



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039272

(51)⁷ A61K 39/00; C07K 16/46; C07K 16/18 (13) B

(21) 1-2018-05772

(22) 01/06/2017

(86) PCT/EP2017/063406 01/06/2017

(87) WO 2017/207739 07/12/2017

(30) 62/344,746 02/06/2016 US

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/06/2019 375A

(73) MEDIMMUNE LIMITED (GB)

Milstein Building Granta Park, Cambridge CB21 6GH, United Kingdom

(72) PERKINTON, Michael (GB); SCHOFIELD, Darren (GB); IRVING, Lorraine (GB); THOM, George (GB).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG ALPHA-SYNUCLEIN, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với α -synuclein của người với ái lực cao và làm giảm sự lan rộng α -synuclein in vivo, polypeptit tái tổ hợp chứa kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và phương pháp tạo ra polypeptit này, cũng như chế phẩm và phương pháp tạo ra kháng thể α -synuclein, và phương pháp sử dụng kháng thể α -synuclein để điều trị các bệnh của hệ thần kinh trung ương, cụ thể là bệnh lý alpha-synuclein.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể α -synuclein và ứng dụng của chúng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, cụ thể bệnh lý alpha-synuclein, và cụ thể hơn là bệnh Parkinson (PD).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh lý alpha-synuclein, còn được biết là bệnh thể Lewy (LBD), là họ các bệnh thoái hóa thần kinh mà tất cả đều có, ở điểm cốt lõi của chúng, alpha-synuclein làm dấu hiệu phân biệt bệnh lý then chốt (Jellinger, Mov Disord (2003), 18 Suppl 6: S2-12; và Spillantini and Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Bệnh lý alpha-synuclein bao gồm bệnh Parkinson (PD), bệnh sa sút trí tuệ với thể Lewy (DLB) và chứng teo đa hệ thống (MSA).

PD là rối loạn vận động có liên quan đến tuổi tác, tiến triển từ từ ảnh hưởng đến hơn 1% người có độ tuổi trên 65. PD là tình trạng bệnh lý thoái hóa thần kinh phổ biến thứ hai sau bệnh Alzheimer.

Bệnh lý có tính phân biệt rõ của bệnh lý alpha-synuclein là thể Lewy và sợi trục Lewy, đây là các thể vùi không tan của các protein đã kết tụ tìm thấy bên trong các neuron của não được khám phá trong quá trình khám nghiệm mô bệnh học tử thi.

Sự có mặt của bệnh lý Lewy và sự tổn thất neuron trong vùng não không vận động như phần nền não trước, hệ mesopontin, hạnh nhân, vỏ não mới, nhân lưng vận động của dây thần kinh phế-vị, hành khứu giác, nhân lục, và cuống não, có thể gây ra các thiếu hụt nhận thức và bệnh sa sút trí tuệ, giảm khứu giác, sự xáo trộn giấc ngủ bao gồm rối loạn hành vi giấc ngủ cử động mắt nhanh (RBD), rối loạn tính khí bao gồm trầm cảm và lo lắng, loạn chức năng tự chủ bao gồm các vấn đề tim mạch và dạ dày-ruột non như bệnh táo bón, mệt mỏi và tình trạng buồn ngủ. Một số trong số các triệu chứng không vận động này dường như là đặc điểm của pha tiền vận động hoặc tiền

triệu chứng của bệnh (Kalia *et al.* Lancet (2015), 386(9996): 896-912; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Sự có mặt của bệnh lý Lewy và sự tổn thất neuron trong vùng não vận động, bao gồm, đáng chú ý nhất là, sự chết các neuron gây tiết dopamin trong liềm đen, có thể gây ra chứng run khi nghỉ, cứng, vận động chậm và mất ổn định tư thế (Spillantini and Goedert, Ann N Y Acad Sci (2000), 920: 16-27; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Protein alpha-synuclein (còn được gọi là “ α -synuclein” hoặc “ α -syn”) là thành phần cấu trúc chính của thể Lewy và sợi trục Lewy. Alpha-synuclein là protein nhỏ có tính axit được tạo nên từ 140 axit amin (14 kDa). Alpha-synuclein kiểu đại tự nhiên của người có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 như được mô tả dưới số tiếp cận UniProtKB P37840. Trừ khi được nêu rõ ràng, viện dẫn đến alpha-synuclein hoặc mảnh của nó bao gồm trình tự axit amin kiểu đại tự nhiên của người được nêu trên đây, và các biến thể alen của nó ở người, cụ thể các biến thể có liên quan đến bệnh thể Lewy (ví dụ, E46K, A30P, H50Q, G51D và A53T, trong đó chữ cái thứ nhất biểu thị axit amin trong SEQ ID NO: 1, con số chỉ vị trí codon trong SEQ ID NO: 1, và chữ cái thứ hai là axit amin trong biến thể alen). Các biến thể như vậy có thể tùy ý có mặt riêng rẽ hoặc trong tổ hợp bất kỳ. Các đột biến đã được kích thích E83Q, A90V, A76T, mà tăng cường sự kết tụ alpha-synuclein, cũng có thể có mặt riêng rẽ hoặc kết hợp với nhau và/hoặc với các biến thể alen của người E46K, A30P, H50Q, G51D và A53T. Ở mức độ cấu trúc, alpha-synuclein chứa ba vùng riêng biệt: miền xoắn alpha đầu tận N lưỡng tính có tính chất liên kết màng và lipid (các gốc 1-60), miền liên kết amyloid kỵ nước trung tâm mã hóa thành phần không phải amyloid-beta (NAC) của các mảng (các gốc 61-95), và đuôi đầu tận C giàu prolin có tính axit (các gốc 96-140). Các gốc 71-82 của miền NAC được tin là quan trọng đối với các tính chất kết tụ/kết sợi của alpha-synuclein bằng cách làm cho protein này có thể chuyển từ cấu trúc cuộn ngẫu nhiên thành cấu trúc tấm beta (Bisaglia *et al.* FASEB J (2009), 23(2): 329-40; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Mặc dù miền đầu tận không có cấu trúc bậc hai quan trọng, nhưng nó chứa vị trí phosphoryl hóa quan trọng ở gốc Ser129 và số lượng gốc tyrosin mà được nitrat hóa trong các thể vùi alpha-synuclein bào tan. Các dạng cắt đứt đầu tận N và đầu tận C của alpha-synuclein cũng tồn tại. Cải biến sau dịch mã đối với protein này có thể ảnh hưởng đến sự kết tụ và tính độc của alpha-synuclein

(Oueslati *et al.* Prog Brain Res (2010), 183: 115-45; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Alpha-synuclein có nhiều trong hệ thần kinh trung ương (CNS)/não ở đó nó được tìm thấy cả nội bào trong các noron và tế bào thần kinh đệm và cả ngoại bào trong dịch não tủy (CSF) (Mollenhauer *et al.* J Neural Transm (2012), 119(7): 739-46; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) và dịch mô (ISF) mà nhúng và bao quanh các tế bào của não (Emmanouilidou *et al.* PLoS One (2011), 6(7): e22225; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Alpha-synuclein là protein thuộc synap được biểu hiện nổi trội trong các noron của vỏ não mới, vùng hải mã, liềm đen, đồi thị, và tiểu não (Iwai *et al.* Neuron (1995), 14: 467-475; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Trong các điều kiện sinh lý, nó được định vị trong các đầu tận synap noron và cụ thể được điều hòa tăng ở các đầu tận tiền synap trong quá trình tái sắp xếp synap có liên quan đến việc thu nhận (Fortin *et al.* J Neurosci (2005), 25: 10913-10921; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các nghiên cứu *in-vitro* đã cho thấy rằng các monome alpha-synuclein có thể tạo thành điểm bắt đầu đối với quy trình kết tụ. Monome có thể kết tụ thành nhiều loại oligome khác nhau mà sau đó được làm ổn định bởi tương tác tấm beta, tiếp tục tạo thành các protofibril mà có thể polyme hóa thành các cấu trúc dạng sợi nhỏ không tan phẳng phát các cấu trúc được nhận diện trong thể Lewy (Cremades *et al.* Cell (2012), 149(5): 1048-59; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Trong các tình trạng bệnh lý, sự kết tụ alpha-synuclein khác thường có thể là chìa khóa đối với các thay đổi bệnh lý quan sát thấy ở bệnh lý alpha-synuclein (Lashuel *et al.* Nature (2002), 418: 291; và Tsigelny *et al.* FEBS Journal (2007), 274: 1862-1877; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* đã cho thấy rằng các tác dụng gây độc thần kinh của alpha-synuclein dường như là được gợi ra bởi các conformer hoặc protofibril oligome nhỏ hòa tan (Winner *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A (2011), 108(10): 4194-9; và Danzer *et al.* J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Trong khi các khối kết tụ dạng sợi nhỏ của alpha-synuclein là đặc trưng của PD, dạng oligome của alpha-synuclein là loại độc tính (Danzer *et al.* J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; Lashuel *et al.* Nature (2002), 418:

291; và Winner *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (2011), 108: 4194-4199; mỗi trong số các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các oligome alpha-synuclein có thể được giải phóng vào môi trường ngoại bào và được hấp thụ bởi tế bào lân cận theo cơ chế “lan truyền” (Angot and Brundin, Parkinsonism Relat Disord (2009), 15 Suppl 3: S143-147; Desplats *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (2009), 106: 13010-13015; và Lee *et al.* J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272; mỗi trong số các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các khối kết tụ của alpha-synuclein có thể lan truyền gấp nếp sai thông qua cơ chế lan rộng giống như prion (Lee *et al.* Nat Rev Neurol (2010), 6: 702-706; Luk *et al.* J Exp Med (2012), 209(5): 975-86; và Luk *et al.* Science (2012), 338(6109): 949-53; mỗi trong số các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Do đó, alpha-synuclein có thể gây ra sự thoái hóa thần kinh bởi độc tính oligome hoặc sự lan truyền và lan rộng giống như prion.

Hiện nay đã thiết lập rõ và chấp nhận rằng các tế bào bao gồm neuron có thể tiết ra các dạng khác nhau của alpha-synuclein (monome, oligome, khối kết tụ) trong các điều kiện bình thường và cả trong các điều kiện stress tế bào, sự tiết các dạng monome và các dạng kết tụ của alpha-synuclein là cao trong các điều kiện stress tế bào, và thông qua sự giải phóng alpha-synuclein này vào môi trường ngoại bào, các dạng có khả năng truyền bệnh của alpha-synuclein có thể được lan truyền giữa các neuron (Recasens and Dehay, Front Neuroanat (2014), 8: 159; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các ảnh hưởng của alpha-synuclein trong PD có thể mở rộng đến sự tổn hại trực tiếp đến các tế bào neuron dễ bị tổn thương. Giống như hầu hết các bệnh thoái hóa thần kinh, cũng quan sát thấy đáp ứng tế bào tiền viêm (Lee *et al.* J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Việc tuần hoàn alpha-synuclein và/hoặc tế bào hình sao đã được hoạt hóa có thể hoạt hóa vi tế bào thần kinh, dẫn đến làm tăng việc tạo ra loại oxy dễ phản ứng, sự sản xuất nitric oxit và xytokin, và còn làm trầm trọng thêm sự thoái hóa thần kinh (Lee *et al.* J Biol Chem (2010), 285: 9262-9272; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Nhiều mô hình thử nghiệm khác nhau đã chứng tỏ sự truyền từ tế bào sang tế bào của alpha-synuclein trong các tế bào đã được nuôi cấy, hoặc sự lan rộng và lan

truyền *in vivo* của bệnh lý alpha-synuclein. Bệnh lý thể Lewy đã được quan sát thấy trong mô ghép noron não giữa phôi hơn 10 năm sau khi mô ghép được cấy nhằm mục đích trị liệu vào thể vân của bệnh nhân PD. Cụ thể, các noron đã ghép chứa một số lượng các thể vùi giống như thể Lewy mà nhuộm màu dương tính đối với alpha-synuclein, cho thấy rằng đã xảy ra sự truyền bệnh lý alpha-synuclein ở vật chủ đối với mảnh ghép (Li *et al.* Nat Med (2008), 14(5): 501-3; và Kordower *et al.* Nat Med (2008), 14(5): 504-6; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Hơn nữa, các sợi nhỏ alpha-synuclein tái tổ hợp đã được tạo thành trước và alpha-synuclein oligome có thể được hấp thụ bởi các tế bào và noron đã được nuôi cấy, và sự chuyển trực tiếp alpha-synuclein từ tế bào thể cho đến tế bào thể nhận với sự tạo thành các thể vùi alpha-synuclein tương tự với bệnh lý Lewy đã được chứng tỏ (Danzer *et al.* J Neurosci (2007), 27(34): 9220-32; Volpicelli-Daley *et al.* Neuron (2011), 72(1): 57-71; và Luk *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A (2009), 106(47): 20051-6; mỗi trong số các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Việc tiêm các sợi nhỏ alpha-synuclein tổng hợp đã được tạo thành trước hoặc vật liệu chứa alpha-synuclein giống như thể Lewy được chiết từ não của các con chuột chuyển gen alpha-synuclein đã già vào não của các con chuột nhận không có triệu chứng bị bệnh sẽ xúc tiến sự tạo thành bệnh lý giống như thể Lewy trong các noron chủ của động vật nhận cùng với sự thoái hóa thần kinh và các thiếu hụt thần kinh (Luk *et al.* J Exp Med (2012), 209(5): 975-86; và Luk *et al.* Science (2012), 338(6109): 949-53; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các dịch chiết thể Lewy chứa alpha-synuclein tách riêng từ não PD được cấy vào liềm đen hoặc thể vân của khi đuôi ngắn và các con chuột được hấp thụ nhanh bởi các tế bào chủ (trong vòng 24 giờ) sau đó là sự tổn hao chậm hơn của các đầu tận gây tiết dopamin thể vân, với sự tổn hao tế bào rõ ràng sau hơn một năm (Recasens *et al.* Ann Neurol (2014), 75(3): 351-62; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Tương tự, việc cấy các con chuột với dịch đồng nhất não có nguồn gốc từ các bệnh nhân mắc bệnh lý synuclein DLB hoặc MSA sẽ kích hoạt bệnh lý alpha-synuclein giống như Lewy ở các con chuột chủ (Watts *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A (2013), 110(48): 19555-60; và Masuda-Suzukake *et al.* Brain (2013), 136(Pt 4): 1128-38; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Cuối cùng, việc chuyển và truyền cả alpha-

synuclein dạng monome lẫn oligome từ hành khứu giác đến các cấu trúc não nổi thông đã được chứng tỏ ở chuột (Rey *et al.* Acta Neuropathol (2013), 126(4): 555-73; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các phương pháp trị liệu miễn dịch thụ động bằng các kháng thể nhắm đích alpha-synuclein đã được thử nghiệm ở nhiều mô hình thử nghiệm ở chuột về bệnh lý alpha-synuclein tiền lâm sàng (Lawand *et al.* Expert Opin Ther Targets (2015): 1-10; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Cụ thể, nghiên cứu sử dụng kháng thể đơn dòng được hướng chống lại alpha-synuclein (9E4) đã cho thấy sự thanh thải *in vivo* của các khối kết tụ alpha-synuclein và bệnh lý học, các cải thiện vận động hành vi, và tác dụng bảo vệ thần kinh (WO 2014/058924; tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các nghiên cứu khác sử dụng sự tạo miễn dịch thụ động của các con chuột chuyển gen alpha-synuclein được phát triển làm các mô hình thử nghiệm về PD/DLB, bằng kháng thể đơn dòng 9E4 đã cho thấy kháng thể này đã loại bỏ bệnh lý alpha-synuclein, làm giảm các thiếu hụt synap và sợi trục, hủy bỏ sự tồn hao các sợi tyrosin hydroxylaza thể vân, và làm giảm đáng kể sự thiếu hụt trí nhớ và sự suy yếu chức năng vận động (Games *et al.* J Neurosci (2014), 34(28): 9441-54; Bae *et al.* J Neurosci (2012), 32(39): 13454-69; và Masliah *et al.* PLoS One (2011), 6(4): e19338; mỗi trong số các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Ngoài ra, đã chứng tỏ rằng việc sử dụng thụ động các kháng thể đơn dòng kháng alpha-synuclein ở chuột kiểu đại mà đã được tiêm trong thể vân bằng sợi nhỏ đã được tạo thành trước alpha-synuclein tổng hợp (pffs) dẫn đến sự giảm mạnh bệnh lý Lewy, ngăn chặn sự tồn hao neuron dopamin trong liềm đen, và cải thiện đáng kể sự suy yếu vận động dễ thấy ở mô hình thử nghiệm ở chuột sau khi điều trị bằng pffs (Tran *et al.* Cell Rep (2014), 7(6): 2054-65; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Ngoài ra, một trong số các thách thức chính có liên quan đến việc điều trị các rối loạn của CNS bằng trị liệu phân tử lớn, như các kháng thể, là việc đưa các thuốc này vào mô bị ảnh hưởng. Sự đi qua của các phân tử lớn vào não và tùy sống bị hạn chế nhiều bởi hàng rào máu não (BBB). BBB bảo vệ và điều hòa sự nội cân bằng của não và ngăn chặn sự đi qua tự do của các phân tử vào phần chủ yếu của não, nhờ đó giới hạn việc điều trị nhiều bệnh về não. Việc chuyển các phân tử thiết yếu như các

chất dinh dưỡng, yếu tố sinh trưởng, và các hormon đạt được thông qua chuỗi các chất vận chuyển và thụ thể đặc hiệu mà điều hòa sự đi qua các tế bào nội mô não. Sự phân phối các chất sinh học và các thuốc khác đến não do đó là một thách thức đáng kể. Ngoài ra, dường như tồn tại các cơ chế vận chuyển mà loại bỏ nhanh chóng các kháng thể khỏi não, có lẽ để ngăn ngừa đáp ứng viêm do sự gắn của Fc với các phối tử tác động ma xúc tiến đáp ứng tiền viêm.

Trong thập kỷ trước đây, đã có các báo cáo về sự vận chuyển kháng thể qua BBB trong đó sự liên kết với miền ngoại bào của các phân tử vận chuyển sẽ xúc tiến vận chuyển xuyên tế bào (transcytosis) của phức hợp thụ thể kháng thể qua lớp tế bào nội mô.

BBB chủ yếu bao gồm các tế bào nội mô mao mạch não, mà có các đặc tính chuyên biệt, như các mối nối chặt, để hạn chế sự vận chuyển của các phân tử vào não (Reese et al. 1967, J. Cell Biol. 34: 207-217; Brightman et al. 1969, J. Cell Biol. 40: 648-677; Rubin et al. 1999, Ann. Rev. Neurosci. 22: 11-28), mặc dù các loại tế bào khác, như tế bào quanh mao mạch, tế bào hình sao, và các tế bào neuron, cũng đóng vai trò quan trọng đối với chức năng của BBB. Thông thường, ít hơn 0,1% kháng thể được định liều ngoại vi đến được não (Boado et al. 2010, Mol. Pharm. 7: 237-244; Pepinsky et al. 2011, Nat. Neurosci. 8: 745-751). BBB thực hiện chức năng làm hàng rào vật lý, trao đổi chất và miễn dịch (Gaillard et al. 2003, Microvasc. Res. 65: 24-31).

Sự vận chuyển kháng thể qua BBB có thể được tăng cường bằng cách kích hoạt vận chuyển xuyên tế bào (transcytosis) qua trung gian thụ thể trên tế bào nội mô của não. Thông qua quy trình này, sự gắn các kháng nguyên trên phía khoang của tế bào nội mô có thể gây ra sự hấp thụ và chuyển động qua lại của kháng thể đi qua tế bào, và sau đó là sự giải phóng tiếp theo của nó vào mô.

Các trị liệu bằng thuốc hiện nay đối với PD chủ yếu tập trung vào việc điều trị các triệu chứng của bệnh liên quan đến vận động. Hiện nay không có trị liệu sẵn có hoặc có trên thị trường mà có thể điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh lý alpha-synuclein.

Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực kỹ thuật này đối với trị liệu để điều trị các bệnh lý alpha- synuclein, đặc biệt là ở người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập kháng alpha-synuclein của người. Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có một hoặc nhiều đặc tính chức năng của kháng thể aslo0452 ngl-3. Ví dụ:

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với vùng đầu tận C của α -synuclein của người. Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với vùng chứa khoảng axit amin 102 đến khoảng axit amin 130 của α -synuclein của người (ví dụ, SEQ ID NO: 1). Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với vùng chứa khoảng axit amin 120 đến khoảng axit amin 130 của α -synuclein của người (SEQ ID NO: 1) Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với epitop mà không giống như kháng thể được liên kết bởi kháng thể 9E4.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với α -synuclein của người nhưng không liên kết với β -synuclein của người hoặc γ -synuclein của người.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với α -synuclein của người, chuột cống và khi đầu chó.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với α -synuclein của người với ái lực cao. Theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế liên kết với alpha-synuclein với K_D ít hơn 500 picomol (pM), ít hơn 400 pM, ít hơn 300 pM, ít hơn 200 pM, ít hơn 150 pM, ít hơn 120 pM, ít hơn 110 pM hoặc 106 pM hoặc ít hơn như được xác định bằng cách sử dụng phân tích Octet chẳng hạn. Theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế liên kết với alpha-synuclein với K_D ít hơn 400 picomol (pM), ít hơn 300 pM, ít hơn 250 pM, ít hơn 200 pM, ít hơn 150 pM, ít hơn 120 pM, ít hơn 110 pM, ít hơn 100 pM, ít hơn 80 pM hoặc 74 pM hoặc ít hơn như được xác định bằng cách sử dụng phân tích KinExA chẳng hạn.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với α -synuclein nguyên thể nội sinh của người.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với dạng monome của α -synuclein của người.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với khối kết tụ của α -synuclein của người.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với các dạng bệnh lý, có liên quan đến bệnh của α -synuclein.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế làm giảm mức α -synuclein trong dịch mô não. Cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế làm giảm mức α -synuclein tự do chưa được liên kết trong dịch mô não.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế làm giảm mức α -synuclein trong dịch não tủy. Cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế làm giảm mức α -synuclein tự do chưa được liên kết trong dịch não tủy.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ " α -synuclein tự do chưa được liên kết" chỉ α -synuclein không được liên kết với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. α -synuclein tự do chưa được liên kết này có thể áp dụng cho α -synuclein ở dạng monome hoặc oligome của nó, hoặc ở dạng kết tụ. Các thuật ngữ này nhìn chung áp dụng cho dạng bệnh lý bất kỳ của α -synuclein.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm giảm sự lan rộng α -synuclein *in vivo*.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cạnh tranh với kháng thể aslo0452 ngl-3 để liên kết với α -synuclein của người.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế liên kết với cùng epitop trên α -synuclein của người như kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có nguồn gốc từ kháng thể asyn0087 chứa vùng chuỗi nặng biến đổi (VH)

của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của trình tự axit amin SEQ ID NO: 3, như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có nguồn gốc từ kháng thể asyn0087, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này có K_D ít hơn 500 mM và liên kết với cùng epitop như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể asyn0087, aslo0452 ngl-3 và aslo0543, được mô tả trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “H-CDR” biểu thị vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) trên vùng chuỗi nặng, và “L-CDR” biểu thị vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) trên vùng chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa ít nhất một CDR được chọn từ:

- (i) H-CDR1 của SEQ ID NO: 5,
- (ii) H-CDR2 của SEQ ID NO: 6,
- (iii) H-CDR3 của SEQ ID NO: 7,
- (iv) L-CDR1 của SEQ ID NO: 9,
- (v) L-CDR2 của SEQ ID NO: 10,
- (vi) L-CDR3 của SEQ ID NO: 11.

