng (I5T-MC-AACC NCT01837641) sau khi dùng LY3002813. Các bệnh nhân này được phát triển đáp

ứng ADA đối với LY3002813 theo thời gian như được thể hiện bởi tín hiệu gắn kết dương trên cầu ACE.

Các phương pháp sau về cơ bản như được mô tả trên đây, tín hiệu không được quan sát trên nền khi phát hiện quá trình gắn kết của 201c hoặc 201cYD với các kháng thể kháng lại LY3002813. Các dữ liệu này chứng tỏ rằng ADA trực tiếp kháng lại LY3002813 ở người không nhận diện 201c và 201cYD.

Các trình tự

HCDR1 của kháng thể 201c, kháng thể 201cYD, và kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 1)

AASGFTFSSYPMS

HCDR2 của kháng thể 201c, kháng thể 201cYD, và kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 2)

AI SGSGGSTYYADSVKG

HCDR3 của kháng thể 201c và kháng thể 201cYD (SEQ ID NO: 3)

AREGGSGSYNGFDY

LCDR1 của kháng thể 201c và kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 4)

RASQSLGNWLA

LCDR1 của kháng thể 201cYD (SEQ ID NO: 5)

RASQSLGNYLA

LCDR2 của kháng thể 201c và kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 6)

YQASTLES

LCDR2 của kháng thể 201cYD (SEQ ID NO: 7)

YDASTLES

LCDR3 của kháng thể 201c, kháng thể 201cYD, và kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 8)

QHYKGSFWT

HCVR của kháng thể 201c và kháng thể 201cYD (SEQ ID NO: 9)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
GSGSYNGFDYWGQGTLVTVSS

LCVR của kháng thể 201c và kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 10)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQ
ASTLESGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYKGSFWTFGQGT
KVEIK

LCVR của kháng thể 201cYD (SEQ ID NO: 11)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNYLAWYQQKPGKAPKLLIYD
ASTLESGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYKGSFWTFGQGT
KVEIK

Chuỗi nặng của kháng thể 201c và kháng thể 201cYD (SEQ ID NO: 12)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
GSGSYNGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Chuỗi nhẹ của kháng thể 201c và kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 13)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQ
ASTLESGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYKGSFWTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

Chuỗi nhẹ của kháng thể 201cYD (SEQ ID NO: 14)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNYLAWYQQKPGKAPKLLIYD
 ASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQHYKGSFWTFGQGT
 KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

**ADN được lấy làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nặng của kháng thể có trình tự
 SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 15)**

gaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgg
 attcaccttagcagctatcctatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggtctcagctattagt
 ggtagtggtgtagcacatactacgcagactccgtgaagggccgggtcaccatctccagagacaattccaagaacac
 gctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgagagaggggggctcaggg
 agttattataacggccttgattattggggccagggaaccctgggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggt
 ctccccgtagcacctctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttcc
 ccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccgggtgtcctacagtcc
 tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagc

agcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagc
 ccaaattcttgacaaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagttcttctctt
 cccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag
 gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta
 caagtgcagggtccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccg
 agaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtc
 aaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacg
 cccccgtgctggactccgacggctccttctcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg
 gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

**ADN được lấy làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự
 SEQ ID NO: 13 (SEQ ID NO: 16)**

gacatccagatgaccagctctcctccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggccagtc
 agagtcttggttaactgggtggcctgggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaaactcctgatctatcaggcgtctac
 tttagaatctgggggtcccatcaagattcagcggcagtggtatctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcag
 cctgatgattttgcaacttattactgccaacattataaagggtcttttggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatca
 aacggaccgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgt
 gcctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc
 aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagca
 gactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaa
 caggggagagtgc