Theo phương án khác, CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của SEQ ID NO: 16 của chuỗi nặng của kháng thể aslo0452 ngl-3; và/hoặc CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của SEQ ID NO: 21 của chuỗi nhẹ của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm hoặc tất cả các CDR được chọn từ CDR của kháng thể aslo0452 ngl-3, tức là ít nhất một CDR được chọn từ bất kỳ trong số SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 21.

Theo một phương án, CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể aslo0452 ngl-3; và/hoặc CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo một phương án, CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo một phương án, CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo một phương án, CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể aslo0452 ngl-3 và CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có sáu CDR của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Do đó, theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa:

- a) ba CDR chuỗi nặng có trình tự:
 - (i) H-CDR1 của SEQ ID NO: 5,
 - (ii) H-CDR2 của SEQ ID NO: 15; và
 - (iii) H-CDR3 của SEQ ID NO: 16, và
- b) ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự:
 - (i) L-CDR1 của SEQ ID NO: 20,
 - (ii) L-CDR2 của SEQ ID NO: 10, và
 - (iii) L-CDR3 của SEQ ID NO: 21.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa miền nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 13 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 18.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa miền nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 19.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa miền nặng biến đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 8.

Theo phương án cụ thể khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 4 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 8, và liên kết với α -synuclein của người với K_D ít hơn 500 pM và liên kết với cùng epitop như asyn0087, aslo0452 ngl-3 hoặc aslo0543.

Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 19.

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 19.

Theo phương án khác, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và

chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 19 và còn chứa:

- a) ba CDR chuỗi nặng có trình tự:
 - (i) H-CDR1 của SEQ ID NO: 5,
 - (ii) H-CDR2 của SEQ ID NO: 15; và
 - (iii) H-CDR3 của SEQ ID NO: 16, và
- b) ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự:
 - (i) L-CDR1 của SEQ ID NO: 20,
 - (ii) L-CDR2 của SEQ ID NO: 10; và
 - (iii) L-CDR3 của SEQ ID NO: 21.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền nặng biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 13 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 18.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền nặng biến đổi có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 19.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 12 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 17.

Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 30.

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 30.

Theo phương án khác, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 30 và còn chứa:

- c) ba CDR chuỗi nặng có trình tự:
 - (iv) H-CDR1 của SEQ ID NO: 25,
 - (v) H-CDR2 của SEQ ID NO: 26; và
 - (vi) H-CDR3 của SEQ ID NO: 27, và
- d) ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự:
 - (iv) L-CDR1 của SEQ ID NO: 31,
 - (v) L-CDR2 của SEQ ID NO: 32; và
 - (vi) L-CDR3 của SEQ ID NO: 33.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền nặng biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 30.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền nặng biến đổi có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 30.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 22 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 28.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây là kháng thể IgA, IgD, IgE, IgM, IgG như IgG1, IgG2, IgG3, hoặc IgG4 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có vùng Fc cải biến. Các cải biến thích hợp là đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm, không kể những cải biến khác, các cải biến để làm tăng hoặc giảm chu kỳ bán hủy, cắt bỏ, làm giảm hoặc

tăng cường chức năng tác động, tạo ra xystein được thể bằng các thiol tự do để liên hợp. Ví dụ về các cái biến này là YTE để làm tăng chu kỳ bán hủy và/hoặc TM để làm giảm chức năng tác động. Theo một số phương án, bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này chứa các đột biến M252Y/S254T/T256E (YTE) trong vùng Fc của kháng thể (Dall'Acqua et al., 2006, J. Biol. Chem, 281:23514-23524). Theo một số phương án, bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này chứa đột biến bộ ba (được viết tắt trong bản mô tả này là "TM") trong vùng Fc tương ứng với đột biến L234F/L235E/P331S được bộc lộ trong Oganessian *et al.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, (2008) 64: 700–704. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể là kháng thể IgG1 TM hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể chứa vùng Fc có đột biến YTE.

Theo phương án khác, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được liên hợp với gốc vận chuyển qua hàng rào máu não (BBB), trong đó gốc vận chuyển qua BBB có khả năng vận chuyển kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, qua BBB.

Theo một phương án, gốc vận chuyển qua BBB có thể là kháng thể. Theo một phương án, kháng thể qua BBB có thể tạo thành cấu trúc đa đặc hiệu với kháng thể kháng α -syncuclein hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Gốc vận chuyển qua BBB có thể chứa quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng biến đổi của globulin miễn dịch -1 (VH-CDR1), vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng biến đổi của globulin miễn dịch -2 (VH-CDR2), vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng biến đổi của globulin miễn dịch -3 (VH-CDR3), vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ biến đổi của globulin miễn dịch -1 (VL-CDR1), vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ biến đổi của globulin miễn dịch -2 (VL-CDR2), và vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nhẹ biến đổi của globulin miễn dịch -3 (VL-CDR3); trong đó VH-CDR1 chứa SEQ ID NO. 40 hoặc 49, VH-CDR2 chứa SEQ ID NO. 41 hoặc 50, VH-CDR3 chứa SEQ ID NO. 42 hoặc 51, VL-CDR1 chứa SEQ ID NO. 36, 44 hoặc 53, VL-CDR2 chứa SEQ ID NO. 37, 45 hoặc 54 và VL-CDR3 chứa SEQ ID NO. 38, 46 hoặc 55.

Theo một số phương án, gốc vận chuyển chứa vùng chuỗi nặng biến đổi của globulin miễn dịch (VH) chứa SEQ ID NO: 47 hoặc SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, gốc vận chuyển chứa vùng chuỗi nhẹ biến đổi của globulin miễn dịch (VL) chứa SEQ ID NO: 43.

Ngoài ra, gốc vận chuyển có thể được chọn từ kháng thể đầy đủ, mảnh Fv, mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')₂, mảnh (dsFv) được liên kết disulfua, mảnh Fv chuỗi đơn (scFV), mảnh sc(Fv)₂, kháng thể thể đôi (diabody), kháng thể thể ba (triabody), kháng thể thể bốn (tetrabody), kháng thể minibody, và kháng thể chuỗi đơn. Theo phương án cụ thể, gốc vận chuyển chứa mảnh scFV chứa miền VH và miền VL được dung hợp cùng nhau thông qua cầu nối. Trong một số trường hợp, cầu nối có thể là (Gly4Ser)ⁿ (SEQ ID NO: 56), trong đó n là số nguyên dương được chọn từ nhóm bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10.

Theo một số phương án, phân tử vận chuyển bất kỳ theo sáng chế có thể được kết hợp như được mô tả trong bản mô tả này với phân tử liên kết alpha-synuclein bất kỳ theo sáng chế để tạo ra phân tử liên kết đa đặc hiệu theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây, để sử dụng làm thuốc.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh lý α -synuclein.

Theo một phương án, bệnh lý α -synuclein được chọn từ bệnh Parkinson (PD), bệnh sa sút trí tuệ với thể Lewy (DLB), và chứng teo đa hệ thống (MSA).

Theo một phương án, bệnh lý α -synuclein là bệnh Parkinson (PD).

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh, cụ thể bệnh có liên quan đến hệ thần kinh trung ương, ở bệnh nhân, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây.

Theo một phương án, bệnh nêu trên là bệnh lý α -synuclein.

Theo một phương án, bệnh lý α -synuclein được chọn từ bệnh Parkinson (PD), bệnh sa sút trí tuệ với thể Lewy (DLB), và chứng teo đa hệ thống (MSA).

Theo một phương án, bệnh lý α -synuclein là bệnh Parkinson (PD).

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây, và tá được được dụng.

Cụm từ “tá được được dụng” bao gồm bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất kháng khuẩn và chất kháng nấm, chất đẳng trương, và chất làm chậm sự hấp thụ, và các chất tương tự, mà tương thích với việc sử dụng được phẩm. Việc sử dụng các môi trường và chất như vậy cho các chất có hoạt tính về mặt được học là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chế phẩm cũng có thể chứa các hợp chất có hoạt tính khác tạo ra các chức năng trị liệu bổ trợ, bổ sung, hoặc tăng cường. Được phẩm cũng có thể được bao gồm trong đồ chứa, gói, hoặc dụng cụ phân phối cùng với hướng dẫn sử dụng.

Được phẩm theo sáng chế được phối chế để tương thích với đường dùng dự định của nó. Phương pháp thực hiện việc sử dụng này là đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Việc sử dụng có thể, ví dụ, là trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong cơ, trong khoang, dưới da hoặc qua da.

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập chứa SEQ ID NO: 13 và/hoặc SEQ ID NO: 18.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập chứa SEQ ID NO: 23 và/hoặc SEQ ID NO: 29.

Ngay khi được cung cấp thông tin này, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng thu được phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể đã được bộc lộ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Axit nucleic có thể chứa ADN hoặc ARN và có thể là dạng tổng hợp hoặc tái tổ hợp một phần hoặc hoàn toàn. Viện dẫn đến trình tự nucleotit bao gồm phân tử ADN với trình tự đã nêu rõ, và bao gồm phân tử ARN với trình tự đã nêu rõ trong đó U được thay thế cho T, trừ khi có quy định khác.

Các phân tử axit nucleic theo sáng chế chứa trình tự ghi mã cho CDR, miền VH, và/hoặc miền VL được bộc lộ trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề xuất cấu trúc ở dạng plasmid, vector, phagemid, catxet phiên mã hoặc catxet biểu hiện chứa ít nhất một phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây, cụ thể mã hóa CDR, miền VH, và/hoặc miền VL được bộc lộ trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa một hoặc nhiều cấu trúc như nêu trên đây.

Sáng chế cũng đề xuất axit nucleic mã hóa bất kỳ một hoặc nhiều miền CDR (H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, hoặc L-CDR3), VH hoặc VL được bộc lộ trong bản mô tả này, cũng như phương pháp tạo ra sản phẩm đã được mã hóa. Phương pháp này bao gồm biểu hiện sản phẩm đã được mã hóa từ axit nucleic mã hóa. Việc biểu hiện có thể đạt được bằng cách nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp tế bào chủ tái tổ hợp chứa axit nucleic này. Sau khi sản xuất bằng cách biểu hiện miền VH hoặc VL, hoặc thành viên liên kết đặc hiệu có thể được tách riêng và/hoặc tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, sau đó được sử dụng khi thích hợp.

Các mảnh liên kết kháng nguyên, miền VH và/hoặc VL và phân tử axit nucleic mã hóa và vector có thể được tách riêng và/hoặc được tinh chế từ môi trường tự nhiên của chúng, ở dạng gần như tinh khiết hoặc đồng nhất, hoặc, trong trường hợp của axit nucleic, không có hoặc gần như không có axit nucleic hoặc gen có nguồn gốc khác với trình tự mã hóa polypeptit với chức năng yêu cầu.

Hệ để tách dòng và biểu hiện polypeptit trong nhiều tế bào chủ khác nhau là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đối với các tế bào thích hợp để sản xuất kháng thể, xem Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999. Nói một cách ngắn gọn, tế bào chủ thích hợp bao gồm vi khuẩn, tế bào thực vật, tế bào động vật có vú, và hệ nấm men và baculovirus. Dòng tế bào động vật có vú có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật này để biểu hiện polypeptit khác loại bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Hoa, tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng con, tế bào u tủy của chuột NS0, và nhiều các tế bào khác. Tế bào chủ vi khuẩn thông thường là *E. coli*. Hệ biểu hiện protein bất kỳ tương thích với sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể

đã được bộc lộ. Hệ biểu hiện thích hợp bao gồm động vật chuyển gen được mô tả trong Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999.

Các vectơ thích hợp có thể được chọn hoặc được tạo cấu trúc, để cho chúng chứa trình tự điều hòa thích hợp, bao gồm trình tự gen khởi đầu, trình tự gen kết thúc, trình tự polyadenyl hóa, trình tự gen tăng cường, gen đánh dấu và các trình tự khác khi thích hợp. Vectơ có thể là plasmit hoặc virus, ví dụ, thể thực khuẩn, hoặc phagemid, khi thích hợp. Chi tiết xem, ví dụ, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Nhiều kỹ thuật và protocol đã biết để thao tác axit nucleic, ví dụ, trong việc điều chế cấu trúc axit nucleic, phát sinh đột biến, giải trình tự, đưa ADN vào tế bào và biểu hiện gen, và phân tích protein, được mô tả chi tiết trong Current Protocols in Molecular Biology, 2nd Edition, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic như được bộc lộ ở đây, cụ thể là vectơ chứa phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được xác định trong phần bất kỳ trên đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm đưa axit nucleic như vậy vào tế bào chủ. Việc đưa vào có thể sử dụng kỹ thuật có sẵn bất kỳ. Đối với tế bào có nhân điển hình, các kỹ thuật thích hợp có thể bao gồm chuyển nhiễm canxi phosphat, DEAE-Dextran, đục lỗ điện, chuyển nhiễm qua trung gian liposom và tải nạp sử dụng retrovirus hoặc virus khác, ví dụ, vaccinia hoặc, đối với tế bào côn trùng, baculovirus. Đối với tế bào vi khuẩn, các kỹ thuật thích hợp có thể bao gồm biến nạp canxi clorua, đục lỗ điện và chuyển nhiễm sử dụng thể thực khuẩn. Việc đưa axit nucleic vào tế bào có thể được theo dõi bằng cách gây ra hoặc cho phép biểu hiện từ axit nucleic này, ví dụ, bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện để biểu hiện gen.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế bây giờ sẽ được mô tả chi tiết hơn dựa vào các hình vẽ và Danh mục trình tự đính kèm, trong đó được thể hiện:

Các SEQ ID NO quan trọng:

Tên	Mô tả	SEQ NO:	ID
alpha synuclein của người	trình tự axit amin	1	
asyn0087	trình tự axit amin VH	2	
	trình tự axit amin VL	3	
Trình tự chung của kháng thể có nguồn gốc từ asyn0087	trình tự axit amin VH	4	
	trình tự axit amin H-CDR1	5	
	trình tự axit amin H-CDR2	6	
	trình tự axit amin H-CDR3	7	
	trình tự axit amin VL	8	
	trình tự axit amin L-CDR1	9	
	trình tự axit amin L-CDR2	10	
	trình tự axit amin L-CDR3	11	
aslo0452 ngl-3	trình tự axit amin chuỗi nặng	12	
	trình tự nucleotit VH	13	
	trình tự axit amin VH	14	
	trình tự axit amin H-CDR1	5	
	trình tự axit amin H-CDR2	15	
	trình tự axit amin H-CDR3	16	
	trình tự axit amin chuỗi nhẹ	17	
	trình tự nucleotit VL	18	
	trình tự axit amin VL	19	
	trình tự axit amin L-CDR1	20	
	trình tự axit amin L-CDR2	10	
	trình tự axit amin L-CDR3	21	
aslo0543	trình tự axit amin chuỗi nặng	22	
	trình tự nucleotit VH	23	
	trình tự axit amin VH	24	
	trình tự axit amin H-CDR1	25	
	trình tự axit amin H-CDR2	26	
	trình tự axit amin H-CDR3	27	
	trình tự axit amin chuỗi nhẹ	28	
	trình tự nucleotit VL	29	
	trình tự axit amin VL	30	
	trình tự axit amin L-CDR1	31	
	trình tự axit amin L-CDR2	32	
	trình tự axit amin L-CDR3	33	
Chất vận chuyển qua BBB chung	trình tự axit amin VH	34	
	trình tự axit amin VL	35	
	trình tự axit amin L-CDR1	36	
	trình tự axit amin L-CDR2	37	
	trình tự axit amin L-CDR3	38	

BBBt0626gl	trình tự axit amin VH	39
	trình tự axit amin H-CDR1	40
	trình tự axit amin H-CDR2	41
	trình tự axit amin H-CDR3	42
	trình tự axit amin VL	43
	trình tự axit amin L-CDR1	44
	trình tự axit amin L-CDR2	45
	trình tự axit amin L-CDR3	46
BBBt0626	trình tự axit amin VH	47
	trình tự axit amin H-CDR1	40
	trình tự axit amin H-CDR2	41
	trình tự axit amin H-CDR3	42
	trình tự axit amin VL	43
	trình tự axit amin L-CDR1	44
	trình tự axit amin L-CDR2	45
	trình tự axit amin L-CDR3	46
BBBt0632gl	trình tự axit amin VH	48
	trình tự axit amin H-CDR1	49
	trình tự axit amin H-CDR2	50
	trình tự axit amin H-CDR3	51
	trình tự axit amin VL	52
	trình tự axit amin L-CDR1	52
	trình tự axit amin L-CDR2	54
	trình tự axit amin L-CDR3	55

Chú thích hình vẽ:

Bảng 1: Xác định ái lực của các kháng thể kháng α -synuclein quan trọng đối với α -syn của người được thực hiện trên hai nền xác định ái lực.

Fig. 1: Sơ đồ của thử nghiệm HTRF®.

Fig. 2: So sánh trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng asyn0087, aslo0452ngl-3 và aslo0543 (VH) (SEQ ID NO: 2, 14 và 24, một cách tương ứng) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) (SEQ ID NO: 3, 19, và 30, một cách tương ứng). Các axit amin gạch chân tương ứng với CDR.

Fig. 3A-3D: Trình tự nucleotit và trình tự axit amin của aslo0452 ngi-3. Fig. 3A và 3B thể hiện trình tự nucleotit và axit amin của chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi, một cách tương ứng, của aslo0452 ngi-3. Fig. 3A bộc lộ SEQ ID No: 13 và 14, một cách tương ứng, theo thứ tự xuất hiện. Fig. 3B bộc lộ SEQ ID No: 18 và 19,

một cách tương ứng, theo thứ tự xuất hiện. Fig. 3C và 3D thể hiện sự sắp hàng của các trình tự này đối với trình tự dòng mầm của người gần gũi nhất. Fig. 3C thể hiện sự sắp hàng của trình tự axit amin miền chuỗi nặng biến đổi aslo0452 ngl-3 (SEQ ID NO: 14) đối với trình tự dòng mầm IGHV3-23 (SEQ ID NO: 58) và JH6 (SEQ ID NO: 59). Fig. 3D thể hiện sự sắp hàng của trình tự axit amin miền chuỗi nhẹ biến đổi aslo0452 ngl-3 (SEQ ID NO: 19) đối với trình tự dòng mầm IGLV5-45 (SEQ ID NO: 60) và JL2 (SEQ ID NO: 61), 3. Các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) được gạch chân và đánh dấu. Sự khác biệt so với dòng mầm được đánh dấu bằng in đậm và đường viền. Tất cả các gốc không phải Vernier trong vùng khung chuỗi nhẹ là axit amin dòng mầm của người. Các gốc Vernier (*) không được thay đổi để phù hợp với các axit amin dòng mầm.

Fig. 4A và 4B: Sự liên kết epitop của các dòng vô tính thể phân lập chính sử dụng panen của các dạng cắt cụt α -syn. Các lỗ ELISA được phủ bằng một dãy các dạng cắt cụt α -syn có sẵn trên thị trường biểu thị các vùng xác định khác nhau của protein này: 1-140: α -syn chiều dài đầy đủ, 1-60: chỉ có vùng đầu tận N, 61-140: thành phần không phải amyloid của màng (NAC) cộng với vùng đầu tận C, 1-95: vùng đầu tận N và NAC, 96-140: chỉ có vùng đầu tận C, Δ NAC: vùng NAC được làm khuyết, NCAP: là dạng được ghép nối theo cách khác của α -syn mất axit amin 103-129 (rPeptide). Các kháng thể sơ cấp được sử dụng để phát hiện là (Fig. 4A) Asyn087; và (Fig. 4B) Aslo0452 ngl-3 (thanh màu đen), aslo0543 (thanh màu xám nhạt) và đối chứng được làm phù hợp isotyp NIP228 (thanh màu xám đậm). Liên kết được phát hiện bằng kháng thể thứ cấp kháng IgG Eu³⁺ của người (Fig. 4A) hoặc kháng thể thứ cấp kháng IgG-HRP của người (Fig. 4B).

Fig. 5: Tính đặc hiệu của aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đối với α -syn so với các thành viên họ synuclein sử dụng thử nghiệm cạnh tranh epitop DELFIA. Sử dụng thử nghiệm HTRF cạnh tranh epitop, tính đặc hiệu của các dòng vô tính aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đã được tối ưu hóa ái lực đối với α -syn được xác định bằng cách chuẩn độ α -syn, β -syn và γ -syn không được đánh dấu. Từ thử nghiệm này, giá trị IC₅₀ được xác định.

Fig. 6: Tính đặc hiệu của aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đối với α -syn của người, khi đầu chó và chuột cống sử dụng thử nghiệm cạnh tranh epitop HTRF. Sử dụng thử

thử nghiệm HTRF cạnh tranh epitop, protein tính phản ứng chéo giữa các loại của các dòng vô tính được tối ưu hóa ái lực được xác định trong thử nghiệm tương tự bằng cách chuẩn độ α -syn không được đánh dấu và đạo hàm giá trị IC_{50} đối với mỗi loại α -syn.

Fig. 7A và 7B: Kết quả đo bào chế chảy tiêu biểu chứng tỏ rằng các dòng vô tính được tối ưu hóa ái lực liên kết với α -syn nguyên thể của người trong dòng tế bào u nguyên bào thần kinh của người.

Các panen A, C, E và G của Fig. 7A và 7B thể hiện sự liên kết với dòng tế bào ung thư vú của người âm tính với α -syn, BT20. Các panen B, D, F và H của Fig. 7A và 7B thể hiện sự liên kết với dòng tế bào u nguyên bào thần kinh của người dương tính với α -syn, SHSY5Y. Fig. 7A: Các kháng thể sơ cấp của người được sử dụng trong nghiên cứu này là asyn0087 và đối chứng Hu IgG. Sự liên kết của kháng thể của người được phát hiện bằng cách sử dụng kháng IgG-FITC thứ cấp của người (Jackson). Fig. 7B: Các kháng thể sơ cấp của người được sử dụng trong nghiên cứu này là aslo0452 ngl-3, aslo0543, và đối chứng IgG1 TM được làm phù hợp isotyp NIP228. Sự liên kết của kháng thể của người được phát hiện bằng cách sử dụng kháng IgG-FITC thứ cấp của người (Jackson). Kháng thể sơ cấp của chuột được sử dụng là 4D6 (Covance), và đối chứng âm được làm phù hợp isotyp (R&D Systems). Sự liên kết của kháng thể của chuột nhất được phát hiện bằng cách sử dụng kháng IgG-FITC thứ cấp của chuột nhất (Sigma).

Fig. 8: Tính đặc hiệu của các IgG kháng α -syn được làm tối ưu hóa đối với α -syn đã được kết tụ của người nhờ DELFIA ELISA. Đồ thị cho thấy rằng aslo0452 ngl-3 và aslo0543, hai dòng vô tính đặc hiệu α -syn có ái lực cao, và kháng thể chính asyn0087 phát hiện được các dạng kết tụ đã được bắt giữ của α -syn (thanh màu đen) nhưng không phát hiện được α -syn dạng monome đã được bắt giữ.

Fig. 9A-9C: Tính đặc hiệu của các dòng vô tính được tối ưu hóa ái lực trong các mô có liên quan đến bệnh nhờ kỹ thuật hóa mô miễn dịch. Fig. 9A, 9B và 9C thể hiện sự nhuộm màu với aslo0452 ngl-3, asyn0087 và aslo0543, một cách tương ứng. Các panen A, B và C cho thấy aslo0452 ngl-3 nhuộm màu cả thể Lewy (Các panen A và B) và sợi trục Lewy (Panen C) của liềm đen trong mô não PD. Panen D cho thấy aslo0452 ngl-3 thể hiện sự nhuộm màu mức thấp của α -syn trong các tế bào từ vỏ não thái dương trong lát cắt não bình thường. Các panen E, F, và G cho thấy aslo0452 ngl-

3 nhuộm màu thể Lewy, sợi trục Lewy và chấm Lewy của hạch nhân trong mô não PD. Panen H cho thấy kháng thể đối chứng được làm phù hợp isotyp chứng tỏ không có sự nhuộm màu trong hạch nhân trong mô não PD. Các panen I đến M cho thấy sự nhuộm màu asyn0087 của nhân lục trong mô não PD; các đặc điểm bệnh lý được nhận diện là thể Lewy (Panen I và L), khối kết tụ neuron (Panen J), sợi trục Lewy (Panen K), và thể Pale (Panen M). Các panen N và O cho thấy aslo0543 nhuộm màu thể Lewy và sợi trục Lewy trong liềm đen trong mô não PD. Panen P thể hiện sự nhuộm màu mức thấp aslo0543 của α -syn trong các tế bào từ vỏ não thái dương trong lát cắt não bình thường.

Fig. 10A và 10B: Việc sử dụng aslo0452 ngl-3 toàn thân làm giảm nhanh chóng mức asyn tự do trong vỏ não trước trán của chuột cống. Giá trị trung bình $\pm$ SEM nồng độ α -synuclein tự do tuyệt đối (Fig. 10A) hoặc tương đối (Fig. 10B) trong ISF của các con chuột cống được điều trị bằng aslo0452 ngl-3 (30 mg/kg trong tĩnh mạch; ký hiệu đóng kín) hoặc chất dẫn thuốc (ký hiệu mở).

Fig. 11A và 11B: Aslo0452 ngl-3 làm giảm theo cách phụ thuộc liều lượng và thời gian mức asyn tự do trong CSF của chuột cống khi sử dụng toàn thân. Giá trị trung bình $\pm$ SEM nồng độ α -synuclein tự do tuyệt đối (Fig. 11A) hoặc tương đối (Fig. 11B) trong CSF của các con chuột cống được điều trị bằng aslo0452 ngl-3 (3, 10, 30, 100 mg/kg trong tĩnh mạch; ký hiệu đóng kín) hoặc chất dẫn thuốc (ký hiệu mở).

Fig. 12A-12C: các kháng thể kháng alpha-synuclein aslo0452 ngl-3 và aslo0452 ngl-3-D265A phong bế sự lan rộng alpha-synuclein cùng bên đến đối bên. (Fig. 12A): các con chuột không phải tg đã được tiêm LV- α -syn vào vùng hải mã phải (mũi tên màu đen) được gây miễn dịch thụ động bằng liều hằng tuần của kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp NIP228, trong 13 tuần, sau đó là xác định sự lan rộng alpha-synuclein bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. (Fig. 12B): Định lượng số liệu tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein thu được từ phân tích hóa tế bào miễn dịch của lát cắt vành hải mã cùng bên được biểu thị trong A. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post. (Fig. 12C): Định lượng số liệu tính phản ứng miễn

dịch alpha-synuclein thu được từ phân tích hóa tế bào miễn dịch của lát cắt vành hải mã đối bên được biểu thị trong panel A. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post.

Fig. 13A-13C: các kháng thể kháng alpha-synuclein aslo0452 ngl-3 và aslo0452 ngl-3-D265A làm giảm sự lắng đọng và sự phân tán của alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus dọc theo sợi trục. (Fig. 13A): các con chuột không phải tg đã được tiêm LV- α -syn vào vùng hải mã phải được gây miễn dịch thụ động bằng liều hằng tuần của kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp NIP228, trong 13 tuần, sau đó là phân tích hóa tế bào miễn dịch sự lắng đọng alpha-synuclein dọc theo sợi trục xuyên hải mã cùng bên và đối bên (mũi tên màu đen). (Fig. 13B): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein sợi trục cùng bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post. (Fig. 13C): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein sợi trục đối bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post.

Fig. 14A-14C: các kháng thể kháng alpha-synuclein aslo0452 ngl-3 và aslo0452 ngl-3-D265A làm giảm sự lắng đọng alpha-synuclein trong neuron hải mã CA1 và neuron vỏ não mới lớp 5. (Fig. 14A): Các con chuột không phải tg đã được tiêm LV- α -syn vào vùng hải mã phải được gây miễn dịch thụ động bằng liều hằng tuần của kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp NIP228, trong 13 tuần, sau đó là phân tích hóa tế bào miễn dịch sự lắng đọng alpha-synuclein trong neuron hải mã CA1 cùng bên và neuron vỏ não mới lớp 5 cùng bên (mũi tên màu đen). (Fig. 14B): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein trong neuron vỏ não mới lớp 5 cùng bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Số liệu được thể hiện đại diện cho số lượng tế bào (neuron) dương tính với alpha-synuclein cho

mỗi 0,1 mm vuông. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post. (Fig. 14C): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein trong neuron hải mã CA1 cùng bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Số liệu thể hiện đại diện cho số lượng tế bào dương tính với alpha-synuclein (neuron) cho mỗi 0,1 mm vuông. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post.

Fig. 15A-15C: các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0452 ngl-3-D265A phong bế sự lan rộng alpha-synuclein ở các con chuột chuyển gen alpha-synuclein. (Fig. 15A): các con chuột a-syn tg đã được tiêm LV- α -syn vào vùng hải mã phải (mũi tên màu đen) được gây miễn dịch thụ động bằng liều hằng tuần của kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp NIP228, trong 13 tuần, sau đó là xác định sự lan rộng alpha-synuclein bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. (Fig. 15B): Định lượng số liệu tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein thu được từ phân tích hóa tế bào miễn dịch của lát cắt vành hải mã cùng bên được biểu thị trong panen A. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post. (Fig. 15C): Định lượng số liệu tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein thu được từ phân tích hóa tế bào miễn dịch của lát cắt vành hải mã đối bên được biểu thị trong panen A. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post.

Fig. 16A-16C: các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0452 ngl-3-D265A làm giảm sự lắng đọng và sự phân tán của alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirut dọc theo sợi trục ở chuột chuyển gen. (Fig. 16A): các con chuột a-syn tg được tiêm LV- α -syn vào vùng hải mã phải được gây miễn dịch thụ động bằng liều hằng tuần của kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp NIP228, trong 13 tuần, sau đó là phân tích hóa tế bào miễn dịch sự lắng đọng alpha-synuclein dọc theo

sợi trục xuyên hải mã cùng bên và đối bên (mũi tên màu đen). (Fig. 16B): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein sợi trục cùng bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). $*P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post. (Fig. 16C): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein sợi trục đối bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). $*P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post.

Fig. 17A-17D: các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0452 ngl-3-D265A làm giảm sự lắng đọng alpha-synuclein trong noron hải mã CA1 và noron vỏ não mới lớp 5 ở các con chuột chuyển gen alpha-synuclein. (Fig. 17A): các con chuột a-syn tg được tiêm LV- α -syn vào vùng hải mã phải được gây miễn dịch thụ động bằng liều hằng tuần của kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein: aslo0452 ngl-3, aslo0452 ngl-3 D265A, 9E4, hoặc bằng kháng thể đối chứng isotyp NIP228, trong 13 tuần, sau đó là phân tích hóa tế bào miễn dịch sự lắng đọng alpha-synuclein trong noron hải mã CA1 cùng bên và noron vỏ não mới lớp 5 cùng bên (mũi tên màu đen). (Fig. 17B): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein trong noron vỏ não mới lớp 5 cùng bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Số liệu được thể hiện đại diện cho số lượng tế bào (noron) dương tính với alpha-synuclein cho mỗi 0,1 mm vuông. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). $*P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post. (Fig. 17C): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein trong noron hải mã CA1 cùng bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Số liệu được thể hiện đại diện cho số lượng tế bào (noron) dương tính với alpha-synuclein cho mỗi 0,1 mm vuông. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). $*P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post. (Fig. 17D): Định lượng sự lắng đọng alpha-synuclein trong noron hải mã CA1 đối bên được xác định bằng hóa tế bào miễn dịch với SYN-1 và phân tích hình ảnh tự động. Số liệu được thể hiện đại diện cho số

lượng tế bào (nơon) dương tính với alpha-synuclein cho mỗi 0,1 mm vuông. Mỗi cột là giá trị trung bình $\pm$ SEM của 10 điều trị kháng thể độc lập ($n=10$ con chuột cho mỗi nhóm điều trị bằng kháng thể). * $P<0,05$ so với NIP228; ANOVA 1 chiều với kiểm định Dunnett's post.

Fig. 18 Sự cạnh tranh epitop của aslo452-ngl3-hIgG1TM với BBBt0626gl-ScFv-Bs2-aslo452-ngl-3-hIgG1TM chứng tỏ trong thử nghiệm HTRF rằng việc kết hợp gốc BBB không làm thay đổi tính đặc hiệu liên kết của aslo452-ngl3-hIgG1TM. Kháng thể kháng alpha-synuclein được đánh dấu bằng Dylight650, aslo452ngl3-hIgG1TM liên kết với alpha synuclein đã được biotin hóa mà đến lượt mình được liên kết với streptavidin được đánh dấu bằng cyrptat. Sau khi kích thích cyrptat, sự truyền năng lượng (FRET) xảy ra và khi trong sự có mặt của aslo452ngl3-hIgG1TM được đánh dấu bằng dylight650, dylight650 bị kích thích và tạo ra huỳnh quang. Nếu IgG cạnh tranh có mặt thì sự liên kết của aslo452 được đánh dấu bằng dylight650 bị phong bế và sự kích thích của aslo452 được đánh dấu bằng dylight650 bị ngăn chặn, dẫn đến sự giảm tín hiệu huỳnh quang. aslo452 không được đánh dấu và Bbbt0626-Bs2-aslo452 hIgG1TM cả hai đều có khả năng cạnh tranh ở mức độ tương tự nhau với aslo452-ngl3-hIgG1TM được đánh dấu bằng dylight650.

Fig. 19 Sự liên kết với tế bào nội mô não chuột nhắt của BBBt0626gl-BS2-aslo452-ngl-3-hIgG1TM chứng tỏ sự gắn đích hiệu quả của gốc BBB khi được liên hợp với aslo452-ngl3-hIgG1TM. FMAT (Công nghệ thử nghiệm vi thể tích huỳnh quang - Fluorescence Micro-volume Assay Technology) hoặc công nghệ thử nghiệm bóng Mirror cả hai đều đã được sử dụng để xác định sự liên kết đặc hiệu của các kháng thể với tế bào nội mô não. Thử nghiệm này xác định sự liên kết của IgG của người với tế bào nội mô não chuột nhắt (b.End3). Tế bào B.End3 được liên kết một cách tương tự bởi Bbbt0626 hIgG1TM, Bbbt0626glscFv-Bs2-aslo452-hIgG1TM và Bbbt0626glscFv-Bs2-NIP228 hIgG1TM, nhưng không được liên kết bởi kháng thể đối chứng NIP228 hIgG1TM. Sự liên kết này được phát hiện bằng kháng Fc mAb của chuột nhắt (đặc hiệu với người) mà đến lượt mình được phát hiện bằng kháng thể kháng Fc chuột nhắt ở dê được đánh dấu bằng Alexafluor647.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế dựa trên phát hiện bất ngờ và đáng ngạc nhiên về các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543. Phát hiện này đã dẫn đến nhóm kháng thể mới có các đặc tính chung bởi các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543, cũng như nhóm phụ của các kháng thể có các đặc tính của aslo0452 ngl-3 và aslo0543, một cách tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có nguồn gốc từ kháng thể asyn0087 chứa vùng chuỗi nặng biến đổi (VH) của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2 và vùng chuỗi nhẹ biến đổi (VL) của trình tự axit amin SEQ ID NO: 3, như được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có nguồn gốc từ kháng thể asyn0087, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này có K_D ít hơn 500 nM và liên kết với cùng epitop như kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể asyn0087, aslo0452ngl-3 và aslo0543, được mô tả trong bản mô tả này.

Giống như asyn0087, các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với vùng đầu tận C (các gốc 96-140) của α -synuclein của người. Cụ thể hơn, các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với vùng được bao gồm giữa khoảng axit amin 102 và khoảng axit amin 130 của α -synuclein của người (ví dụ, SEQ ID NO: 1). Theo một số phương án, bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này liên kết với vùng được bao gồm giữa khoảng axit amin 120 và khoảng 130 của α -synuclein của người (ví dụ, SEQ ID NO: 1). Theo một số phương án, bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này liên kết với epitop không phải là epitop giống như epitop được liên kết bởi kháng thể 9E4.

Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 là chọn lọc đối với α -synuclein. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó không liên kết với các thành viên họ synuclein khác như β -synuclein hoặc γ -synuclein. Cụ thể hơn, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là đặc hiệu đối với α -synuclein của người.

Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với alpha-synuclein của người, chuột cống hoặc khi đầu chó. Khả năng của aslo0452 ngl-3 và aslo0543 để liên

kết với alpha-synuclein của người, khi đầu chó và chuột cống là dấu hiệu biểu thị sự liên kết với epitop khác nhau trên alpha-synuclein của người so với kháng thể không liên kết với alpha-synuclein của người, khi đầu chó và chuột cống. Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 do đó có khả năng được sử dụng để nghiên cứu và đánh giá độ an toàn *in vivo* trong mô hình thử nghiệm về bệnh ở khi đầu chó và chuột cống.

Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với α -synuclein của người với ái lực cao. Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với alpha-synuclein với K_D ít hơn 500 picomol (pM), ít hơn 400 pM, ít hơn 300 pM, ít hơn 150 pM, ít hơn 120 pM, ít hơn 115 pM, ít hơn 110 pM hoặc 106 pM hoặc ít hơn như được xác định bằng cách sử dụng phân tích Octet chẳng hạn (xem, ví dụ, Ví dụ 9). Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với alpha-synuclein với K_D ít hơn 300 picomol (pM), ít hơn 250 pM, ít hơn 200 pM, ít hơn 150 pM, ít hơn 120 pM, ít hơn 110 pM hoặc 108 pM, ít hơn 100 pM, ít hơn 80 pM hoặc 74 pM hoặc ít hơn như được xác định bằng cách sử dụng phân tích KinExA chẳng hạn (xem, chẳng hạn, Ví dụ 9 về protocol phân tích KinExA tham chiếu).

Mảnh aslo0452 ngl-3 Fab liên kết với α -synuclein của người với ái lực cao. Mảnh aslo0452 ngl-3 Fab liên kết với alpha-synuclein với K_D ít hơn 300 picomol (pM), ít hơn 200 pM, ít hơn 180 pM, 174 pM hoặc ít hơn như được xác định bằng cách sử dụng phân tích KinExA chẳng hạn (xem, ví dụ, Ví dụ 9.3).

Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với α -synuclein nguyên thể nội sinh của người. Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với khối kết tụ của α -synuclein của người. Cụ thể, các kháng thể này do đó liên kết với epitop mà không được yêu cầu cho quá trình kết tụ. Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 có khả năng càn hóa cả dạng monome và dạng kết tụ của alpha-synuclein. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có khả năng liên kết với dạng monome và dạng kết tụ của alpha-synuclein.

Các kháng thể aslo0452 ngl-3 và aslo0543 liên kết với các dạng bệnh lý, có liên quan đến bệnh của α -synuclein, ví dụ thể Lewy, sợi trục Lewy, chấm Lewy trong mô não bị bệnh Parkinson. Quan sát thấy sự nhuộm màu rất ít ở não bình thường (không bị bệnh).

Kháng thể aslo0452 ngl-3 làm giảm mức α -synuclein trong dịch mô não. Cụ thể, kháng thể aslo0452 ngl-3 làm giảm mức α -synuclein tự do chưa được liên kết trong dịch mô não.

Kháng thể aslo0452 ngl-3 làm giảm mức α -synuclein trong dịch não tủy. Cụ thể, kháng thể aslo0452 ngl-3 làm giảm mức α -synuclein tự do chưa được liên kết trong dịch não tủy. Kháng thể aslo0452 ngl-3 làm giảm sự lan rộng α -synuclein *in vivo*. Chức năng ức chế sự lan rộng alpha-synuclein mới này là dấu hiệu biểu thị sự liên kết với epitop khác nhau trên alpha-synuclein của người so với các kháng thể không ức chế sự lan rộng.

Theo một số phương án, bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này có bất kỳ một hoặc nhiều tính chất chức năng của aslo0452 ngl-3, ví dụ, bất kỳ trong số các tính chất chức năng của aslo0452 ngl-3 được trích dẫn trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được bộc lộ trong bản mô tả này có bất kỳ một hoặc nhiều tính chất chức năng của aslo0543, ví dụ, bất kỳ trong số các tính chất chức năng của aslo0543 được trích dẫn trong bản mô tả này.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cạnh tranh với kháng thể aslo0452 ngl-3 và/hoặc aslo0543 để liên kết với α -synuclein của người. Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế liên kết với cùng epitop trên α -synuclein của người như kháng thể aslo0452 ngl-3 và/hoặc aslo0543.

Có thể dễ dàng xác định được rằng liệu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có liên kết với epitop của kháng thể tham chiếu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên như được xác định trên đây hay không. Các phương pháp như vậy là thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, một kháng thể có thể được so sánh với kháng thể khác bằng thử nghiệm cạnh tranh hóa sinh, nhờ đó, hai kháng thể (một được đánh dấu nhằm mục đích phát hiện và một không được đánh dấu) được ủ đồng thời với kháng nguyên đã cho. Nếu tín hiệu liên kết đạt được đối với kháng thể đã được đánh dấu thì hai kháng thể này được nêu là nhận biết các epitop riêng biệt, không chồng chập trên protein quan tâm. Nếu không thu được tín hiệu liên kết thì, ngược lại, chúng sẽ được xác định đặc điểm là có các epitop chồng chập trên trình tự protein này

vì sự liên kết của một kháng thể sẽ cản trở không gian sự liên kết của kháng thể thứ hai. Ngoài ra, vị trí axit amin của epitop đã cho cũng có thể được nhận diện bằng cách sử dụng các protein cải biến như dạng cắt cụt, trình tự peptit thẳng có nguồn gốc từ trình tự amino bậc một của kháng nguyên, các gen trực giao (orthologue) của loài, và bằng sự tiêu hóa phân giải protein và phân tích phổ khối của kháng thể đã được liên kết với protein đã cho. Các phương pháp này đóng vai trò tạo ra vùng tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên.

Các thử nghiệm thông thường khác (như các phân tích liên kết và đột biến peptit) có thể được tiến hành để xác nhận xem việc không có liên kết quan sát được bất kỳ trên thực tế là do sự liên kết với epitop theo sáng chế hay một số hiện tượng khác (như sự cản trở không gian) chịu trách nhiệm. Các thử nghiệm này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng ELISA, RIA, Biacore, bào kế chảy hoặc các thử nghiệm liên kết kháng thể đã biết khác.

Ví dụ, để lập bản đồ chính xác epitop đặc hiệu, mô hình toán học về mặt phân cách epitop:paratop có thể thu được từ số liệu tạo ra thông qua việc giải cấu trúc của phức hợp kháng nguyên : kháng thể sử dụng phương pháp tạo ảnh có độ phân giải cao như đồng kết tinh với nhiễu xạ tia X. Để xác nhận tính thích hợp của mô hình toán học thu được, về mặt nhận diện các gốc tiếp xúc quan trọng xác định epitop, thì phương pháp phát sinh đột biến điểm của kháng nguyên tiếp theo phải được thực hiện và phân tích sự tác động đến độ mạnh của liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể gây ra bởi các đột biến này được thiết lập. Sử dụng tổ hợp các phương pháp này, bản đồ chính xác của các gốc tiếp xúc quan trọng chứa epitop có thể được thiết lập.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với epitop của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sản xuất các biến thể của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Kháng thể biến thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể có các CDR có chung mức độ đồng nhất cao với các CDR của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Chẳng hạn, theo một số phương án, bất kỳ trong số các CDR được bộc lộ trong bản mô tả này của bất kỳ trong số các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được bộc lộ trong bản mô tả này có thể khác nhau bởi 1 hoặc 2 gốc axit amin so với bất kỳ một hoặc nhiều trong số các trình

tự CDR đặc hiệu được đề cập đến trong bản mô tả này (ví dụ, bất kỳ một hoặc nhiều trong số các CDR có SEQ ID NO: 5, 15, 16, 20, 10 và 21). Ngoài ra, các kháng thể này có thể có một hoặc nhiều biến đổi (ví dụ thay thế axit amin bảo toàn) trong các vùng khung.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có các biến đổi trong trình tự axit amin CDR mà giữ được ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% và lên đến 99% độ đồng nhất trình tự so với các CDR của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Cụ thể, sự thay thế axit amin bảo toàn được dự tính. Các thay thế bảo toàn là các thay thế mà diễn ra trong họ axit amin có mạch bên liên quan. Các axit amin được mã hóa di truyền nhìn chung được chia thành các họ: (1) có tính axit: aspartat, glutamat; (2) có tính bazơ: lysin, arginin, histidin; (3) không phân cực: alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan; và (4) phân cực không tích điện: glyxin, asparagin, glutamin, xystein, serin, threonin, tyrosin. Các họ này có thể được phân loại tiếp: serin và threonin là họ hydroxy béo; asparagin và glutamin là họ chứa amit; alanin, valin, leuxin và isoleuxin là họ béo; và phenylalanin, tryptophan, và tyrosin là họ thơm. Do đó, nhìn chung, có thể dự đoán rằng sự thay thế riêng biệt leuxin bằng isoleuxin hoặc valin, aspartat bằng glutamat, threonin bằng serin, hoặc sự thay thế tương tự axit amin bằng axit amin có liên quan về mặt cấu trúc, sẽ không có ảnh hưởng lớn đến chức năng liên kết hoặc các tính chất của kháng thể thu được, đặc biệt là nếu sự thay thế này không bao gồm axit amin ở vị trí CDR.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa ít nhất một CDR được chọn từ:

- (i) H-CDR1 của SEQ ID NO: 5,
- (ii) H-CDR2 của SEQ ID NO: 6,
- (iii) H-CDR3 của SEQ ID NO: 7,
- (iv) L-CDR1 của SEQ ID NO: 9,
- (v) L-CDR2 của SEQ ID NO: 10,
- (vi) L-CDR3 của SEQ ID NO: 11.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có ít nhất một CDR được chọn từ các CDR của kháng thể aslo0452 ngl-3, tức là ít nhất một CDR được chọn từ bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 21.

Theo phương án khác, CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể aslo0452 ngl-3; và/hoặc CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể aslo0452 ngl-3. Do đó, theo một phương án, CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của SEQ ID NO: 16 của chuỗi nặng của kháng thể aslo0452 ngl-3; và/hoặc CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của SEQ ID NO: 21 của chuỗi nhẹ của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo phương án khác, CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo một phương án, CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là CDR3 của chuỗi nhẹ của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có sáu CDR của kháng thể aslo0452 ngl-3 *tức là* ba CDR chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16; và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 21.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 13 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 18.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa miền nặng biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 13 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 18.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa (i) chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 19, và (ii) sáu CDR của kháng thể aslo0452 ngl-3.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có sáu CDR của kháng thể aslo0543.

Do đó, theo một phương án, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa:

- a) ba CDR chuỗi nặng có trình tự:
 - (i) H-CDR1 của SEQ ID NO: 25,
 - (ii) H-CDR2 của SEQ ID NO: 26; và
 - (iii) H-CDR3 của SEQ ID NO: 27, và
- b) ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự:
 - (i) L-CDR1 của SEQ ID NO: 31,
 - (ii) L-CDR2 của SEQ ID NO: 32; và
 - (iii) L-CDR3 của SEQ ID NO: 33.