**ADN được lấy làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nhẹ của kháng thể có trình tự
 SEQ ID NO: 14 (SEQ ID NO: 17)**

gacatccagatgaccagctctcctccaccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggccagtc
 agagtcttggttaactatttggcctgggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaaactcctgatctatgatgcgtctactt
 tagaatctgggggtcccatcaagattcagcggcagtggtatctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagc
 ctgatgattttgcaacttattactgccaacattataaagggtcttttggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaa
 acggaccgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtg
 cctgtgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
 ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcag
 actacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaac
 aggggagagtgc

HCDR3 của kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 18)

AREGSGSGSYFNGFDY

HCVR của kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 19)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSA
 ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
 GSGSYFNGFDYWGQGTLVTVSS

Chuỗi nặng của kháng thể 201c H3B (SEQ ID NO: 20)

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGLEWVSA
 ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
 GSGSYFNGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
 KDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

**ADN được lấy làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nặng của kháng thể có trình tự
 SEQ ID NO: 20 (SEQ ID NO: 21)**

gaggtgcagctgttgagctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgg
 attcaccttagcagctatcctatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagctattagt
 ggtagtggtgtagcacatactacgcagactccgtgaagggccgggtcaccatctccagagacaattccaagaacac
 gctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgagagaggggggctcaggg
 agttattttaacggcttgattattggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggt
 cttcccgctagcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcc
 ccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttccgggtgtcctacagtcc
 tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg
 aatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgacaaaactcacacatgcccacc
 gtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
 ccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtg
 gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
 gtctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaagccctcccagc
 ccccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccg
 ggacgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagt
 ggggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcccccggtgctggactccgacggctccttcttct

ctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctct
gcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

N3pGlu A β (SEQ ID NO: 22)

[pE]FRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGGVIA

Chuỗi nặng của kháng thể B12L (SEQ ID NO: 23)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYDFTRYINWVRQAPGQGLEWM
GWINPGSGNTKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR
EGITVYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Chuỗi nhẹ của kháng thể B12L (SEQ ID NO: 24)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSRGKTYLNWLLQKPGQSPQLL
IYAVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQGTHYPFTF
GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết với N3pGlu A β người, bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR), trong đó LCVR bao gồm LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8, và trong đó HCVR bao gồm HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, và HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó LCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, và HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9.
3. Kháng thể theo điểm 1, bao gồm chuỗi nhẹ (LC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, và chuỗi nặng (HC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12.
4. Kháng thể theo điểm 3, bao gồm hai LC và hai HC, trong đó trình tự axit amin của mỗi LC là SEQ ID NO: 13, và trình tự axit amin của mỗi HC là SEQ ID NO: 12.
5. Dược phẩm bao gồm kháng thể theo điểm 1 và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng.
6. Phân tử ADN bao gồm polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 12.
7. Phân tử ADN theo điểm 6, trong đó polynucleotit bao gồm SEQ ID NO: 15.

8. Phân tử ADN bao gồm polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 13.

9. Phân tử ADN theo điểm 8, trong đó polynucleotit bao gồm SEQ ID NO: 16.

10. Phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 12 và trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 13.

11. Phân tử ADN theo điểm 10, trong đó trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể là SEQ ID NO: 15 và trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể là SEQ ID NO: 16.

12. Tế bào động vật có vú được biến nạp với phân tử ADN bao gồm: polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 12 và/hoặc polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 13.

13. Tế bào động vật có vú theo điểm 12 được biến nạp với phân tử ADN bao gồm: polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 12 và polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể bao gồm SEQ ID NO: 13.

14. Quy trình sản xuất kháng thể bao gồm hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, trong đó mỗi chuỗi nặng bao gồm SEQ ID NO: 12, và mỗi chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO: 13, và trong đó quy trình này bao gồm: a) biểu hiện kháng thể trong các điều kiện thích hợp ở tế bào động vật có vú, và b) thu hồi kháng thể đã được biểu hiện.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI AMYLOIT BETA N3pGlu NGƯỜI VÀ DUỘC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> X21357

<140> 62/487550

<141> 2017-04-20

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Pro Met Ser

1 5 10

 $\langle 210 \rangle \quad 2$

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Ala Arg Glu Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Glu Ser