Theo phương án khác, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 14 và chuỗi nhẹ biến đổi có độ đồng nhất ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự được xác định bởi SEQ ID NO: 19 và còn chứa:

- a) ba CDR chuỗi nặng có trình tự:
 - (vii) H-CDR1 của SEQ ID NO: 25,
 - (viii) H-CDR2 của SEQ ID NO: 26; và
 - (ix) H-CDR3 của SEQ ID NO: 27, và
- b) ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự:
 - (vii) L-CDR1 của SEQ ID NO: 31,
 - (viii) L-CDR2 của SEQ ID NO: 32; và
 - (ix) L-CDR3 của SEQ ID NO: 33.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 23 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự nucleotit được xác định bởi SEQ ID NO: 29.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế chứa chuỗi nặng biến đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 24 và chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 30.

Theo phương án khác, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 22 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được xác định bởi SEQ ID NO: 28.

Vùng khung và CDR hoặc kháng thể có thể được định nghĩa một cách chính xác (xem, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services (1991), 91-3242, 1991; và Chothia *et al.* J. Mol. Biol. (1987), 196:901-917, cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các thay đổi nhỏ trong trình tự axit amin của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được dự định là được bao gồm bởi sáng chế, với

điều kiện là các thay đổi trong (các) trình tự axit amin này giữ được ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, và tốt nhất là ít nhất 99% độ đồng nhất trình tự so với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được định nghĩa bất kỳ đâu trong bản mô tả này. Cụ thể, các thay thế axit amin bảo toàn được dự định.

Sáng chế cũng đề xuất trình tự axit amin chuỗi đơn chứa chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được định nghĩa bất kỳ đâu trong bản mô tả này. Sáng chế cũng đề xuất trình tự axit amin chuỗi đơn chứa chuỗi nặng của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được định nghĩa bất kỳ đâu trong bản mô tả này.

Sự sắp hàng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được tiến hành, ví dụ, bằng thuật toán sắp hàng độ tương đồng cục bộ của Smith và Waterman (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 (1981), 484; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), bằng thuật toán của Needleman & Wunsch (Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* (1970), 48: 443; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) bằng phương pháp tìm kiếm tính tương tự của Pearson & Lipman (Pearson & Lipman, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988), 85: 2444; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), bằng cách thực hiện các thuật toán này nhờ máy tính (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA - Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), hoặc kiểm tra bằng mắt (xem *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausbel et al, eds, *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (1995 Supplement) Ausbubel; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Ví dụ về các thuật toán thích hợp để xác định phần trăm độ tương tự hoặc độ đồng nhất trình tự là thuật toán BLAST và BLAST 2.0 (xem Altschul *et al.* *J. Mol. Biol.* (1990), 215(3): 403-410; và "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>" của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia - National Center for Biotechnology Information; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được phân lập. Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được tinh chế.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể đơn dòng. Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể được làm giống như của người. Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể của người.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là IgA, IgD, IgE, IgM hoặc IgG, như IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo phương án khác, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có ái lực liên kết giảm đối với thụ thể Fc IgG. Do đó, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có tác dụng sinh miễn dịch thấp. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể IgG1 TM hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. IgG1 TM là thể đột biến bộ ba IgG1, chứa 3 đột biến điểm (L234F/L235E/P331S) trong miền Fc mà làm giảm ái lực liên kết của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó với thụ thể Fc-gama (FcγR) (Oganesyan *et al.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, (2008) 64: 700–704; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, việc ngăn ngừa qua trung gian kháng thể đối với sự lan rộng alpha-synuclein bằng các kháng thể theo sáng chế do đó không đòi hỏi chức năng tác động có liên quan đến Fc làm chức năng tác động chính.

Các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm Fab, Fv, scFv, dAb, Fd, Fab', F(ab')₂ hoặc vùng quyết định tính bổ trợ (CDR) riêng biệt có khung đủ để liên kết. Mảnh Fab có thể là mảnh hóa trị một gồm các miền VL, VH, CL và CH1. Mảnh F(ab')₂ có thể là mảnh hóa trị hai chứa hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu disulfua ở vùng bản lề. Mảnh Fc có thể gồm miền CH2 và CH3. Mảnh Fv có thể gồm miền VL và VH của nhánh đơn của kháng thể. Mảnh dAb (Ward *et al.* Nature (1989), 341: 544-546; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) có thể gồm miền VH. Vùng quyết định

tính hỗ trợ (CDR) riêng biệt có khung đủ để liên kết có thể là phần liên kết kháng nguyên của vùng biến đổi.

Phần liên kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và phần liên kết kháng nguyên của vùng biến đổi chuỗi nặng, ví dụ, hai miền của mảnh Fv, VL và VH, có thể được nối, sử dụng phương pháp tái tổ hợp, bằng cầu nối tổng hợp mà có thể làm cho chúng được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn trong đó vùng VL và VH bắt cặp để tạo thành phân tử hóa trị một (được biết là Fv chuỗi đơn (scFv); xem, ví dụ, Bird *et al.* Science (1988), 242(4877): 423-426; và Huston *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A (1988), 85: 5879-5883; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các phần này thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, và các phần này được sàng lọc để sử dụng theo cách giống như là kháng thể nguyên vẹn.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có bất kỳ hoặc tất cả các tính chất có lợi như được xác định trên đây hoặc sự kết hợp của chúng. Cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có tính chọn lọc đối với alpha-synuclein và có khả năng làm chậm hoặc ngăn ngừa sự truyền từ tế bào sang tế bào và sự lan rộng của alpha-synuclein *in vivo*.

Chức năng của kháng thể thu được hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và cụ thể là (i) khả năng của nó để liên kết với epitop của alpha-synuclein; và (ii) khả năng của nó để làm chậm hoặc ngăn ngừa sự truyền từ tế bào sang tế bào và sự lan rộng của alpha-synuclein *in vivo* có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách thử nghiệm hoạt tính đặc hiệu của nó sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Sáng chế đề xuất chế phẩm để phân phối kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế qua hàng rào máu não (BBB) sử dụng phân tử vận chuyển mà có thể đi qua tế bào nội mô của não trong khi được kết hợp với kháng thể hoặc mảnh đã nêu, ví dụ, trong khi được dung hợp hoặc được liên hợp với kháng thể hoặc mảnh đã nêu. Các trình tự BBB được đưa ra trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trọng tải” được sử dụng dưới dạng chữ tắt ký đối với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó như được mô tả kèm theo đây mà sự vận chuyển qua BBB của nó có thể được làm dễ dàng

nhờ phân tử vận chuyển như được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án cụ thể, “trọng tải” bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của các kháng thể theo sáng chế, cụ thể hơn, vùng biến đổi chuỗi nặng của also0452 ngl-3 hoặc aslo0543.

Trọng tải có thể là một phần của phân tử vận chuyển, *ví dụ*, dưới dạng polypeptit dung hợp, hoặc được nối với polypeptit này thông qua liên kết disulfua hoặc các liên kết cộng hóa trị khác. Theo cách khác, trọng tải có thể được kết hợp với phân tử vận chuyển theo cách bất kỳ mà sẽ cho phép phân tử vận chuyển dễ dàng vận chuyển nó qua BBB, như được mô tả thêm dưới đây. Theo các khía cạnh nhất định, trọng tải này vẫn còn là một phần của phân tử vận chuyển sau khi vận chuyển qua BBB, và giữ được hoạt tính hệ thần kinh trung ương (CNS) ở dạng đó. Theo cách khác, trọng tải có thể được kết hợp với phân tử vận chuyển trong quá trình vận chuyển qua BBB, nhưng theo cách mà cho phép nó tách ra khỏi phân tử vận chuyển sau khi vận chuyển qua BBB.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc chẩn đoán bệnh hoặc rối loạn của CNS, cụ thể bệnh lý α -synuclein, bao gồm việc sử dụng phân tử vận chuyển như vậy được kết hợp với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất phân tử vận chuyển riêng biệt chứa polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch. Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit này là dạng bất chức hoặc không phải bất chức của kháng thể họ lạc đà FC5, được nhận diện và phân lập bằng cách sử dụng Công nghệ thử nghiệm vi thể tích huỳnh quang (Fluorescence Micro-volume Assay Technology (FMAT)) để phát hiện sự liên kết với tế bào nội mô vi mạch của não (BMVEC), *ví dụ*, tế bào B.End3 của chuột. Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch là kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính của nó, trong đó “có hoạt tính” nghĩa là phân tử vận chuyển có thể, *ví dụ*, liên kết với BMVEC trong một hoặc nhiều loài, *ví dụ*, BMVEC của chuột nhắt, BMVEC của chuột cống, BMVEC của khỉ đầu chó, hoặc BMVEC của người, hấp thu vào BMVEC của một hoặc nhiều loài, và/hoặc đi qua hàng rào máu não một mình, hoặc kết hợp với trọng tải.

Theo một số phương án, phân tử vận chuyển qua BBB là phân tử vận chuyển qua BBB được mô tả trong đơn Mỹ tạm thời số 62/094,503, tài liệu này được đưa vào

bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển chứa một hoặc nhiều trong số Bbbt0241, Bbbt0626, Bbbt0626gl, Bbbt0632, BBBt0632gl Bbbt0654, Bbbt0726, Bbbt0727, Bbbt0732, Bbbt0754, Bbbt0674, Bbbt0755, Bbbt0643, Bbbt0579 hoặc Bbbt0671 như được mô tả trong đơn Mỹ tạm thời số 62/094,503, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Theo phương án cụ thể, phân tử vận chuyển qua BBB là Bbbt0626 hoặc BBBt0632.

Theo một số phương án nhất định, phân tử vận chuyển qua BBB được tạo dòng mầm, ví dụ, Bbbt0626gl là kiểu được tạo dòng mầm của Bbbt0626, gọi là "Bbbt0626gl".

Theo phương án cụ thể khác, phân tử vận chuyển qua BBB là BBBt0632gl hoặc Bbbt0626gl.

Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển không liên kết với BMVEC nhưng vẫn có khả năng vận chuyển qua BBB như được biểu thị trong thử nghiệm vận chuyển xuyên tế bào (transcytosis) *in vitro*.

Liên quan đến phân tử vận chuyển qua BBB, các trình tự VH CDR được mô tả tương ứng với các vị trí đánh số Kabat cổ điển, cụ thể Kabat H-CDR1 là ở vị trí 31-35, H-CDR2 là ở vị trí 50-65, và H-CDR3 là ở vị trí 95-102. L-CDR2 và L-CDR3 cũng tương ứng với các vị trí đánh số Kabat cổ điển, cụ thể vị trí 50-56 và 89-97, một cách tương ứng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "L-CDR1" hoặc "CDR1 chuỗi nhẹ" tương ứng với các trình tự định vị ở vị trí Kabat 23-34 trong VL (trái lại, vị trí L-CDR1 cổ điển theo sơ đồ đánh số Kabat tương ứng với vị trí 24-34).

Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch chứa các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) chuỗi nặng globulin miễn dịch. Ví dụ, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch có thể bao gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng globulin miễn dịch-1 (H-CDR1), vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng globulin miễn dịch-2 (H-CDR2), vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng globulin miễn dịch-3 (H-CDR3). Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch có thể còn chứa, hoặc theo cách khác chứa, CDR chuỗi nhẹ globulin miễn dịch. Ví dụ, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch có thể bao

gồm vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ globulin miễn dịch 1 (L-CDR1), vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ globulin miễn dịch 2 (L-CDR2), và vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ globulin miễn dịch 3 (L-CDR3).

Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch chứa H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, và L-CDR3 với các trình tự axit amin sau, một cách tương ứng:

(a) SEQ ID NO: 40 làm H-CDR1, SEQ ID NO: 41 làm H-CDR2, SEQ ID NO: 42 làm H-CDR3, SEQ ID NO: 36 làm L-CDR1, SEQ ID NO: 37 làm L-CDR2, và SEQ ID NO: 38 làm L-CDR3, trong đó các CDR này là tương tự với các CDR của Bbbt0626 và Bbbt0626gl;

(b) SEQ ID NO: 40 làm H-CDR1, SEQ ID NO: 41 làm H-CDR2, SEQ ID NO: 42 làm H-CDR3, SEQ ID NO: 44 làm L-CDR1, SEQ ID NO: 45 làm L-CDR2, và SEQ ID NO: 46 làm L-CDR3, trong đó các CDR này là giống hệt với các CDR của Bbbt0626 và Bbbt0626gl.

Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch chứa H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, và L-CDR3 với các trình tự axit amin sau, một cách tương ứng:

(a) SEQ ID NO: 49 làm H-CDR1, SEQ ID NO: 50 làm H-CDR2, SEQ ID NO: 51 làm H-CDR3, SEQ ID NO: 53 làm L-CDR1, SEQ ID NO: 54 làm L-CDR2, và SEQ ID NO: 55 làm L-CDR3, trong đó các CDR này là tương tự với các CDR của Bbbt0632gl;

(b) SEQ ID NO: 49 làm H-CDR1, SEQ ID NO: 50 làm H-CDR2, SEQ ID NO: 51 làm H-CDR3, SEQ ID NO: 53 làm L-CDR1, SEQ ID NO: 54 làm L-CDR2, và SEQ ID NO: 55 làm L-CDR3, trong đó các CDR này là giống hệt với các CDR của Bbbt0632gl;

Theo một số phương án thay thế nhất định, một hoặc nhiều CDR như được mô tả trên đây là giống hệt với các CDR đã được trích dẫn, ngoài trừ, ví dụ, 1, 2, 3, 4, hoặc 5 phần khuyết, phần thay thế, hoặc phần cài xen axit amin đơn.

Theo một số phương án nhất định, phân tử vận chuyển như được đưa ra trên đây có thể đi qua hàng rào máu não.

Theo các khía cạnh nhất định, H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2, và L-CDR3 có thể được đặt trong vùng khung globulin miễn dịch để sản xuất VH của kháng thể và VL của kháng thể. Theo các khía cạnh nhất định, vùng khung có thể là vùng khung có nguồn gốc từ người. Theo các khía cạnh nhất định, VH của kháng thể và VL của kháng thể được dung hợp cùng nhau, *ví dụ*, thông qua cầu nối peptit linh động, để tạo ra phân tử scFv. Theo các khía cạnh nhất định, VH và VL còn chứa một hoặc nhiều miền không đổi globulin miễn dịch, *ví dụ*, miền CH1, vùng bản lề, miền CH2, miền CH3, miền CL-kappa, và/hoặc miền CL lambda. Theo các khía cạnh nhất định, một hoặc nhiều miền không đổi globulin miễn dịch có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của người, *ví dụ*, globulin miễn dịch IgG1 của người. Theo các khía cạnh nhất định, miền VH, VL, và/hoặc miền không đổi có thể chứa các đột biến để tạo điều kiện dễ dàng cho, *ví dụ*, chu kỳ bán hủy dài hơn hoặc ngắn hơn, chức năng tác động tăng hoặc giảm, hoặc khả năng gắn với phân tử trọng tải thông qua sự dung hợp peptit, liên kết disulfua, hoặc liên hợp hóa học.

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được kết hợp với phân tử vận chuyển mà có thể đi qua tế bào nội mô nào như được mô tả kèm theo đây.

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được kết hợp với phân tử vận chuyển chứa polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch, trong đó polypeptit này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) globulin miễn dịch và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) globulin miễn dịch. Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch chứa các trình tự được đưa ra trong bản mô tả này, bao gồm:

(a) trình tự axit amin VH đồng nhất ít nhất 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 39 và trình tự axit amin VL đồng nhất ít nhất 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 43, trong đó SEQ ID NO: 39 và SEQ ID NO: 43 mã hóa vùng VH và VL của Bbbt0626gl,

(b) trình tự axit amin VH đồng nhất ít nhất 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 47 và trình tự axit amin VL đồng nhất ít nhất 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 43, trong đó SEQ ID NO: 47 và SEQ ID NO: 43 mã hóa vùng VH và VL của Bbbt0626,

(c) trình tự axit amin VH đồng nhất ít nhất 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 48 và trình tự axit amin VL đồng nhất ít nhất 80%, 84%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với SEQ ID NO: 43, trong đó SEQ ID NO: 48 và SEQ ID NO: 43 mã hóa vùng VH và VL của Bbbt0632

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được kết hợp với phân tử vận chuyển chứa polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch, trong đó polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch này chứa vùng VH và vùng VL, trong đó:

- (a) vùng VH chứa SEQ ID NO: 34 và vùng VL chứa SEQ ID NO: 35; hoặc
- (b) vùng VH chứa SEQ ID NO: 39 và vùng VL chứa SEQ ID NO: 43; hoặc
- (c) vùng VH chứa SEQ ID NO: 39 và vùng VL chứa SEQ ID NO: 35; hoặc
- (d) vùng VH chứa SEQ ID NO: 47 và vùng VL chứa SEQ ID NO: 43; hoặc
- (e) vùng VH chứa SEQ ID NO: 47 và vùng VL chứa SEQ ID NO: 35; hoặc
- (f) vùng VH chứa SEQ ID NO: 48 và vùng VL chứa SEQ ID NO: 52

Theo phương án khác, vùng VH và VL của phân tử vận chuyển như được mô tả trên đây được liên kết cộng hóa trị để tạo thành mảnh chuỗi đơn (ScFv).

Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển được đưa ra ở đây có hoạt tính vận chuyển, ví dụ, nó có thể liên kết với BMVEC từ một hoặc nhiều loài, ví dụ, BMVEC của chuột nhắt, chuột cống, khỉ đầu chó, hoặc người, nó có thể hấp thu vào BMVEC của một hoặc nhiều loài, hoặc nó có thể đi qua hàng rào máu não.

Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển như được đề xuất trong bản mô tả này chứa polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch, trong đó polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch này chứa kháng thể hoặc mảnh có khả năng thấm qua BBB của nó.

“Mảnh có khả năng thấm qua BBB” như được mô tả ở đây là mảnh của phân tử vận chuyển mà có thể liên kết đặc hiệu với BMVEC của một hoặc nhiều loài và đi qua BMVEC *in vitro* hoặc *in vivo* từ hệ mạch ngoại vi vào hệ mạch CNS. Liệu mảnh đã cho là mảnh có khả năng thấm qua BBB hay không có thể được thử nghiệm bằng nhiều thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* khác nhau đã biết với người có hiểu biết trung

binh về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng. Ví dụ, phân tử vận chuyển có thể được thử nghiệm trong thử nghiệm vận chuyển xuyên tế bào (transcytosis) *in vitro*, trong thử nghiệm *in vivo* như thử nghiệm tăng bài niệu, như được mô tả trong US 62/094,503. Các thử nghiệm khác mà có thể được sử dụng để xác định sự phân phối *in vivo* của trọng tải qua BBB bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tổn thương cơ mạn tính (CCI); mô hình thử nghiệm sự tổn thương dây thần kinh dự trữ (SNI) hoặc sự nối dây thần kinh tùy sống (SNL), tất cả các dạng này đều có thể được xác định bằng cách gõ nhẹ chân, hoặc phương pháp Hargreaves (Hargreaves K, *et al.*, Pain; 1988; 32; 77-88). Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển như được đề xuất trong bản mô tả này có thể liên kết với BMVEC từ một hoặc nhiều loài, *ví dụ*, BMVEC của người, khi đầu chó, bộ gặm nhấm, chuỗi công, hoặc bò. Sự liên kết có thể được chứng tỏ theo nhiều cách khác nhau đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật tương ứng, *ví dụ*, trong thử nghiệm FMAT như được mô tả trong US 62/094,503. Theo các khía cạnh nhất định, BMVEC là tế bào nội mô mao dẫn của não (BCEC). Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển như được đề xuất trong bản mô tả này có thể đi qua lớp đơn của BCEC trong thử nghiệm vận chuyển xuyên tế bào (transcytosis) *in vitro*. Theo các khía cạnh nhất định, hoạt tính của phân tử vận chuyển có thể được chứng tỏ bởi sự hiển thị phân tử vận chuyển trong CNS. Ví dụ, phân tử vận chuyển được đánh dấu bằng triti có thể được phân phối cho đối tượng, *ví dụ*, chuột nhắt, theo cách ngoại vi, *ví dụ*, trong tĩnh mạch, và sau đó được hiển thị hóa trong CNS thông qua phép chụp tia X toàn bộ cơ thể một cách định lượng. Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển định vị trong các vùng đặc hiệu của CNS, *ví dụ*, vỏ của tiểu não, chất xám của não, chất xám của tủy sống, học cầu, hoặc sự kết hợp của chúng.

Theo các khía cạnh nhất định, phân tử vận chuyển như được mô tả ở đây chứa kháng thể hoặc mảnh có khả năng thấm qua BBB của nó chứa hoặc gồm hai hoặc nhiều cấu trúc siêu phân tử, *ví dụ*, chuỗi nặng hoặc mảnh của nó và chuỗi nhẹ hoặc mảnh của nó, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được kết hợp, *ví dụ*, dưới dạng protein dung hợp đơn (*ví dụ*, scFv), hoặc dưới dạng hai cấu trúc siêu phân tử được giữ cùng với nhau nhờ một hoặc nhiều liên kết disulfua. Theo các khía cạnh nhất định, chuỗi nặng chứa miền hoặc vùng VH và chuỗi nhẹ chứa miền hoặc vùng VL.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được kết hợp với phân tử vận chuyển qua hàng rào máu não như được mô tả kèm theo đây.

Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được kết hợp với phân tử vận chuyển qua hàng rào máu não, trong đó phân tử vận chuyển là mảnh chuỗi đơn (scFv) chứa:

- i. vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của BBBt0626gl của SEQ ID NO: 39 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của BBBt0626gl của SEQ ID NO: 43, hoặc
- ii. vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của BBBt0626 của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của BBBt0626 của SEQ ID NO: 43,
- iii. vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của BBBt0632gl của SEQ ID NO: 48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của BBBt0632gl của SEQ ID NO: 52

Theo các khía cạnh nhất định, chuỗi nặng còn chứa miền không đổi chuỗi nặng, *ví dụ*, miền CH1, bản lề, miền CH2, và/hoặc miền CH3, hoặc mảnh của nó. Theo các khía cạnh nhất định, miền không đổi chuỗi nặng là miền không đổi IgG hoặc mảnh của nó, *ví dụ*, miền không đổi IgG của người, *ví dụ*, miền không đổi IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người. Theo các khía cạnh nhất định, miền không đổi IgG hoặc mảnh của nó chứa sự glycosyl hóa được làm biến đổi và/hoặc một hoặc nhiều sự thay thế axit amin so với miền không đổi IgG kiểu đại trong đó IgG đã được biến đổi có tính chất đặc biệt, *ví dụ*, chu kỳ bán hủy tăng hoặc giảm so với chu kỳ bán hủy của IgG có miền không đổi IgG kiểu đại, chức năng tác động tăng hoặc giảm so với miền không đổi IgG kiểu đại, hoặc khả năng gắn với các gốc khác loại thông qua, *ví dụ*, liên kết peptit, liên kết disulfua, hoặc liên hợp hóa học. Theo các khía cạnh nhất định, miền không đổi IgG hoặc mảnh của nó có sự glycosyl hóa được làm biến đổi so với miền không đổi IgG kiểu đại trong đó IgG đã được biến đổi có tính chất đặc biệt, *ví dụ*, chu kỳ bán hủy tăng hoặc giảm so với chu kỳ bán hủy của IgG có miền không đổi IgG kiểu đại, chức năng tác động tăng hoặc giảm so với miền không đổi IgG kiểu đại.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được kết hợp với BBBt0626 hoặc BBBt0626gl, như được xác định kèm theo đây, tạo thành phân tử kháng thể đặc hiệu kép.

Theo các phương án khác, kháng thể đặc hiệu kép đã nêu theo sáng chế chứa khung TM IgG1 của người (tức là vùng CH1, CH2, CH3 chuỗi nặng của IgG1 TM) được kết hợp với mảnh chuỗi đơn (scFv) chứa vùng VH và VL của BBBt0626 hoặc BBBt0626gl được ghép với đầu tận N (“dạng BiS2”) hoặc đầu tận C (“dạng BiS3”) của chuỗi nặng hoặc đầu tận N (“dạng BiS1”) của VL, của kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế. Tham chiếu đến dạng BiS là như được bộc lộ trong DiMasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép đã nêu theo sáng chế còn chứa chuỗi nhẹ chứa vùng CL kappa hoặc lambda được kết hợp với VL của kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế chứa khung TM IgG1 của người được kết hợp với:

(i) mảnh chuỗi đơn (scFv) của BBBt0626gl chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 39 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 43; hoặc

(ii) mảnh chuỗi đơn (scFv) của Bbbt0626 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 43,

trong đó ScFv đã nêu được ghép với đầu tận N (dạng BiS2) hoặc đầu tận C (dạng BiS3) của chuỗi nặng của aslo0452 ngl-3 của SEQ ID NO: 12 hoặc đầu tận N (“dạng BiS1”) của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO. 17.

Theo các phương án cụ thể khác nữa, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế chứa khung TM IgG1 của người kết hợp với mảnh chuỗi đơn (scFv) của BBBt0626gl chứa (i) vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 39 và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 43; trong đó ScFv đã nêu được ghép với đầu tận N (dạng BiS2) hoặc đầu tận C (dạng BiS3) của chuỗi nặng của aslo0452 ngl-3 của SEQ ID NO: 12 hoặc đầu tận N (“dạng BiS1”) của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO. 17.

Theo các phương án cụ thể khác, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế chứa khung TM IgG1 của người được kết hợp với:

(i) mảnh chuỗi đơn (scFv) của BBBt0626gl chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 39 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 43; hoặc

(ii) mảnh chuỗi đơn (scFv) của Bbbt0626 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của SEQ ID NO: 47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của SEQ ID NO: 43,

trong đó ScFv đã nêu được ghép với đầu tận N (dạng BiS2) hoặc đầu tận C (dạng BiS3) của chuỗi nặng của aslo0543 của SEQ ID NO: 22 hoặc đầu tận N (“dạng BiS1”) của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO. 28.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế để sử dụng làm thuốc.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh của hệ thần kinh trung ương, cụ thể là bệnh lý α -synuclein. Theo một phương án, bệnh lý α -synuclein được chọn từ bệnh Parkinson (PD), bệnh sa sút trí tuệ với thể Lewy (DLB), và chứng teo đa hệ thống (MSA). Theo phương án được ưu tiên, bệnh lý α -synuclein là bệnh Parkinson (PD).

Sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế để sản xuất thuốc để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh của hệ thần kinh trung ương, cụ thể bệnh lý α -synuclein. Theo một phương án, bệnh lý α -synuclein được chọn từ bệnh Parkinson (PD), bệnh sa sút trí tuệ với thể Lewy (DLB), và chứng teo đa hệ thống (MSA). Theo phương án được ưu tiên, bệnh lý α -synuclein là bệnh Parkinson (PD).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ở bệnh nhân, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân này dùng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo một phương án, bệnh lý α -synuclein được chọn từ bệnh Parkinson (PD), bệnh sa sút trí tuệ với thể Lewy (DLB), và chứng teo đa hệ thống (MSA). Theo phương án được ưu tiên, bệnh lý α -synuclein là bệnh Parkinson (PD).

Trong việc sử dụng, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có khả năng điều trị hoặc ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh bằng cách ức chế sự lan truyền và lan rộng của α -synuclein *in vivo*. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế do đó tạo ra ưu điểm khác biệt so với các trị liệu khác. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm chậm hoặc ngăn ngừa sự tiến triển của

bệnh ở đối tượng cần điều trị, bao gồm việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cho bệnh nhân.

Theo một phương án, phương pháp điều trị bệnh nêu trên bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo phương án khác, phương pháp ngăn ngừa bệnh hoặc làm giảm hoặc ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Khoảng liều lượng để sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là khoảng liều lượng tạo ra tác dụng trị liệu mong muốn. Cần phải hiểu rằng khoảng liều lượng yêu cầu tùy thuộc vào bản chất chính xác của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc chế phẩm, đường dùng, bản chất của việc bào chế, độ tuổi của bệnh nhân, tính chất, mức độ hoặc độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý của bệnh nhân, các chống chỉ định, nếu có, và quyết định của bác sĩ điều trị. Các biến đổi đối với các mức liều lượng này có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các quy trình tối ưu hóa chuẩn theo thực nghiệm.

Liều lượng thích hợp nằm trong khoảng từ 1 đến 50 mg cho mỗi kg thể trọng. Liều lượng này có thể nằm trong khoảng từ 5 đến 30 mg/kg, 10 đến 25 mg/kg, hoặc 15 đến 20 mg/kg. Liều lượng đơn vị có thể được sử dụng hằng ngày hoặc ít thường xuyên hơn, ví dụ, hằng tuần hoặc hằng tháng.

Việc sử dụng có thể được thực hiện bằng các lần sử dụng lặp lại kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, trong khoảng thời gian kéo dài. Việc sử dụng có thể là đồng thời hoặc lần lượt, và có thể được thực hiện theo thứ tự bất kỳ.

Việc ngăn ngừa hoặc điều trị được định nghĩa ở đây có thể được áp dụng dưới dạng trị liệu đơn nhất hoặc có thể bao gồm, ngoài kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế, việc sử dụng các chất khác hoặc các trị liệu đã được thiết lập thường được sử dụng trong điều trị bệnh lý α -synuclein (như L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), chất chủ vận (thụ thể) dopamin, chất ức chế catechol-O-metyltransferaza (COMT), và/hoặc chất ức chế monoamin oxidaza typ B (MAO-B)). Việc sử dụng các chất khác hoặc các trị liệu đã được thiết lập có thể được kết hợp với, hoặc dưới dạng phụ thêm vào, hoặc cùng chung với, kháng thể hoặc mảnh

liên kết kháng nguyên theo sáng chế và có thể theo cách định liều đồng thời, lần lượt hoặc riêng rẽ đối với các thành phần riêng rẽ của việc điều trị.

Trị liệu kết hợp có thể được tiến hành theo cách bất kỳ được cho là cần thiết hoặc thuận tiện bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và cho mục đích của bản mô tả này, không có giới hạn nào đối với thứ tự, lượng, sự lặp lại hoặc lượng tương đối của các hợp chất được sử dụng kết hợp.

Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu chỉ lượng hoặc kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp cho bệnh nhân để điều trị bệnh, hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng lâm sàng của bệnh, là đủ để tác động đến sự điều trị bệnh hoặc triệu chứng này. Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu có thể thay đổi tùy thuộc, ví dụ, vào kháng thể và/hoặc các triệu chứng của bệnh, độ tuổi, trọng lượng, và/hoặc sức khỏe của bệnh nhân cần được điều trị, và quyết định của bác sĩ kê đơn. Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu thích hợp trong trường hợp bất kỳ đã cho có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có khả năng xác định bằng thử nghiệm thông thường. Lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu cũng là lượng trong đó các tác dụng có lợi là nhiều hơn tác động gây độc hoặc có hại bất kỳ của kháng thể hoặc kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

"Lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa" là lượng bất kỳ của kháng thể hoặc kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà, khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp cho bệnh nhân, sẽ ức chế hoặc làm chậm sự bắt đầu hoặc sự tái xuất hiện bệnh, hoặc ít nhất một trong số các triệu chứng lâm sàng của bệnh. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu có tác dụng phòng ngừa ngăn ngừa hoàn toàn sự bắt đầu hoặc sự tái xuất hiện bệnh. "Ức chế" sự bắt đầu nghĩa là làm giảm bớt khả năng bắt đầu bệnh, hoặc ngăn ngừa hoàn toàn sự bắt đầu của bệnh.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Do đó, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, cùng với tá dược được dụng. Tá dược được dụng thích hợp có thể tạo điều kiện dễ dàng cho việc xử lý các hợp chất có hoạt tính thành các chế phẩm thích hợp để sử dụng trong được phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phối chế dễ, nhưng không giới hạn ở, phân phối ngoài đường tiêu hóa, ví dụ trong cơ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch. Chế phẩm thích hợp để tiêm trong cơ, dưới da hoặc trong tĩnh mạch bao gồm dung dịch gốc nước vô trùng.

Dược phẩm có thể có dạng dung dịch gốc nước và có thể bao gồm chất đệm tương thích về mặt sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc nước muối được đệm sinh lý. Dược phẩm ngoài ra hoặc theo cách khác có thể chứa các chất làm tăng độ nhớt của hỗn dịch, như natri carboxymetyl xenluloza, sorbitol, hoặc dextran. Dược phẩm có thể được bào chế dưới dạng hỗn dịch tiêm dạng dầu thích hợp. Dung môi hoặc chất dẫn thuốc ưa béo thích hợp bao gồm dầu béo như dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, như etyl oleat hoặc triglycerit, hoặc liposom. Tùy ý, dược phẩm có thể chứa chất làm ổn định thích hợp hoặc các chất mà làm tăng độ hòa tan của các hợp chất để cho phép bào chế dung dịch có nồng độ cao.

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất vectơ chứa phân tử axit nucleic được phân lập theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất tế bào chủ chứa vectơ theo sáng chế.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp tạo ra hoặc phương pháp sản xuất cụ thể. Do đó, sáng chế đề xuất kháng thể mà đã được sản xuất từ tế bào lai tiết kháng thể, cũng như kháng thể được sản xuất từ tế bào được sản xuất theo cách tái tổ hợp mà đã được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với axit nucleic hoặc các axit nucleic mã hóa kháng thể này. Các tế bào lai, tế bào được sản xuất theo cách tái tổ hợp, và axit nucleic như vậy tạo nên một phần của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất kháng thể

Kháng thể đặc hiệu kháng α -syn được tách riêng từ thư viện biểu thị thể thực khuẩn sử dụng chuỗi các chu kỳ chọn lọc trên α -syn tái tổ hợp của người ("hu α -syn"), cả được cố định thụ động bên trên các lỗ vi chuẩn độ và tự do trong dung dịch. Thư viện biểu thị thể thực khuẩn Fv chuỗi đơn (scFv) nguyên thể của người được tách dòng

vào vector phagemid dựa trên thể thực khuẩn dạng sợi M13 được sử dụng để chọn lọc (Lloyd *et al.*, Protein Eng Des Sel. (2009), 22(3):159-68; và Vaughan *et al.*, Nat Biotechnol. (1996), 14(3); 309-14; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Số lượng tiêu biểu của các dòng vô tính riêng rẽ từ đầu ra chọn lọc sau hai hoặc ba chu kỳ chọn lọc được mô tả trên đây được sàng lọc ban đầu dưới dạng mảnh scFv hòa tan trong dịch chiết *E.coli* chất bào (Kipriyanov *et al.* J Immunol Methods (1997) 200: 69-77; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) trong thử nghiệm FRET đồng nhất (truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang) HTRF® (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence, Cisbio International) để liên kết với α -synuclein hòa tan của người.

Thử nghiệm HTRF® (Fig. 1) là kỹ thuật thử nghiệm đồng nhất sử dụng việc truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang giữa nhóm huỳnh quang thể cho và thể nhận trong vùng lân cận gần (Mathis G Clin Chem (1995) 41: 1391-1397.; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Thử nghiệm này được sử dụng để xác định tương tác đại phân tử bằng cách ghép cặp trực tiếp hoặc gián tiếp một trong số các phân tử quan tâm với nhóm huỳnh quang thể cho, ví dụ europi (Eu3+) cryptat, và ghép cặp phân tử quan tâm khác với nhóm huỳnh quang thể nhận XL665, (allophycocyanin được liên kết ngang ổn định). Sự kích thích phân tử cryptat (ở 337 nm) dẫn đến sự phát xạ huỳnh quang ở 620 nm. Năng lượng từ sự phát xạ này được chuyển đến XL665 trong vùng lân cận gần với cryptat, dẫn đến sự phát xạ huỳnh quang đặc trưng sống lâu (ở 665 nm) từ XL665. Tín hiệu đặc trưng của cả thể cho (ở 620 nm) và thể nhận (ở 665 nm) được xác định, cho phép tính toán tỷ lệ 665/620 nm mà bù cho sự có mặt của các hợp chất có màu trong thử nghiệm.

Các mẫu scFv kháng α -syn không được tinh chế được thử nghiệm về sự liên kết với α -syn đã được biotin hóa. 5 microlit dung dịch chứa α -syn của người đã được biotin hóa 40 nM được kết hợp với streptavidin tebi 0,8 nM (Cisbio International, 610SATLB) được bổ sung vào đĩa thử nghiệm thể tích thấp có 384 lỗ (Costar, 3676). Tiếp theo, 10 microlit mỗi dịch pha loãng của mẫu thử nghiệm kháng thể được bổ sung vào đĩa. Cuối cùng, 5 microlit dung dịch chứa kháng myc DC (Cisbio International, 661MYCDAB) được bổ sung vào đĩa thử nghiệm. Tất cả các lần pha

loãng đều được thực hiện trong đệm thử nghiệm chứa kali florua 0,8 M (BDH 103444T) và albumin huyết thanh bò 0,1% (BSA, Sigma A9576) trong Dulbeccos PBS (Invitrogen, 14190185). Đĩa thử nghiệm được ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ trong phòng sau đó là 16 giờ ở 4°C trước khi đọc huỳnh quang được phân giải theo thời gian ở bước sóng phát xạ 620 nm và 665 nm sử dụng thiết bị đọc đĩa EnVision (Perkin Elmer).

Số liệu được phân tích bằng cách tính toán tỷ lệ 665/620 nm sau đó là giá trị % Delta F đối với mỗi mẫu. Tỷ lệ 665/620 nm được sử dụng để hiệu chỉnh sự nhiễu mẫu sử dụng phương trình dưới đây:

$$\text{Tỷ lệ 665/620 nm} = \left(\frac{\text{tín hiệu 665 nm}}{\text{tín hiệu 620 nm}} \right) \times 10.000$$

Sau đó, % Delta F đối với mỗi mẫu được tính toán bằng cách sử dụng phương trình dưới đây:

$$\text{DeltaF (\%)} = \left(\frac{\text{tỷ lệ mẫu } \frac{665}{620} \text{ nm} - \text{tỷ lệ đối chứng âm } \frac{665}{620} \text{ nm}}{\text{tỷ lệ đối chứng âm } \frac{665}{620} \text{ nm}} \right) \times 10.000$$

Đối chứng âm (liên kết không đặc hiệu) được xác định bằng cách thay thế mẫu thử nghiệm bằng α -syn của người hoặc chuột cống không được gắn thẻ.

Sau đó, giá trị % Delta F được sử dụng để tính toán % liên kết đặc hiệu như được mô tả trong phương trình dưới đây:

$$\% \text{ liên kết đặc hiệu} = \left(\frac{(\text{Mẫu Delta F\%} - \text{NSB Delta F\%})}{(\text{DeltaF\% liên kết tổng} - \text{NSB DeltaF\%})} \right) \times 100$$

Giá trị IC₅₀ được xác định bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism bằng cách làm phù hợp đường cong sử dụng phương trình logistic bốn thông số:

$$Y = \text{Đáy} + (\text{Đỉnh} - \text{Đáy}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

X là lôgarit của nồng độ.

Y là liên kết đặc hiệu

Y bắt đầu ở Đáy và đi đến Đỉnh với hình chữ S.

Các dòng vô tính Fv chuỗi đơn mà liên kết với α -syn của người dưới dạng dịch chiết chất bào không được tinh chế được giải trình tự ADN (Osbourne *et al.*, Immunotechnology (1996), 2: 181-196; và Vaughan *et al.*, Nat Biotechnol. (1996), 14(3): 309-14; cả hai tài liệu này đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). scFv đơn nhất lại được biểu hiện trong vi khuẩn và được tinh chế bằng sắc ký ái lực (như được mô tả trong WO 01/66754; tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Hiệu lực của các mẫu này được xác định bằng cách chuẩn độ chế phẩm đã được tinh chế để liên kết với α -syn của người đã được biotin hóa trong thử nghiệm HTRF như được mô tả trên đây. Chế phẩm scFv đã được tinh chế mà thể hiện tương tác α -syn mạnh nhất được chọn để biến đổi thành dạng IgG.

Bằng cách chuẩn độ kháng thể trong thử nghiệm HTRF, các dòng vô tính được xếp loại về độ mạnh của liên kết với α -syn. Chất liên kết α -syn tốt nhất được phân tích thêm về cả động lực liên kết với α -syn (k_{off}) dưới dạng IgG trên thiết bị cảm biến sinh học Octet Red (xem phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 9), cũng như về tính chọn lọc thành viên họ synuclein (α -syn, β -syn, γ -syn của người) (xem phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 4) và về tính phản ứng chéo với α -syn của chuột (xem phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 5).

Ví dụ 2: Dẫn xuất aslo0452 ngi-3

Dòng vô tính đặc hiệu α -syn có tính phản ứng đầu tận C, asyn0087, được nhân diện bằng cách sàng lọc để liên kết với α -syn của người trong thử nghiệm DELFIA (xem phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 4). Asyn0087 liên kết đặc hiệu với α -syn của người, khi đầu chó và loài gặm nhấm (xem phương pháp như được mô tả trong Ví dụ 5). Asyn0087 được trở lại trình tự dòng mầm của người gần gũi nhất có thể (Tomlinson VBASE. MRC Centre of Protein Engineering, Cambridge, UK. 1997; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) mà không ảnh hưởng đến hiệu lực nhờ kỹ thuật phát sinh đột biến chuẩn trước khi tối ưu hóa. Sau khi tạo dòng mầm, dòng vô tính được đánh giá lại về sự liên kết với α -syn. Không quan sát thấy tác động có hại.

Các thư viện scFv-thể thực khuẩn lớn có nguồn gốc từ dòng vô tính chính được tạo ra bằng sự phát sinh đột biến được định hướng oligonucleotit của các vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) chuỗi nặng (VH) 2 và 3 và CDR chuỗi nhẹ (VL) 1 và 3 sử

dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn như được mô tả trong Clarkson and Lowman (2004) (Phage display: A practical approach. Oxford: Oxford University Press; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Các thư viện này được cho qua bước chọn lọc biểu hiện thể thực hiện dựa trên ái lực được thực hiện trên α -syn của người đã được biotin hóa có khả năng hòa tan để chọn lọc các biến thể có ái lực cao hơn đối với α -syn của người. Việc chọn lọc được thực hiện chủ yếu như được mô tả trước đây ở trên với ngoại trừ là làm giảm nồng độ của α -syn của người đã được biotin hóa có khả năng hòa tan đối với mỗi chu kỳ chọn lọc được thực hiện.

Các dòng vô tính đại diện từ mỗi đầu ra chọn lọc được sàng lọc ban đầu dưới dạng mảnh scFv hòa tan trong dịch chiết *E.coli* chất bảo trong thử nghiệm HTRF về khả năng của chúng để cạnh tranh liên kết với α -syn hòa tan so với dòng vô tính liên kết α -syn cha mẹ asyn0087. Đặc tính của mỗi thư viện trong các sàng lọc quần thể này được sử dụng để thông tin các thư viện phát sinh đột biến CDR nào được bổ sung cùng nhau theo cách di truyền, hoặc 'được tái tổ hợp' để tạo ra các thư viện mới, và các thư viện tái tổ hợp này được cho qua các chu kỳ khác chọn lọc theo ái lực được thực hiện trên α -syn của người đã được biotin hóa có khả năng hòa tan.

Đối với cả dòng vô tính có nguồn gốc từ thư viện phát sinh đột biến riêng rẽ và tái tổ hợp, sau khi phân tích trình tự của các chất liên kết dương, các dòng vô tính được biểu hiện và được tinh chế dưới dạng cả mảnh scFv và IgG và sự liên kết với α -syn hòa tan được xác nhận lại bởi thử nghiệm HTRF cạnh tranh epitop. Bằng cách chuẩn độ kháng thể trong thử nghiệm cạnh tranh epitop HTRF, các dòng vô tính được xếp loại theo giá trị IC_{50} của chúng về mức độ cải thiện tương đối sự liên kết với α -syn so với IgG cha mẹ asyn0087. Chất liên kết α -syn tốt nhất được phân tích thêm về tính chọn lọc thành viên họ synuclein (α -syn, β -syn, γ -syn của người) và về tính phản ứng chéo với α -syn của khỉ đầu chó và chuột cống bằng cả thử nghiệm HTRF liên kết trực tiếp hoặc thử nghiệm HTRF cạnh tranh epitop.

Từ các chu kỳ lặp lại này của quá trình sàng lọc và tái tổ hợp thư viện, hai dòng vô tính phản ứng chéo α -syn của khỉ đầu chó và chuột cống, đặc hiệu α -syn hiệu lực được nhận diện, aslo0452 ngl-1 và aslo0467.

Phát sinh đột biến điểm đơn được thực hiện trên aslo0452 ngl-1 đối với mỗi trong số các CDR ở đó các cải tiến dương đối với hiệu lực IC_{50} đã được quan sát thấy.

Mỗi vị trí trong CDR đã chọn được đột biến riêng rẽ thông qua tất cả 20 gốc axit amin có thể có, và lại được sàng lọc bằng thử nghiệm HTRF cạnh tranh epitop đối với IC₅₀ được cải thiện so với aslo0452 ngl-1 IgG. Nhiều gốc qua bốn CDR (H2, H3, L1 và L3) được nhận diện và được kết hợp trên cả aslo0452 ngl-1 và aslo0467, và lại được đánh giá bằng thử nghiệm HTRF cạnh tranh epitop đối với IC₅₀ được cải thiện so với aslo0452 ngl-1. Từ các thử nghiệm này, hai chất liên kết được cải thiện nhất được nhận diện là aslo0452 ngl-3 và aslo0543.

Fig. 2 so sánh trình tự axit amin của vùng VH và VL của asyn0087, aslo0452 ngl-3 và aslo0543.

Ví dụ 2.1: Tái định dạng scFv thành IgG1 TM

Các dòng vô tính Fv chuỗi đơn với tính chất liên kết α -syn mong muốn được biến đổi thành dạng kháng thể globulin miễn dịch G1 TM (IgG1 TM) toàn bộ không có chức năng tác động (Oganesyan *et al.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2008), 64(Pt 6):700-4; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) về cơ bản như được mô tả bởi Persic *et al.* (Persic *et al.*, Gene (1997) 187: 9-18; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) với các cải biến sau. Mảnh OriP được bao gồm trong vector biểu hiện để tạo điều kiện dễ dàng việc sử dụng với tế bào CHO tạm thời và để cho phép sự sao chép episom. Miền nặng biến đổi (VH) được tách dòng vào vector (pEU1.4) chứa miền không đổi chuỗi nặng của người và yếu tố điều tiết để biểu hiện chuỗi nặng IgG1 TM toàn bộ ở tế bào động vật có vú. Tương tự, miền nhẹ biến đổi (VL) được tách dòng vào vector (pEU4.4) để biểu hiện miền không đổi chuỗi nhẹ (lambda) của người và yếu tố điều tiết để biểu hiện chuỗi nhẹ IgG toàn bộ ở tế bào động vật có vú. Để thu được các IgG, vector biểu hiện IgG chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chuyển nhiễm vào tế bào động vật có vú CHO tạm thời (Daramola *et al.*, Biotechnol Prog (2014) 30: 132-141; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). IgG được biểu hiện và được tiết vào môi trường. Vật liệu thu hoạch được lọc trước khi tinh chế, sau đó IgG được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký Protein A. Dịch nổi bề mặt nuôi cấy được nạp lên trên cột có kích thước thích hợp bằng gôm Protein A (BioSeptra) và được rửa bằng Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 250 mM. IgG đã liên kết được rửa giải từ cột bằng cách sử dụng Natri Xitrat 0,1 M (pH 3,0) và được trung hòa bằng cách bổ sung Tris-HCl (pH 9,0). Vật liệu đã được rửa giải được trao đổi đệm vào

PBS sử dụng cột Nap10 (Amersham, #17-0854-02) và nồng độ của IgG được xác định theo cách phổ quang kế sử dụng hệ số tắt dựa trên trình tự axit amin của IgG (Mach *et al*, Anal Biochem (1992) 200: 74-80; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). IgG đã được tinh chế được phân tích về độ tinh khiết kết tụ và phân rã bằng cách sử dụng SEC-HPLC và SDS-PAGE.