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Gln His Tyr Lys Gly Ser Phe Trp Thr

1

5

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Glu Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp Tyr Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Asn Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Gly Ser Phe Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Asn Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Gly Ser Phe Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 12

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Glu Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Gly Phe Asp Tyr Trp

100

105

110

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro Gly

450

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Asn Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gln Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Gly Ser Phe Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

[illegible]

<210> 14

$\langle 211 \rangle$ 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Lys Gly Ser Phe Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 15
 <211> 1353

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

gaggtgcagc 60	tgttggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggc	cctgagactc
tcctgtgcag 120	cctctggatt	cacctttagc	agctatccta	tgagctgggt	ccgccaggct
ccaggaagc 180	ggctggagtg	ggtctcagct	attagtggta	gtggtggtag	cacatactac
gcagactccg 240	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat
ctgcaaata 300	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gagagagggg
ggctcaggga 360	gttattataa	cggctttgat	tattggggcc	agggaaacct	ggtcaccgtc
tcctcagcct 420	ccaccaaggc	cccatcggtc	ttcccgttag	cacctctctc	caagagcacc
tctgggggca 480	cagcggccct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg
gtgtcgtgga 540	actcaggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccggc	tgtcctacag
tcctcaggac 600	tctactccct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacc
cagacctaca 660	tctgcaacgt	gaatcacaag	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaaagtt
gagcccaaata 720	cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gccagcacc	tgaactcctg
gggggacogt 780	cagtcttcct	cttcccccca	aaacccaagg	acacctcat	gatctcccg

acccctgagg 840	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc
aactggtacg 900	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaaga	caaagccgcg	ggaggagcag
tacaacagca 960	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgctcc	tgcaccagga	ctggctgaat
ggcaaggagt 1020	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc
atctccaaag 1080	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccgg
gacgagctga 1140	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc
gacatcgccg 1200	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgccc
cccgtgctgg 1260	actccgacgg	ctccttcttc	ctctatagca	agctcaccgt	ggacaagagc
aggtggcagc 1320	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac

tacacgcaga 1353	agagcctctc	cctgtctccg	ggt
--------------------	------------	------------	-----

<210> 16

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

gacatccaga 60	tgacccagtc	tccttccaac	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc
atcacttgcc 120	gggccagtc	gagtcttgg	aactggttgg	cctgggtatca	gcagaaacca

```

gggaaagccc   ctaaactcct   gatctatcag   gcgtctactt   tagaatctgg   ggtcccatca
180

agattcagcg   gcagtggatc   tgggacagag   ttcactctca   ccatcagcag   cctgcagcct
240

gatgattttg   caacttatta   ctgccaacat   tataaagggt   ctttttggac   gttcggccaa
300

gggaccaagg   tggaaatcaa   acggaccgtg   gctgcaccat   ctgtcttcat   cttcccgcc
360

tctgatgagc   agttgaaatc   tggaactgcc   tctgttgtgt   gcctgctgaa   taacttctat
420

cccagagagg   ccaaagtaca   gtggaagggt   gataacgccc   tccaatcggg   taactcccag
480

gagagtgtca   cagagcagga   cagcaaggac   agcacctaca   gcctcagcag   caccctgacg
540

ctgagcaaag   cagactacga   gaaacacaaa   gtctacgcct   gcgaagtcac   ccatcagggc
600

ctgagctcgc           ccgtcacaaa           gagcttcaac           aggggagagt           gc
642

```

<210> 17

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

```

gacatccaga   tgaccagtc   tccttocacc   ctgtctgcat   ctgtaggaga   cagagtcacc
60

atcacttgcc   gggccagtc   gagtcttggg   aactatttgg   cctgggtatca   gcagaaacca
120