Lý do sử dụng IgG1 TM làm dạng thuốc ứng viên là để tối thiểu hóa sự tiêu diệt “vật ngoài cuộc” do sự hoạt hóa bổ thể và tế bào miễn dịch (*tức là*, sự sản xuất quá mức C3a mà có thể gây ra tình trạng viêm). Sự tiêu diệt tế bào “ngoài cuộc” có thể được khởi động bởi sự tích tụ tiềm năng phức hợp miễn dịch tạo thành bởi thuốc ứng viên và α -synuclein ngoại bào mà đã được chứng tỏ là tương tác với màng lipid (Bartels *et al.*, Biophys. J. (2010), 99: 2116–2124; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Dạng IgG1 TM được chọn vì dạng này đã được chứng tỏ là có sự liên kết không đáng kể với thụ thể Fc γ (Fc γ R) và làm giảm sự hoạt hóa bổ thể qua trung gian C1q bởi phức hợp miễn dịch (Oganesyan *et al.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2008), 64(Pt 6):700-4; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Để tối thiểu hóa nguy cơ tiềm năng bất kỳ về tính sinh miễn dịch, khung của aslo0452 ngl-3 càng gần với trình tự axit amin dòng mầm của người càng tốt mà không ảnh hưởng đến hiệu lực. Điều này có nghĩa là một số axit amin trong aslo0452 ngl-3, bao gồm các gốc Vernier (Foote and Winter, J Mol Biol. (1992), 224(2): 487-99; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), không được đột biến đổi với trình tự dòng mầm của người gần gũi nhất. Đối với miền V_H của aslo0452 ngl-3 có một gốc Vernier trong vùng V mà không được đột biến đổi với trình tự IGVH3-23 và IGJH6 dòng mầm của người (Fig. 3C). Đối với miền V_L của aslo0452 ngl-3 tất cả các gốc khung đều phù hợp với trình tự IGLV5-45 và IGJL2 hoặc IGJL3 dòng mầm của người (Fig. 3D).

Ví dụ 3: Xác nhận epitop IgG kháng α -syn được tối ưu hóa ái lực

alpha-, beta-, và gamma-synuclein tái tổ hợp của người, các kiểu tái tổ hợp được cắt cụt của alpha-synuclein của người (aa1-60, aa1-95, aa61-140, 96-140, Δ NAC, và NCAP), và alpha-synuclein của chuột thu được từ rPeptide LLC. Việc lập bản đồ epitop thô được thực hiện bằng cách sử dụng các dạng cắt cụt α -syn có sẵn trên thị trường.

Nói một cách ngắn gọn, một microgam cho mỗi mililit của mỗi dạng cắt cụt được phủ vào lỗ vi chuẩn độ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau khi rửa các lỗ trong PBS, 1 µg/ml dịch pha loãng của mỗi kháng thể kháng α -syn được bổ sung. Sau khi ủ trong 1 giờ và rửa, kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách bổ sung kháng IgG của người được liên hợp với HRP hoặc Eu^{3+} . Sau khi ủ và rửa, cơ chất phát hiện thích hợp được bổ sung (dung dịch chất tăng cường TMB hoặc DELFIA, một cách tương ứng) và đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa vi chuẩn độ.

Các nghiên cứu về liên kết epitop này tiết lộ rằng thể phân lập chính, asyn0087, nhận biết epitop nằm trong vùng đầu tận C của protein α -syn giữa axit amin 102 và 130 (Fig. 4A). Cả aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đều duy trì sự nhận biết của chúng đối với cùng epitop nằm trong vùng đầu tận C của protein α -syn giữa axit amin 102 và 130 như thể phân lập chính gốc của chúng asyn0087 (Fig. 4B).

Ví dụ 4: Tính đặc hiệu của aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đối với α -syn so với các thành viên họ synuclein sử dụng thử nghiệm HTRF cạnh tranh epitop

Điều quan trọng đối với kháng thể được dự định sử dụng trong các ứng dụng trị liệu là phải đặc hiệu đối với α -syn của người, để tối thiểu hóa các nguy cơ về độ an toàn tiềm năng bất kỳ có liên quan đến sự tương tác ngoài đích với các synuclein khác (β -synuclein và γ -synuclein).

Tính đặc hiệu của aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đối với α -syn so với các thành viên họ synuclein khác, β -syn và γ -syn, được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cạnh tranh epitop HTRF mà xác định sự liên kết của α -syn của người đã được biotin hóa với kháng thể trong dung dịch.

α -syn, β -syn và γ -syn được chuẩn độ trong thử nghiệm này, và tính chọn lọc của aslo0452 ngl-3 IgG và aslo0543 IgG được đánh giá bằng cách xác định mức độ ức chế sự liên kết của α -syn của người đã được biotin hóa với aslo0452 ngl-3/aslo0543. Giá trị IC_{50} được xác định bằng cách làm phù hợp đường cong số liệu với phương trình logistic bốn thông số sử dụng phần mềm PRISM 6® (Graphpad). Thử nghiệm HTRF nhạy hơn xác định sự liên kết trực tiếp của IgG với α -syn, β -syn và γ -syn của người cũng được sử dụng để xác nhận tính đặc hiệu α -syn (số liệu không được thể hiện). Đối với đối chứng âm, mẫu thử nghiệm kháng thể được thay thế chỉ bằng kháng thể đối chứng isotyp hoặc đệm.

Giá trị IC_{50} đại diện thu được với protein α -syn, β -syn và γ -syn trong thử nghiệm cạnh tranh epitop HTRF aslo0452 ngl-3 và aslo0543 được thể hiện trên Fig. 5. Không quan sát thấy sự liên kết với β -syn và γ -syn ở các nồng độ được thử nghiệm (lên đến 5 μ M), chứng tỏ rằng aslo0452 ngl-3 và aslo0543 có tính chọn lọc đối với α -syn.

Ví dụ 5: Tính đặc hiệu của aslo0452 ngl-3 đối với α -syn của người, khi đầu chó và chuột cống sử dụng thử nghiệm cạnh tranh epitop HTRF

Khi xem xét các ứng dụng trị liệu, điều quan trọng là kháng thể có tính phản ứng chéo với α -synuclein của khi đầu chó và mong muốn rằng nó có tính phản ứng chéo với α -synuclein của chuột cống, trong khoảng 10 lần tính phản ứng quan sát thấy đối với α -syn của người. Điều này khiến cho các nghiên cứu về độ an toàn được tiến hành ở cả loài khi đầu chó và chuột cống.

Tính đặc hiệu của aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đối với α -syn của người, khi đầu chó và chuột cống được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cạnh tranh epitop HTRF mà xác định sự liên kết của α -syn của người đã được biotin hóa với aslo0452 ngl-3 trong dung dịch.

α -syn của người, khi đầu chó và chuột cống được chuẩn độ trong thử nghiệm, và tính chọn lọc của kháng thể được đánh giá bằng cách xác định mức độ ức chế sự liên kết của α -syn của người đã được biotin hóa với kháng thể. Giá trị IC_{50} được xác định bằng cách làm phù hợp đường cong số liệu đối với phương trình logistic bốn thông số sử dụng phần mềm PRISM 6® (Graphpad). Tính phản ứng chéo loài của aslo0452 ngl-3 và aslo0543 cũng được xác nhận bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm HTRF liên kết trực tiếp (không được thể hiện). Aslo0452 ngl-3 (hoặc aslo0543) được chuẩn độ trong thử nghiệm để cạnh tranh sự liên kết của α -syn của người hoặc khi đầu chó hoặc chuột cống với aslo0452 ngl-3 (hoặc aslo0543) bởi thử nghiệm HTRF. Đối với đối chứng âm, mẫu thử nghiệm kháng thể được thay thế chỉ bằng kháng thể đối chứng isotyp hoặc đệm.

Giá trị IC_{50} đại diện thu được với protein α -syn của người, khi đầu chó và chuột cống trong thử nghiệm cạnh tranh epitop HTRF được thể hiện trên Fig. 6. Aslo0452 ngl-3 liên kết với α -syn của người và khi đầu chó với giá trị IC_{50} bằng 5,7 nM và 6,8 nM, một cách tương ứng, và liên kết với α -syn của chuột cống với giá trị IC_{50} bằng

19,6 nM, trong vòng 4 lần. Aslo0543 liên kết với α -syn của người và khi đầu chó với giá trị IC_{50} bằng 2,0 nM và 2,1 nM, một cách tương ứng, và liên kết với α -syn của chuột cống với giá trị IC_{50} bằng 3,8 nM, trong vòng 2 lần.

Khả năng của aslo0452 ngl-3 để liên kết với α -syn của người, khi đầu chó và chuột cống là dấu hiệu biểu thị sự liên kết với epitop khác nhau trên alpha-synuclein của người so với kháng thể không liên kết với α -syn của người, và khi đầu chó và chuột cống.

Ví dụ 6: Tính đặc hiệu của các dòng vô tính được tối ưu hóa ái lực đối với α -syn nguyên thể được xác định bằng bào kế chảy

Tính đặc hiệu của các IgG kháng α -syn được làm tối ưu hóa ái lực, aslo0452 ngl-3 và aslo0543, để liên kết với α -syn nguyên thể, nội sinh của người được xác định bằng bào kế chảy sử dụng các dòng tế bào âm tính và dương tính với α -syn.

Nói một cách ngắn gọn, tế bào u nguyên bào thần kinh SHSY5Y (dương tính với α -syn) và tế bào ung thư vú BT-20 (âm tính với α -syn) được cố định trong formaldehyt 0,01% và sau đó được làm thấm thấu bằng Tween 20 0,5% (theo thể tích) trước khi ủ bằng các kháng thể kháng α -syn, kháng thể đối chứng dương hoặc đối chứng isotyp. Sau khi rửa kỹ, kháng thể đã liên kết được phát hiện bằng cách ủ với kháng thể thứ cấp kháng IgG của người hoặc kháng IgG của chuột-FITC. Sau khi rửa thêm, các tế bào được phân tích bằng thiết bị FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) và việc phân tích số liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Số liệu được vẽ đồ thị dưới dạng biểu đồ thể hiện sự khác biệt giữa các tế bào được nhuộm màu một mình so với các tế bào được nhuộm màu bằng kháng thể sơ cấp. Kết quả trên Fig. 7A cho thấy sự chuyển dịch tín hiệu huỳnh quang trong sự có mặt của asyn0087 (panen D) trong các tế bào SH-SY5Y dương tính với α -syn, so với kháng thể thứ cấp và đối chứng isotyp một mình (panen B), biểu thị sự nhận biết α -syn được biểu hiện nội sinh. Asyn0087 không liên kết với dòng tế bào ung thư vú của người âm tính với α -syn, BT-20 (panen C). Kết quả trên Fig. 7B thể hiện sự chuyển dịch mạnh tín hiệu huỳnh quang trong sự có mặt của aslo0452 ngl-3 hoặc aslo0543 (panen H) so với kháng thể đối chứng dương, 4D6 trên tế bào SH-SY5Y dương tính với α -syn (panen F) và không có sự chuyển dịch trên tế bào BT-20 âm tính với α -syn

(panen G). Điều này chứng tỏ rằng cả aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đều liên kết với α -syn của người nội bào được biểu hiện nội sinh, nguyên thể.

Ví dụ 7: Tính đặc hiệu của các IgG kháng α -syn đã được làm tối ưu hóa đối với α -syn của người đã được kết tụ sử dụng thử nghiệm DELFIA ELISA

Các chế phẩm dạng sợi nhỏ hoặc các khối kết tụ của α -syn của người được tạo ra như được mô tả bởi Emadi *et al.* (Emadi *et al.*, Biochemistry (2004), 43: 2871-2878.; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Nói một cách ngắn gọn, 200 μ l α -syn tái tổ hợp 50 μ M được định phần phân ước vào ống Sarstedt 1,8 ml và được đặt trong thiết bị ủ có lắc ở nhiệt độ 37°C trong 3 ngày ở tốc độ 280 vòng/phút. Sự có mặt của α -syn đã được kết tụ được xác định nhờ sự kết hợp của Thioflavin T được bổ sung đến nồng độ cuối cùng bằng 10 μ M, được ủ trong bóng tối trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và số đọc huỳnh quang ở bước sóng kích thích bằng 450 nm và bước sóng phát xạ bằng 485 nm trên thiết bị đọc vi đĩa Envision.

Tính đặc hiệu của các IgG kháng α -syn đã được làm tối ưu hóa ái lực, aslo0452 ngl-3 và aslo0543, và kháng thể chính asyn0087, đối với α -syn của người đã được kết tụ được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bắt giữ kháng thể DELFIA®. Thử nghiệm này xác định sự bắt giữ α -syn của người đã được kết tụ bằng aslo0452 ngl-3, aslo0543 hoặc asyn0087 trong ELISA từng cặp. Nói một cách ngắn gọn, kiểu IgG1 chuột của kháng thể kháng α -syn được cố định bên trên lỗ của đĩa vi chuẩn độ có 96 lỗ (Nunc). Sau khi phong bế, α -syn của người đã kết tụ hoặc dạng monome được ủ trong các lỗ. Sau khi rửa, α -syn của người đã được bắt giữ được phát hiện bằng cách bổ sung kiểu IgG1 TM của người của cùng kháng thể kháng α -syn và sau đó, thể liên hợp kháng IgG của người-Europi (Perkin Elmer) hoặc thể liên hợp kháng IgG của người-HRP. Sau khi ủ và rửa, chất phát hiện thích hợp được bổ sung (Dung dịch tăng cường TMB hoặc DELFIA, một cách tương ứng) và đĩa được đọc trên thiết bị đọc đĩa vi chuẩn độ.

Trong thử nghiệm này, chỉ có α -syn của người đã được kết tụ sẽ được bắt giữ và được phát hiện vì nó thể hiện nhiều bản sao của cùng epitop trên khối kết tụ đơn. Đối với α -syn dạng monome, chỉ có một bản sao epitop có mặt, do đó kháng thể thử cấp phát hiện không thể liên kết trong sự có mặt của kháng thể bắt giữ. Số liệu được tóm tắt trên Fig. 8. Thể phân lập chính, asyn0087, có khả năng liên kết với α -syn tái tổ

hợp của người đã được kết tụ. Do đó, epitop mà asyn0087 liên kết với tự nó không có liên quan đến sự kết tụ của α -syn. Cả aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đều giữ được khả năng của chúng để liên kết với α -syn tái tổ hợp của người đã được kết tụ.

Ví dụ 8: Tính đặc hiệu của các IgG kháng α -syn được làm tối ưu hóa trong các mô có liên quan đến bệnh bằng hóa mô miễn dịch

Tính đặc hiệu của các IgG kháng α -syn được làm tối ưu hóa ái lực, aslo0452 ngl-3 và aslo0543, và kháng thể chính asyn0087, đối với các dạng có liên quan đến bệnh của α -syn của người được xác định bằng cách nhuộm màu hóa mô miễn dịch đối với mô não bị bệnh Parkinson. Kết quả được thể hiện trên Fig. 9 và chứng tỏ rằng giống như asyn0087, cả aslo0452 ngl-3 và aslo0543 đều có thể nhận biết các dạng bệnh lý có liên quan đến bệnh của α -syn của người trong các lát cắt mô não bị bệnh Parkinson, bao gồm thể Lewy, sợi trục Lewy, khối kết tụ neuron, chấm Lewy và mô não nền. Không quan sát thấy sự nhuộm màu không đặc hiệu ở mô não bình thường hoặc khỏe mạnh.

Ví dụ 9: Xác định ái lực kháng thể kháng α -syn

Hằng số phân ly ở trạng thái cân bằng (K_D) đối với IgG kháng α -syn đối với α -syn của người được xác định bằng cách sử dụng hai công nghệ nền tảng: Octet Red (Forte Bio) và KinExA (Sapidyne Instruments).

Cả hai hệ thử nghiệm đều cho thấy sự phù hợp tốt, cho thấy rằng ái lực aslo0452 ngl-3 nằm trong khoảng dưới nano mol. Bảng 1 thể hiện các số đo ái lực thu được đối với các dòng vô tính kháng α -syn quan trọng được tạo ra trong suốt quá trình phân lập chính và tối ưu hóa chính.

Ví dụ 9.1: Ái lực của aslo0452 ngl-3 theo Octet

Ái lực của aslo0452 ngl-3-IgG đối với avi-tag α -syn-Flag-His của người tái tổ hợp dạng monome được biểu hiện nhờ vi khuẩn được ước tính bằng cách sử dụng thiết bị Octet Red. Aslo0452 ngl-3 được trộn trước với các nồng độ khác nhau của mỗi phối tử cho đến khi đạt đến trạng thái cân bằng. Lượng kháng thể tự do sau đó được xác định bằng cách sử dụng Octet bằng cách bắt giữ aslo0452 ngl-3 tự do sử dụng α -syn đã được biotin hóa được cố định bên trên thiết bị cảm ứng được phủ streptavidin. Lượng kháng thể tự do phát hiện được ở mỗi nồng độ α -syn được vẽ đồ thị so với nồng độ của

phối tử và phần mềm KinExA được sử dụng để tính toán hằng số phân ly ở trạng thái cân bằng (K_D). Kết quả thể hiện trong Bảng 1 chứng tỏ rằng aslo0452 ngl-3 IgG liên kết với α -syn của người với ái lực bằng 106 pM.

Ví dụ 9.2: Ái lực của aslo0452 ngl-3 theo KinExA

Ngoài ra, ái lực pha dung dịch (K_D) của aslo0452 ngl-3 IgG đối với α -syn được biotin hóa của người dạng monome được biểu hiện nhờ vi khuẩn tái tổ hợp được xác định bằng cách sử dụng thiết bị KinExA (Sapidyne Instruments). Aslo0452 ngl-3 được trộn trước với các nồng độ khác nhau của mỗi phối tử cho đến khi đạt đến trạng thái cân bằng. Lượng kháng thể tự do sau đó được xác định bằng cách sử dụng KinExA bằng cách bắt giữ aslo0452 ngl-3 tự do sử dụng hạt được phủ α -syn, rửa vật liệu không được liên kết và phát hiện kháng thể đã liên kết sử dụng kháng thể đặc hiệu loại được đánh dấu huỳnh quang. Lượng kháng thể tự do được phát hiện ở mỗi nồng độ α -syn được vẽ đồ thị so với nồng độ của phối tử và phần mềm KinExA được sử dụng để tính toán hằng số phân ly ở trạng thái cân bằng (K_D). Kết quả thể hiện trong Bảng 1 chứng tỏ rằng aslo0452 ngl-3 IgG liên kết với α -syn với ái lực bằng 74 pM, thể hiện sự phù hợp tốt với thử nghiệm ái lực pha dung dịch Octet trên đây.

Ví dụ 9.3: Ái lực của mảnh aslo0452 ngl-3 Fab theo KinExA

Mảnh aslo0452 ngl-3 Fab liên kết với α -synuclein với ái lực cao. Giá trị K_D của mảnh aslo0452 ngl-3 Fab đối với α -synuclein, như được xác định bằng phân tích KinExA (như được mô tả trong ví dụ trên đây đối với kháng thể đầy đủ), là 174 pM (95% CI: 15-177 pM).

Ví dụ 10: Ảnh hưởng của aslo0452 ngl-3 đến mức α -synuclein tự do chưa được liên kết trong dịch mô (ISF) vỏ trước trán của chuột cống Sprague Dawley đực

Chuột cống Sprague Dawley đực trưởng thành (293-417 g; Harlan, Hà Lan) được gây mê và thanh dẫn được cấy trong vỏ trước trán.

Một ngày trước khi thử nghiệm, các đầu dò kéo dài (1-3 MDa màng polyetylen 4 mm) được cấy trong vỏ trước trán sử dụng khung có vị trí xác định trong không gian (tọa độ đối với đầu dò: AP = -3,4 mm (đối với thóp), bên + 0,8 mm (đối với đường giữa), bụng -5,0 mm (đối với màng cứng), thanh răng cửa được đặt ở -3,3 mm (tất cả các tọa độ là theo Paxinos and Watson, The rat brain in stereotaxic coordinates,

Academic Press, New York, 6th edition 2008). Các đầu dò được gắn với sợi bằng đinh vít bằng thép không gỉ và bột hàn răng.

Vào ngày thử nghiệm, đầu dò vi thẩm tách kéo đẩy được nối với ống PEEK mềm dẻo (Western Analytical Products Inc. USA; PK005-020) với bơm vi truyền dịch (Harvard) và được truyền CSF nhân tạo (perfusate), chứa NaCl 147 mM, KCl 3,0 mM, CaCl₂ 1,2 mM, và MgCl₂ 1,2 mM + BSA 0,2% ở tốc độ dòng 0,5 µL/phút. Lỗ ra của đầu dò được nối với ống FEP mềm dẻo. Sau tối thiểu hai giờ tái ổn định, aslo0452 ngl-3 được phối chế chỉ trong PBS hoặc PBS (chất dẫn thuốc) được định liều ở 30 hoặc 0 mg/kg, một cách tương ứng. Hợp chất được sử dụng ở nồng độ 2 mL/kg trong tĩnh mạch. Các mẫu vi thẩm tách được thu gom ở các khoảng cách 120 phút. Mẫu được thu gom trong các lọ mini (Microbiotech/se AB, Sweden; 4001029). Tất cả các mẫu đều được bảo quản ở nhiệt độ -80°C.

Để xác định nồng độ α -synuclein tự do trong ISF của chuột cống, các mẫu vi thẩm tách trước tiên được cho qua bước kết tủa miễn dịch để loại bỏ aslo0452 ngl-3. Phép kết tủa miễn dịch sẽ đồng kết tủa α -synuclein đã được liên kết với kháng thể trị liệu, trong khi α -synuclein “tự do” không được liên kết vẫn còn trong dịch nổi bề mặt. Dung dịch chứa hạt protein A (Dynabeads® Protein A) được bổ sung vào đĩa 96 lỗ không có gờ (polypropylen 0,2 mL) và được rửa hai lần bằng TBST (TBS 50mM cộng với Tween 20 0,1%) sử dụng nam châm (DynaMag™ 96 side) để tách riêng các hạt ra khỏi dung dịch. Các mẫu vi thẩm tách ISF của chuột đã được làm tan đông (10 hoặc 20 µL) được bổ sung vào mỗi lỗ, được trộn với các hạt bằng cách tạo nhỏ giọt lên và xuống và được ủ ở nhiệt độ 4°C có quay nghiêng trong 10 phút. Sau đó, các hạt được tạo nhỏ giọt bằng cách sử dụng nam châm hai lần để đảm bảo loại bỏ hoàn toàn các hạt. Các mẫu ISF đã được kết tủa miễn dịch được chuyển đến đĩa 96 lỗ từ kit ELISA kháng α -synuclein (Sensolyte™ Quantitative ELISA kit, human/mouse/rat, AnaSpec, US, AS-55550) với đệm pha loãng mẫu đã được bổ sung đến tổng thể tích bằng 100 µL. Mẫu hiệu chuẩn, 100 µL cho mỗi lỗ, được bổ sung vào đĩa trong hai bản sao và 50 µL dung dịch xử lý kháng thể phát hiện được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa được ủ ở nhiệt độ +4-8°C qua đêm trong khi lắc và được bảo vệ khỏi ánh sáng và sau đó được rửa sáu lần bằng 350 µL đệm rửa. Cuối cùng, 100 µL cơ chất màu TMB được bổ sung vào mỗi lỗ và đĩa được ủ trong 10-15 phút ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối. Để làm dừng phản ứng, 50 µL dung dịch làm dừng được bổ sung vào mỗi lỗ và đĩa

được đọc trong 2 giờ ở bước sóng hấp thụ 450 nm. Tiến hành định lượng bằng cách vẽ đồ thị đáp ứng của đường cong chuẩn dưới dạng đơn vị hấp thụ trên thang tuyến tính so với nồng độ trên thang lôga. Hàm bốn thông số được sử dụng để hiệu chỉnh đường cong.

Sự giảm phụ thuộc thời gian của α -synuclein tự do được chứng tỏ trong ISF (Fig. 10) sau một lần dùng aslo0452 ngl-3 trong tĩnh mạch với liều 30 mg/kg.

Ví dụ 11: Ảnh hưởng của aslo0452 ngl-3 đến mức α -synuclein tự do chưa được liên kết trong CSF của chuột cống Sprague Dawley đực

Chuột cống Sprague Dawley đực trưởng thành được gây mê và ống thông được đặt trong bể lớn để hỗ trợ việc lấy mẫu CSF. Ống thông nằm trong dài 0,8 cm được chèn vào bể lớn, và được ngoại hiện thông qua đường rạch trên đỉnh sọ. Đầu của ống thông CSF được cố định vị trí bằng bột hàn răng acrylic và được gắn với sọ bằng ba đinh vít bằng thép không gỉ. Các con chuột được để hồi phục tối thiểu 2 ngày trước khi sử dụng hợp chất.

Aslo0452 ngl-3 được phối chế trong đệm để định liều ở 3, 10, 30 hoặc 100 mg/kg. Hợp chất hoặc chất dẫn thuốc một mình được sử dụng ở 2 mL/kg trong tĩnh mạch.

Sau khi thu gom ít nhất bốn mẫu CSF sạch được lấy trong tối thiểu hai ngày, hợp chất được sử dụng. Tất cả các con chuột đều được định liều bằng aslo0452 ngl-3 hoặc chất dẫn thuốc vào ngày “0”. Mẫu CSF được thu gom ở mỗi thời điểm đã nêu. Tất cả các mẫu đều được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi vận chuyển.

Để xác định α -synuclein tự do trong CSF, α -synuclein đã liên kết với aslo0452 ngl-3, được loại bỏ bằng kết tủa miễn dịch (IP) trước khi phân tích. IP sẽ đồng kết tủa α -synuclein đã được liên kết với kháng thể trị liệu, trong khi α -synuclein “tự do” không được liên kết vẫn còn trong dịch nổi bề mặt. Việc xác định mức α -synuclein tự do trong dịch nổi bề mặt được thực hiện bằng cách sử dụng kit ELISA bán trên thị trường thu được từ Anaspec. Phân tích được thực hiện như được mô tả đối với kết quả ISF (như được mô tả trong Ví dụ 10).

Sự giảm phụ thuộc thời gian và liều lượng của α -synuclein tự do được chứng tỏ trong CSF (Fig. 11) sau một lần dùng trong tĩnh mạch aslo0452 ngl-3 trong khoảng liều lượng 3-100 mg/kg.

Ví dụ 12: Xác định đặc điểm chức năng của aslo0452 ngl-3 bằng hiệu quả làm giảm sự lan rộng alpha-synuclein trong mô hình thử nghiệm *in vivo* lentivirut về bệnh lý alpha-synuclein

Khả năng của kháng thể kháng alpha-synuclein ái lực cao, aslo0452 ngl-3, để phong bế sự lan rộng của alpha-synuclein được nghiên cứu bằng cách sử dụng mô hình thử nghiệm ở chuột *in vivo* lentivirut về bệnh lý alpha-synuclein. Cho mục đích này, cả chuột kiểu đại không chuyển gen (không tg) và chuột chuyển gen biểu hiện qua mức alpha-synuclein (α -syn tg) đều được tiêm vectơ lentivirut mã biểu hiện alpha-synuclein (LV- α -syn) vào vùng hải mã phải, và sau đó được gây miễn dịch thụ động hằng tuần trong 13 tuần bằng kháng thể IgG1 của chuột nhất kháng alpha synuclein bao gồm aslo0452 ngl-3, và IgG1 của chuột nhất đối chứng isotyp NIP228. Vào cuối khoảng thời gian gây miễn dịch, các con chuột được làm chết không đau đớn và não của chúng được cố định trong 4% PFA, sau đó được cắt theo dạng hình vành và được phân tích bằng hóa tể bào miễn dịch với phân tích hình ảnh tự động đối với mức phản ứng miễn dịch của alpha-synuclein cùng bên và đối bên đối với vị trí tiêm LV- α -syn.

Phẫu thuật và gây miễn dịch thụ động

Các con chuột kiểu đại không chuyển gen từ ba đến bốn tháng tuổi (không tg; n=40) và chuột chuyển gen alpha-synuclein (α -syn tg; n=40) nhận được một lần tiêm một bên vào vùng hải mã phải (-2,0, 1,5, -1,3 từ thóp) vectơ lentivirut biểu hiện alpha-synuclein (LV- α -syn). Hai tuần sau khi phẫu thuật tiêm LV- α -syn, các con chuột nhận được liều hằng tuần của kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein: aslo0452 ngl-3 (không tg n=10; α -syn tg n=10), aslo0452 ngl-3 D265A (không tg n=10; α -syn tg n=10), 9E4 (không tg n=10; α -syn tg n=10), hoặc chúng được định liều bằng IgG1 của chuột đối chứng isotyp NIP228 (không tg n=10; α -syn tg n=10).

Tất cả các IgG của chuột đều được định liều ở 20 mg/kg bằng con đường trong màng bụng (IP) trong 13 tuần. Các con vật được nuôi trong lồng theo nhóm với số lượng tối đa hoặc 4 con mỗi lồng. Các con vật được giữ chu kỳ sáng tối 12/12 với sự tiếp cận thức ăn và nước tùy ý. Các lồng được thay đổi một tuần một lần và được theo

đôi hằng ngày. Sự kiện bất lợi bất kỳ được báo cáo. Tất cả các con vật đều dung chịu được quy trình phẫu thuật cũng như quá trình gây miễn dịch. Vào cuối khoảng thời gian điều trị bằng kháng thể, các con chuột được làm chết không đau đớn theo hướng dẫn xử lý nhân đạo đối với động vật và não của chúng được cắt theo từng dãy trong trục hình vành và được đánh giá theo phân tích bệnh lý thần kinh về sự lan rộng alpha-synuclein bằng phương pháp hóa tế bào miễn dịch.

Hóa tế bào miễn dịch alpha-synuclein

Não được loại bỏ, được cố định trong paraformaldehyt 4%, và các lát cắt được cắt ở khoảng cách 40 μm trong trục hình vành sử dụng dao phẫu có lưỡi rung (vibratome) và được bảo quản ở nhiệt độ -30°C trong môi trường bảo vệ cryo (30% glycerin, 30% etylen glycol, 40% PBS). Sau khi rửa bằng PBS, và bước đệm phong bế, các lát cắt được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C với kháng thể sơ cấp (mAb kháng alpha-synuclein SYN-1 từ BD ở tỷ lệ pha loãng 1:500), được rửa trong PBS và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với kháng thể thứ cấp (kháng IgG của chuột được biotin hóa từ Vector Laboratories ở tỷ lệ pha loãng 1:100). Sau các bước rửa bằng PBS cuối cùng, sự nhuộm màu alpha-synuclein được định vị bằng cách sử dụng hệ phát hiện phức hợp avidin/biotin-peroxidaza (Elite ABC, Vector Laboratories). Sau đó, các lát cắt được phân tích bằng phân tích hình ảnh tự động đối với các mức alpha-synuclein cùng bên và đối bên với vị trí tiêm vectơ lentivirus (LV- α -syn).

Thống kê

Số liệu tạo ra từ quá trình thu nhận hình ảnh tự động mức alpha-synuclein đối với nhóm điều trị không tg và α -syn tg được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism, San Diego California, USA. ANOVA một chiều được thực hiện với kiểm định Dunnett's Multiple Comparison post-test. Số liệu thể hiện trên các hình vẽ được đưa ra dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn của giá trị trung bình (SEM). Độ chênh lệch giữa các nhóm được xem là có ý nghĩa về mặt thống kê khi $p < 0,05$. Tất cả các phân tích đều được thực hiện dưới dạng mù đối với nhà xếp hạng. Nhóm điều trị bằng kháng thể cũng mù đối với nhà xếp hạng.

Kết quả

Ở cả các con chuột không phải tg và các con chuột α -syn tg, tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein trên phía cùng bên được tiêm LV- α -syn là rất mạnh trong mạng lưới thần kinh và che phủ hầu hết bề mặt của vùng hải mã (Fig. 12 A, Fig. 15 A; NIP228 – Cùng bên). Vùng hải mã đối bên không được tiêm của các con chuột không phải tg và các con chuột α -syn tg cũng thể hiện mức cao của tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein, cho thấy rằng alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus đã lan rộng từ vùng hải mã phải được tiêm đến vùng hải mã trái (Fig. 12 A, Fig. 15 A; NIP228 – Đối bên). Trong mô hình thử nghiệm ở chuột tiêm alpha-synuclein lentivirus này, các thử nghiệm trước đây đã cho thấy rằng chỉ có protein alpha-synuclein đã được biểu hiện mới lan rộng đến phía đối bên mà không có bằng chứng về sự chuyển của chính lentivirus, như được xác định bằng phân tích PCR (số liệu không được thể hiện).

Mức alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus trong vùng hải mã cùng bên và đối bên ở các con chuột không phải tg mà được gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể 9E4 (9E4 – kiểu PRX002 ở chuột (Prothena)) hầu như tương đồng đối với mức alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus trong vùng hải mã cùng bên và đối bên ở các con chuột không phải tg mà được gây miễn dịch thụ động bằng IgG1 của chuột đối chứng isotyp NIP228 (Fig. 12 A,B,C; 9E4 so với NIP228), cho thấy rằng 9E4 khi được định liều ở 20 mg/kg hằng tuần trong 13 tuần thông qua con đường IP không phong bế sự phân tán của alpha-synuclein trong mô hình thử nghiệm sự lan rộng alpha-synuclein này.

Trái lại, cả mức alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus trong vùng hải mã cùng bên và đối bên ở các con chuột không phải tg mà được gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể aslo0452 ngl-3 hoặc kiểu đột biến không có chức năng tác động của aslo0452 ngl-3 (aslo0452-ngl-3-D265A), ở đó sự thay thế axit aspartic bằng alanin ở vị trí 265 (D265A) trong IgG1 của chuột dẫn đến sự tổn hao tương tác giữa isotyp này và các thụ thể Fc IgG ái lực thấp (Fc γ RIIB và Fc γ RIII) tìm thấy trên vi tế bào thần kinh, đều thấp hơn một cách đáng kể so với mức alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus trong vùng hải mã cùng bên và đối bên ở các con chuột không phải tg mà được gây miễn dịch thụ động bằng IgG1 của chuột đối chứng isotyp NIP228 (Fig. 12 A,B,C; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A so với NIP228). Điều này cho

thấy rằng việc gây miễn dịch thụ động các con chuột bằng aslo0452-ngl-3 hoặc kiểu đột biến D265A không có chức năng tác động của aslo0452-ngl-3 phong bế mạnh mẽ sự lan rộng của alpha-synuclein trong mô hình thử nghiệm ở chuột về bệnh lý alpha-synuclein này. Các kết quả tương tự thu được khi vector LV- α -syn được tiêm vào vùng hải mã phải của các con chuột α -syn tg; việc gây miễn dịch thụ động bằng aslo0452-ngl-3 hoặc aslo0452-ngl-3-D265A nhưng không bằng 9E4 dẫn đến sự giảm mạnh và có ý nghĩa về mặt thống kê đối với cả mức phản ứng miễn dịch alpha-synuclein cùng bên và đối bên mức trong vùng hải mã khi so với các con chuột α -syn tg được điều trị bằng NIP228 (Fig. 15 A,B,C).

Ở độ khuếch đại cao hơn, các lắng đọng có tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus có thể quan sát thấy dọc theo cả các sợi trục cùng bên của phía được tiêm và các sợi trục đối bên của phía không được tiêm của các con chuột không phải tg (Fig. 13 A; mũi tên màu đen thể hiện sợi trục xuyên hải mã), gợi ý rằng sự lan rộng alpha-synuclein đến vùng hải mã đối bên có thể chủ yếu xảy ra dọc theo sợi trục (sự lan rộng xuyên sợi trục). Mức lắng đọng alpha-synuclein sợi trục cùng bên và đối bên ở các con chuột không phải tg được gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể 9E4 hoặc IgG1 của chuột đối chứng isotyp NIP228 là không khác biệt một cách đáng kể (Fig. 13 A,B,C; 9E4 so với NIP228), cho thấy rằng dưới các điều kiện thử nghiệm của các tác giả sáng chế, 9E4 không tác động đến mức lắng đọng alpha-synuclein sợi trục cũng không làm giảm sự phân tán của alpha-synuclein dọc theo sợi trục trong mô hình thử nghiệm sự lan rộng bệnh lý alpha-synuclein-lentivirus này.

Trái lại, cả mức lắng đọng alpha-synuclein sợi trục cùng bên và đối bên ở các con chuột không phải tg được gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể aslo0452 ngl-3 hoặc kiểu đột biến không có chức năng tác động của aslo0452-ngl-3 (aslo0452-ngl-3-D265A), đều thấp hơn một cách đáng kể so với mức lắng đọng alpha-synuclein sợi trục ở các con chuột không phải tg được điều trị bằng IgG1 của chuột đối chứng isotyp NIP228 (Fig. 13 A,B,C; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A so với NIP228), cho thấy rằng việc gây miễn dịch thụ động các con chuột bằng aslo0452-ngl-3 hoặc kiểu đột biến D265A không có chức năng tác động của aslo0452-ngl-3 loại bỏ các lắng đọng alpha-synuclein sợi trục và phong bế mạnh mẽ sự chuyển alpha-synuclein cùng

bên đến đối bên dọc theo sợi trục trong mô hình thử nghiệm ở chuột về bệnh lý alpha-synuclein-lentivirus này.

Các kết quả rất tương tự thu được khi vector LV- α -syn được tiêm vào vùng hải mã phải của các con chuột α -syn tg; việc gây miễn dịch thụ động bằng aslo0452-ngl-3 hoặc aslo0452-ngl-3-D265A nhưng không bằng 9E4 dẫn đến sự giảm mạnh và có ý nghĩa về mặt thống kê đối với cả mức phản ứng miễn dịch alpha-synuclein cùng bên và đối bên dọc theo sợi trục khi so với các con chuột α -syn tg được điều trị bằng NIP228 (Fig. 16 A,B,C).

Ở các con chuột không phải tg được tiêm LV- α -syn, ở độ khuếch đại cao hơn, tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein rất mạnh được phát hiện trong mạng lưới thần kinh của vùng hải mã cùng bên và ở mức độ ít hơn trong mạng lưới thần kinh của vỏ não mới cùng bên (Fig. 14 A). Ngoài ra, sự lắng đọng alpha-synuclein rất mạnh được phát hiện trong nhiều thể tế bào neuron có khả năng nhận diện (thể tế bào - soma) trong vùng CA1 của vùng hải mã cùng bên và tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein yếu hơn được phát hiện trong các neuron lớp 5 của vỏ não mới cùng bên (Fig. 14; mũi tên màu đen). Trong khi việc điều trị bằng kháng thể 9E4 không làm thay đổi đáng kể số lượng neuron hải mã CA1 cùng bên hoặc neuron vỏ não mới lớp 5 cùng bên chứa các lắng đọng alpha-synuclein khi so với các con chuột không phải tg được gây miễn dịch bằng IgG của chuột đối chứng isotyp NIP228 (Fig. 14 A,B,C; 9E4 so với NIP228), các con chuột không phải tg được điều trị bằng kháng thể aslo0452 ngl-3 hoặc kiểu đột biến không có chức năng tác động của aslo0452-ngl-3 (aslo0452-ngl-3-D265A) làm giảm đáng kể số lượng neuron CA1 cùng bên và neuron cùng bên lớp 5 chứa các lắng đọng alpha-synuclein so với các con chuột không phải tg được điều trị bằng IgG của chuột đối chứng isotyp NIP228 (Fig. 14 A,B,C; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A so với NIP228).

Tương tự, cường độ của tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein trong mạng lưới thần kinh và neuron của vùng CA1 cùng bên của vùng hải mã và vùng cùng bên lớp 5 của vỏ não mới thấp hơn một cách rõ rệt ở các con chuột không phải tg được điều trị bằng aslo0452-ngl-3 và được điều trị bằng aslo0452-ngl-3-D265A so với các con chuột không phải tg được điều trị bằng IgG của chuột đối chứng isotyp NIP228 (Fig. 14 A; aslo0452-ngl-3 & aslo0452-ngl-3-D265A so với NIP228).

Các kết quả tương tự thu được khi vector LV- α -syn được tiêm vào vùng hải mã phải của các con chuột α -syn tg; việc điều trị bằng aslo0452-ngl-3 hoặc aslo0452-ngl-3-D265A nhưng không bằng 9E4 dẫn đến sự giảm có ý nghĩa về mặt thống kê số lượng các neuron chứa tính phản ứng miễn dịch alpha-synuclein mạnh trong vùng hải mã CA1 cùng bên và vùng vỏ não mới lớp 5, cũng như trong vùng hải mã CA1 đối bên, khi so với các con chuột α -syn tg được điều trị bằng NIP228 (Fig. 17 A,B,C,D).

Đã chứng tỏ được rằng việc gây miễn dịch thụ động các con chuột kiểu đại không tg hoặc các con chuột α -syn tg mà đều đã được tiêm ở vị trí xác định trong không gian với vector lentivirus mà điều khiển sự biểu hiện của alpha-synuclein của người trên một phía của vùng hải mã, với kháng thể IgG1 của chuột kháng alpha-synuclein ái lực cao aslo0452-ngl-3 làm giảm mạnh sự lan rộng xuyên sợi trục cùng bên đến đối bên của alpha-synuclein được biểu hiện theo cách lentivirus được quan sát thấy trong mô hình thử nghiệm ở chuột về sự lan truyền alpha-synuclein này. Tính chất ức chế sự lan rộng alpha-synuclein *in vivo* của kháng thể kháng alpha-synuclein mới được bộc lộ này là dấu hiệu biểu thị sự liên kết với epitop khác nhau của alpha-synuclein của người so với các kháng thể không ức chế sự lan rộng trong mô hình thử nghiệm đã được thử nghiệm, ví dụ kháng thể 9E4.

Ngoài ra, số liệu cho thấy rằng kiểu đột biến D265A không có chức năng tác động của aslo0452-ngl-3 có hiệu quả tương đương so với aslo0452-ngl-3 về tác dụng làm giảm sự lan rộng alpha-synuclein trong mô hình thử nghiệm, cho thấy rằng việc ngăn ngừa sự lan rộng alpha-synuclein qua trung gian kháng thể không đòi hỏi chức năng tác động có liên quan đến Fc làm cơ chế tác động chính, và cụ thể nó cho thấy rằng dường như không có yêu cầu hoặc vai trò đối với thụ thể Fc (FcγRIIB và FcγRIII) có mặt trên vi thể bào thần kinh trong việc phong bế sự lan rộng alpha-synuclein qua trung gian kháng thể.

Tóm lại, các kháng thể theo sáng chế mà nhắm đích alpha-synuclein, cũng như mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có khả năng cải biến bệnh trong PD hoặc DLB hoặc MSA bằng cách phong bế hoặc làm chậm sự hấp thu alpha-synuclein có tính chất bệnh lý vào các tế bào thần kinh và ngăn ngừa sự gieo rắc và truyền bệnh lý alpha-synuclein giữa các vùng não được liên kết về mặt giải phẫu. Theo cách này, các kháng

thể nhắm đích alpha-synuclein có thể điều trị hoặc ngăn ngừa sự tiến triển bệnh và có lợi ích trị liệu đối với bệnh nhân bị bệnh lý synuclein như PD, DLB hoặc MSA.

Ví dụ 13: Tạo ra kháng thể đặc hiệu kép 0452 ngl-3-BBBt0626gl

Các kháng thể đặc hiệu kép nêu làm ví dụ theo sáng chế chứa khung TM IgG1 của người kết hợp với mảnh chuỗi đơn (scFv) của BBBt0626gl, được ghép với đầu tận N (dạng Bis2) hoặc đầu tận C (dạng Bis3) của chuỗi nặng của aslo0452 ngl-3 được tạo ra như được mô tả dưới đây.

Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, ở dạng Bis2, được tạo ra bằng cách sản xuất theo cách tổng hợp mảnh ADN mã hóa Bbbt0626glscFv-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3 VH hoặc Bbbt0626wt-(G4S)x2-aslo0452 ngl-3 VH mà chứa vị trí giới hạn endonucleaza kẹp bên BssHII và BstEII, ở phía trên của Bbbt0626glscFv hoặc Bbbt0626wt và ở phía dưới của aslo0452 ngl-3 VH, một cách tương ứng. Sau đó, các mảnh ADN đã được tiêu hóa được tách dòng có định hướng vào khung vector hIgG1TM.

Kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế, ở dạng Bis3 được tạo ra bằng cách khuếch đại PCR sau đó là tách dòng có định hướng sử dụng vị trí endonucleaza giới hạn (SfiI và XbaI). Hai mảnh PCR được tạo ra: (1) khuếch đại miền hIgG1TM -CH3 từ vị trí giới hạn SfiI đến đầu đầu tận C của miền CH3 và (2) mảnh PCR chồng chập với oligo PCR xuôi kết hợp đầu đầu tận C của cầu nối CH3-(G4S)x3 (SEQ ID NO: 57) và đầu đầu tận N của Bbbt0626gl scFv cùng với oligo khuếch đại đầu đầu tận C của Bbbt0626gl scFv và trình tự vector phía dưới trực tiếp qua vị trí giới hạn XbaI. Cả hai mảnh PCR đều được nối cùng nhau trong phản ứng PCR kéo xuyên lỗ và sau đó được tách dòng có định hướng vào pEU1_4 (vector IgG1TM của người) thông qua vị trí endonucleaza giới hạn SfiI và XbaI.

Các kháng thể đặc hiệu kép này được biểu hiện trong hệ biểu hiện gốc CHO và các kháng thể thu được được tinh chế thông qua phương pháp tinh chế cột protein A. Tất cả các kháng thể đặc hiệu kép có nguồn gốc từ Bbbt0626 đều được thử nghiệm về sự liên kết *in vitro* với dòng tế bào nội mô não chuột (b.end3) để xác nhận hoạt tính liên kết của gốc vận chuyển qua BBB và cũng thử nghiệm về sự cạnh tranh liên kết của aslo0452 ngl-3 trong thử nghiệm cạnh tranh epitop dựa trên HTRF để xác nhận sự liên kết với epitop aslo0452 ngl-3.