```

```

gggaaagccc  ctaaactcct  gatctatgat  gcgtctactt  tagaatctgg  ggtcccatca
180

agattcagcg  gcagtggatc  tgggacagag  ttcactctca  ccatcagcag  cctgcagcct
240

gatgattttg  caacttatta  ctgccaacat  tataaagggt  ctttttggac  gttcggccaa
300

gggaccaagg  tggaaatcaa  acggaccgtg  gctgcaccat  ctgtcttcat  cttcccgcc
360

tctgatgagc  agttgaaatc  tggaactgcc  tctgttgtgt  gcctgctgaa  taacttctat
420

cccagagagg  ccaaagtaca  gtggaagggt  gataacgccc  tccaatcggg  taactcccag
480

gagagtgtca  cagagcagga  cagcaaggac  agcacctaca  gcctcagcag  caccctgacg
540

ctgagcaaag  cagactacga  gaaacacaaa  gtctacgcct  gcgaagtcac  ccatcagggc
600

ctgagctcgc          ccgtcacaaa          gagcttcaac          aggggagagt          gc
642

```

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

Ala Arg Glu Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Phe Asn Gly Phe Asp Tyr

1

5

10

15

<210> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Phe Asn Gly Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 20

<211> 451

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Phe Asn Gly Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

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

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

325

330

335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

340

345

350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val

355

360

365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370

375

380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385

390

395

400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405

410

415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420

425

430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435

440

445

Ser Pro Gly

450

<210> 21

<211> 1353

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21

gaggtgcagc 60	tgttggagtc	tgggggaggc	ttggtacagc	ctgggggggtc	cctgagactc
tcctgtgcag 120	cctctggatt	cacctttagc	agctatccta	tgagctgggt	ccgccaggct
ccagggaagg 180	ggctggagtg	ggtctcagct	attagtggta	gtggtggtag	cacatactac
gcagactccg 240	tgaagggccg	gttcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat
ctgcaaata 300	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtat	attactgtgc	gagagagggg
ggctcagga 360	gttatatttaa	cggctttgat	tattggggcc	agggaaccct	ggtcaccgtc
tcctcagcct 420	ccaccaaggg	cccatcggtc	ttcccgttag	caccctcctc	caagagcacc
tctgggggca 480	cagcggccct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg
gtgtcgtgga 540	actcaggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccggc	tgtcctacag
tcctcaggac 600	tctactccct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacc
cagacctaca 660	tctgcaacgt	gaatcacaag	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaaagtt
gagcccaaata 720	cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gcccagcacc	tgaactcctg
gggggaccgt 780	cagtcttcct	cttcccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccg
accctgagg 840	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc
aactggtacg 900	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag

tacaacagca 960	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctgggtgaat
ggcaaggagt 1020	acaagtgcaa	ggctctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc
atctccaaag 1080	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccgg
gacgagctga 1140	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc
gacatcgccg 1200	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgccc
cccgtgctgg 1260	actccgacgg	ctccttcttc	ctctatagca	agctcaccgt	ggacaagagc
aggtggcagc 1320	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac
tacacgcaga 1353		agagcctctc		cctgtctccg	ggt

<210> 22

<211> 40

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa ở vị trí 1 = axit pyroglutamic

<400> 22

Xaa Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val

1 5 10 15
Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu

 20 25 30
Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

 35 40

<210> 23

<211> 444

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Tổng hợp

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1				5					10					15				
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asp	Phe	Thr	Arg	Tyr			
				20					25					30				

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85		90		95										
Ala	Arg	Glu	Gly	Ile	Thr	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
	100		105		110										
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
	115		120		125										
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val
	130		135		140										
Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
145			150		155									160	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly
	165		170		175										
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly
	180		185		190										
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
	195		200		205										
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
	210		215		220										
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225			230		235									240	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
	245		250		255										
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
	260		265		270										

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275

280

285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu

290

295

300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys

305

310

315

320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325

330

335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340

345

350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys

355

360

365

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

370

375

380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly

385

390

395

400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405

410

415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

420

425

430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435

440

<210> 24

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Arg Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly

85 90 95

Thr His Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165

170

175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180

185

190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195

200

205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215