Bảng 1

ID của dòng vô tính	Phương pháp	Ái lực - K _D	95% CI
asyn0087	Octet	> 1,0 µM	n/a
aslo0452 ngl-1	Octet	1,1 nM	0,3-2,3 nM
aslo0452 ngl-3	KinExa	74 pM	15-177 pM
aslo0452 ngl-3	Octet	106 pM	10-292 pM
aslo0543	KinExa	108 pM	34-223 pM
aslo0543	Octet	113 pM	5-333 pM

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với α -synuclein của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa: a) ba CDR chuỗi nặng có trình tự: (i) H-CDR1 của SEQ ID NO: 5, (ii) H-CDR2 của SEQ ID NO: 15; và (iii) H-CDR3 của SEQ ID NO: 16, và b) ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự: (i) L-CDR1 của SEQ ID NO: 20, (ii) L-CDR2 của SEQ ID NO: 10; và (iii) L-CDR3 của SEQ ID NO: 21.
2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với α -synuclein của người với K_D ít hơn 500 pM.
3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14.
4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng chuỗi nặng biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14.
5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.
6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng chuỗi nhẹ biến đổi chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19.
7. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể.
8. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa

chứa đột biến bộ ba trong vùng Fc tương ứng với L234F/L235E/P331S được đánh số dựa trên hệ thống đánh số thứ tự Kabat.

9. Dược phẩm chứa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, và tá dược được dụng.

10. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8.

11. Phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 10, trong đó phân tử axit nucleic này chứa trình tự nucleotit đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13.

12. Phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 10, trong đó phân tử axit nucleic này chứa trình tự nucleotit đồng nhất ít nhất 90% so với trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 18.

13. Tế bào chủ chứa vectơ chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MEDIMMUNE LIMITED

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG ALPHA-SYNUCLEIN, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHẦN TỬ AXIT NUCLEIC ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 1848081-0002-091-WO1

<140>

<141>

<150> 62/344,746

<151> 2016-06-02

<160> 61

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Gln	Gly	Val	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Lys
			20					25					30		

Thr	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Ser	Lys	Thr	Lys	Glu	Gly	Val
		35					40					45			

Val	His	Gly	Val	Ala	Thr	Val	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Glu	Gln	Val	Thr
	50					55					60				

Asn	Val	Gly	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Gln	Lys
65					70					75				80	

Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Phe	Val	Lys
				85				90						95	

Lys	Asp	Gln	Leu	Gly	Lys	Asn	Glu	Glu	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Gly	Ile
			100					105					110		

Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Val	Asp	Pro	Asp	Asn	Glu	Ala	Tyr	Glu	Met	Pro
			115				120					125			

Ser	Glu	Glu	Gly	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Glu	Pro	Glu	Ala
	130					135					140

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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
 Ala 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 Gly Gly Ala Val Asn Val Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (50)..(50)
 <223> /thay thế="Ala"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (53)..(53)
 <223> /thay thế="Gly"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (54)..(54)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (101)..(101)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (102)..(102)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (103)..(103)
 <223> /thay thế="Gly"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (104)..(104)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (105)..(105)
 <223> /thay thế="Ile"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(122)
 <223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 4

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
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser His Leu 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 Gly Gly Ala Asn His Val Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<400> 5
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)..(1)
 <223> /thay thế="Ala"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (4)..(4)
 <223> /thay thế="Gly"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)..(5)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(17)
 <223> /lưu ý="Các gốc biên thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biên thể"

<400> 6
 Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> BIÊN THỂ
 <222> (3)..(3)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIÊN THỂ
 <222> (4)..(4)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIÊN THỂ
 <222> (5)..(5)
 <223> /thay thế="Gly"

<220>
 <221> BIÊN THỂ
 <222> (6)..(6)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIÊN THỂ
 <222> (7)..(7)
 <223> /thay thế="Ile"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(13)
 <223> /lưu ý="Các gốc biên thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biên thể"

<400> 7
 Gly Ala Asn His Val Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (27)..(27)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (28)..(28)
 <223> /thay thế="Gly"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (29)..(29)
 <223> /thay thế="Asp"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (30)..(30)
 <223> /thay thế="Phe"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (31)..(31)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (32)..(32)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (42)..(42)
 <223> /thay thế="Pro"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (82)..(82)
 <223> /thay thế="Leu"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (99)..(99)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (100)..(100)

<223> /thay thế="Ser"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (102)..(102)

<223> /thay thế="Ala"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (104)..(104)

<223> /thay thế="Tyr"

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(114)

<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 8

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

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
20 25 30

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Phe Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met
85 90 95

Val Trp Asp His Gly Val Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
100 105 110

Val Leu

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (6)..(6)
 <223> /thay thế="Gly"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (7)..(7)
 <223> /thay thế="Asp"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (8)..(8)
 <223> /thay thế="Phe"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (9)..(9)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (10)..(10)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 9
 Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys Tyr Arg Ile Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> BIẾN THỂ

<222> (4)..(4)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)..(5)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (7)..(7)
 <223> /thay thế="Ala"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (9)..(9)
 <223> /thay thế="Tyr"

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 11
 Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Val
 1 5

<210> 12
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<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
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser His Leu 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 Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
 100 105 110

Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	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
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	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	225	230	235
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
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	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	Glu	Glu	Met	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

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 Lys
 450

<210> 13
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(366)

<400> 13
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg
 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat
 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc
 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca tcc att tcc cac ctt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg
 192
 Ser Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat
 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt
 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg gga ggg gca aac cac ggg aag tac tac tac gga atg gac aag tgg
336

Ala Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
100 105 110

ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca
366

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

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

Ser Ser Ile Ser His Leu 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 Gly Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
100 105 110

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

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ser Ile Ser His Leu Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gly Ala Asn His Gly Lys Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Lys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45
 Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80
 Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
 115 120 125
 Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 130 135 140
 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 145 150 155 160
 Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln
 165 170 175
 Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 180 185 190
 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 195 200 205
 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

215

220

<210> 18
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 caggctgtgc tgactcagcc ggcttccctc tctgctctc ctggagcacc agccagtctc
 60

acctgcacct tgcgcagtgg ggcgcccctg ccgaagtata ggatatactg gtatcagcag
 120

aagccaggga gtctcccca gtatctcttg aggtacaaat cagacgcaga taaacaccag
 180

ggctctggag tccccagccg cttttctgga tccaaagatg ctctggccaa tgcagggatt
 240

ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attattgtat ggtttgggac
 300

caeggcgtct ggtatttcgg cggagggacc aagctgaccg tecta
 345

<210> 19
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys
 20 25 30

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

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80

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

Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

Thr Val Leu

115

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Thr Leu Arg Ser Gly Ala Pro Leu Pro Lys Tyr Arg Ile Tyr
 1 5 10

<210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Met Val Trp Asp His Gly Val Trp Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 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

Ala 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 Gly Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr 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	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220	
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	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	Ser	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	Glu	Glu	Met	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 Lys
450

<210> 23
<211> 366
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23
gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct
120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac
180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat
240

ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gggaggggca
300

cggcgcgggc gcattacta cggaatggac aaatggggcc aagggacaac ggtcacgcgc
360

tcctca
366

<210> 24
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
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
Ala 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 Gly Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys Trp
 100 105 110

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

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Gly Ala Arg Arg Gly Arg Ile Tyr Tyr Gly Met Asp Lys
 1 5 10

<210> 28
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr

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

 <210> 29
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 29
 caggctgtgc tgactcagcc ggcttcctc tctgcgtctc ctggagcatc agccagtctc
 60
 acctgcacct tgcgcagttc cggggacttc tcccggata ggatatactg gtatcagcag
 120
 aagccaggga gtctctccca gtatctctg aggtacaaat cagacgcaga taaacaccag
 180
 ggctctggag tccccagccg cttttctgga tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt
 240

ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggtgact attattgtat ggtttgggtcc
300

agcggcgctt ggtacttcgg cggagggacc aagctgaccg tcccta
345

<210> 30
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg
20 25 30
Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45
Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80
Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95
Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu
115

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Thr Leu Arg Ser Ser Gly Asp Phe Ser Arg Tyr Arg Ile Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Tyr Lys Ser Asp Ala Asp Lys His Gln Gly Ser
1 5 10

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Met Val Trp Ser Ser Gly Ala Trp Tyr
 1 5

<210> 34
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)..(1)
 <223> /thay thế="Val"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (11)..(11)
 <223> /thay thế="Leu"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (75)..(75)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(123)
 <223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 34
 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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (15)..(15)
 <223> /thay thế="Gly" or "Ala"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (28)..(28)
 <223> /thay thế="Arg"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (29)..(29)
 <223> /thay thế="Arg" or "Thr"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (32)..(32)
 <223> /thay thế="Thr"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (33)..(33)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (37)..(37)
 <223> /thay thế="Gln"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (44)..(44)
 <223> /thay thế="Ile"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (47)..(47)
 <223> /thay thế="Ile"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (50)..(50)
<223> /thay thể="Glu"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (51)..(51)
<223> /thay thể="Asp"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (57)..(57)
<223> /thay thể="Ile"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (65)..(65)
<223> /thay thể="Arg"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (68)..(68)
<223> /thay thể="Thr"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (92)..(92)
<223> /thay thể="Asn"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (93)..(93)
<223> /thay thể="Thr"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (95)..(95)
<223> /thay thể="Lys" or "His"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (96)..(96)
<223> /thay thể="Pro"

<220>
<221> BIÊN THỂ
<222> (97)..(97)
<223> /thay thể="Trp"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(108)

<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 35

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Arg Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> /thay thế="Arg"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Arg" or "Thr"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (10)..(10)

<223> /thay thế="Thr"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (11)..(11)

<223> /thay thế="Ser"

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 36

Gln Gly Asp Ser Leu Thr Ser Tyr Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (2)..(2)

<223> /thay thế="Glu"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)..(3)

<223> /thay thế="Asp"

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> /lưu ý="Các gốc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các gốc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 37

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> /thay thế="Asn"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (6)..(6)

<223> /thay thế="Thr"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)..(8)

<223> /thay thế="Lys" or "His"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (9)..(9)

<223> /thay thế="Pro"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (10)..(10)

<223> /thay thế="Trp"

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> /lưu ý="Các góc biến thể được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với các góc trong phần chú thích đối với các vị trí của biến thể"

<400> 39

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val

1 5 10

<210> 39

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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 Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

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

<400> 40
 Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 42
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 43
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val
1 5 10

<210> 47
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Bbbt0626 VH"

<400> 47
Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Arg 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 Arg Ser Ser Leu Ala Ala Ala Asp Arg Gly Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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 Gly Thr Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Thr Tyr Ser Ile Thr
1 5

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 52
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 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 Gly Thr Phe Gly Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe
 50 55 60

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

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

Ala Lys Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 53

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

<400> 53
 Thr Tyr Ser Ile Thr
 1 5

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Asp Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Pro Asn Tyr Ala Gln Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 55
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 56
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(50)
 <223> /lưu ý="Trình tự này có thể bao gồm 1-10 đơn vị lặp 'Gly Gly Gly Gly Ser'"

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Xem bản mô tả đã nộp về sự mô tả chi tiết các phần thể và các phương án được ưu tiên"

<400> 56
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser
50

```
<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

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

<400> 57
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

```
<210> 58
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 58
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

Ala 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 Lys

<210> 59

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

<400> 59
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 60
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Thr
 20 25 30
 Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
 35 40 45
 Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80
 Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Met Ile Trp His Trp Val
 100

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

Fig.1

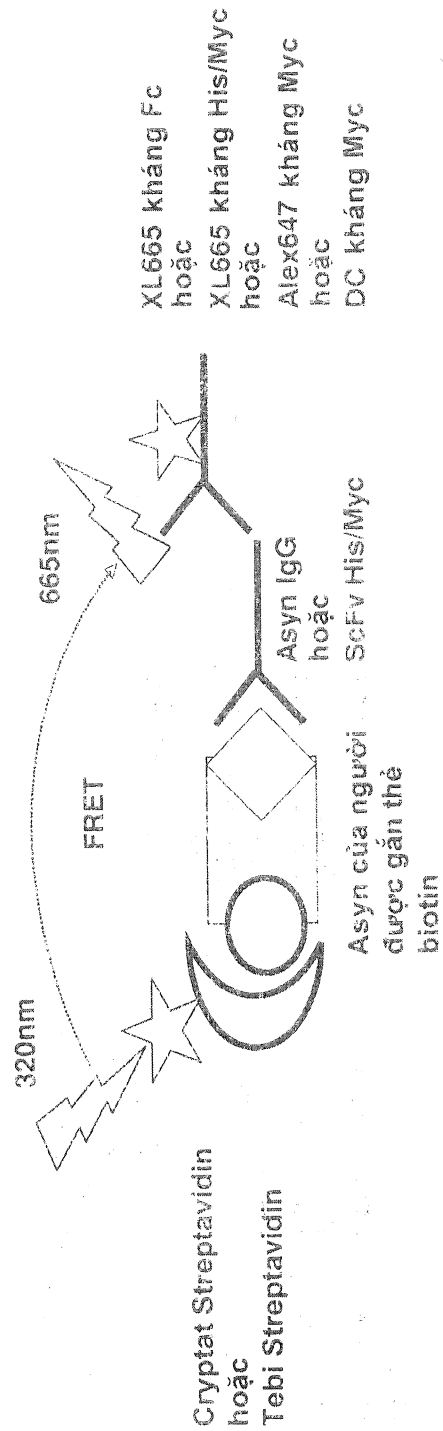


Fig.2

Sự sắp hàng VH			
asyn0087	CDR1	CDR2	
aslo0452 ngl-3	EVQLLESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSVNQAPGKGLEWVSALISGGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYIQMNSLRAEDTAVYYCAG		
aslo0543	S..HL.....		
	CDR3		
asyn0087	GAVNVIYYGMDVWGQGTMTVYSS		
aslo0452 ngl-3	..NHGK.....K.....T.....		
aslo0543	..RRGRI.....K.....T.....		
Sự sắp hàng VL			
asyn0087	CDR1	CDR2	
aslo0452 ngl-3	QAVLTQPSLSASPGEASALTCTLRSGNNVGNVRIYVYQKSGSPPEQVLLRYKSDADKHQSGVPSRFSGSKDASANAGILFISGLQSEDEADYYC		
aslo0543	A.....A.....P.....P.....L.....L.....		
	CDR3		
asyn0087	MVWHSQAWVFGGGLTVL		
aslo0452 ngl-3	...DH.V.Y.....		
aslo0543	...S....Y.....		

Fig.3A

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG	
E V Q L L E S G G L V Q P G G S L	
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT GCC ATG AGC TGG	
R L S C A A S G F T F S S Y A M S W	VHCDR1
GTC CGC CAG GGT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA TCC ATT TCC CAC CTT	
V R Q A P G K G L E W V S S I S H L	VHCDR2
GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA	
G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R	
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC ACC CTG AGA SCC GAG GAC	
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D	
ACG GCC GTG TAT TAC TGT GGG GGA GGG GCA AAC CAC GAG AAG TAC TAC TAC GGA	
T A V Y Y C A G G A N H G K Y Y Y G	VHCDR3
ATG GAC AAG TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	
M D K W G Q G T I V T V S S	

Fig.3B

CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG GCT TCC CTC TCT GCG TCT CCT GGA GCA TCA GGC
 Q A V L T Q P A S L S A S P G A S A

 AGT CTC ACC TGC ACC TTG CGC AGT GGG GCG CCC CTG CCG AAG TAT AGG ATA TAC
 S L T C T L R S G A P L P K Y R I Y
 VLCDRI

 TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AGT CCT CCC CAG TAT CTC CTG AAG TAC AAA TCA
 W Y Q Q K P G S P E Q Y L L R Y K S
 VLCDR2

 GAC GCA GAT AAA CAC CAG GGC TCT GGA GTC CCC AGC CGC TTT TCT GGA TCC AAA
 D A D K H Q G S G V P S R F S G S K

 GAT GCT TCG GCC AAT GCA GGG ATT TTA CTC ATC TCT GGG CTC CAG TCT GAG GAT
 D A S A N A G I L L I S G L Q S E D

 GAG GCT GAC TAT TAT TGT ATG GTT TGG GAC CAC GGC GTC TGG TAT TTC GGC GGA
 E A D Y Y C M V W D H G V W Y F G G
 VLCDR3

 GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA
 G T K L T V L

5/23

aslo0452 ngl-3
IGHV3-23*01
Vernier (*)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYAMSWVRQAPGKGLEWVS

VHCDR1

aslo0452 ngl-3
IGHV3-23*01
Vernier (*)

SISHLGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTILYLQMN SLRAEDTAVYYCAG
AISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTILYLQMN SLRAEDTAVYYCAR

VHCDR2

aslo0452 ngl-3
IGHJH6
Vernier (*)

GANHGKYYYGMCKWQGQITIVSS
WGQGITIVSS

VHCDR3

aslo0452 ngl-3
IGLV5-45*01
Vernier (*)

QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGAPLEKYRIYWIYQQKPGSPQYLLR
QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWIYQQKPGSPQYLLR

VLCDR1

aslo0452 ngl-3
IGLV5-45*01
Vernier (*)

YKSDADKHQSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMVWDHGVWY
YKSDSDKQQSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWH...WV

VLCDR2

aslo0452 ngl-3
IGJL2, 3
Vernier (*)

FGGGIKLIV---L
FGGGIKLIV---L

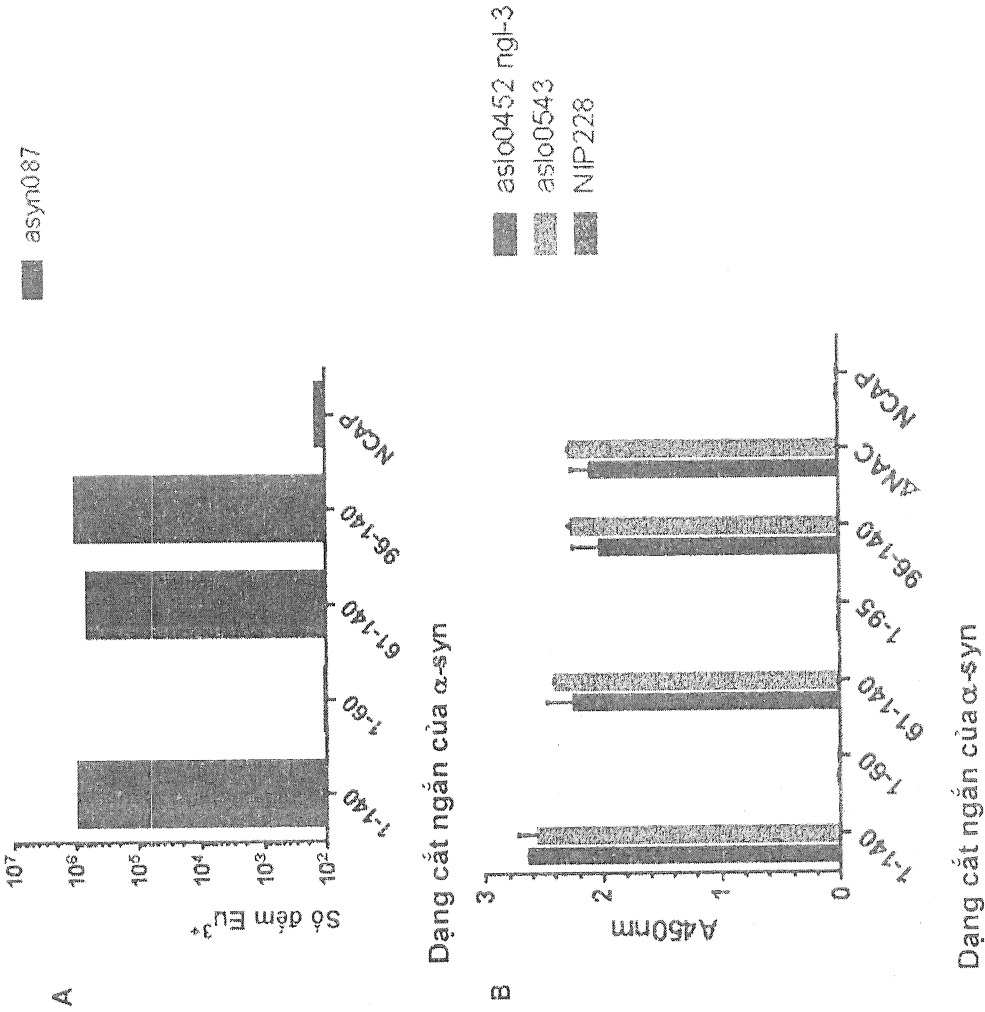
VLCDR3

Fig.3C

Fig.3D

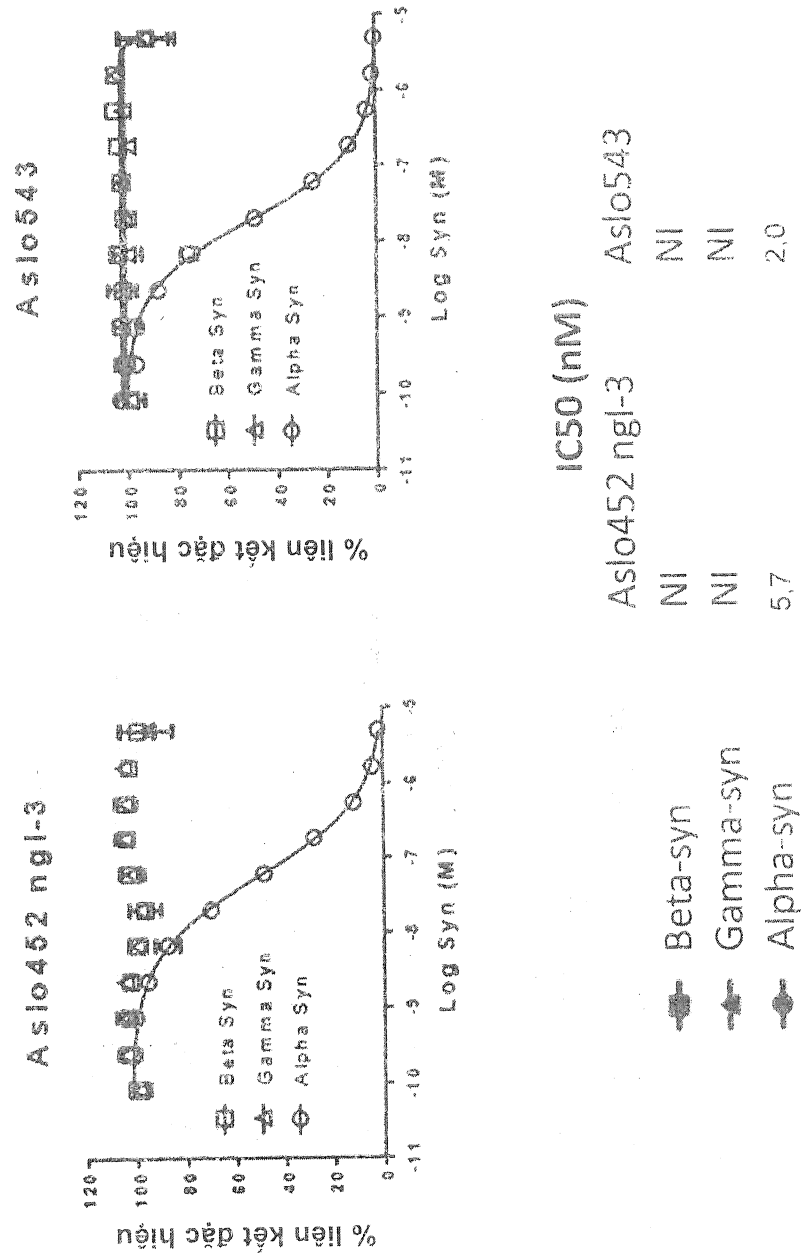
6/23

Fig.4



7/23

Fig.5



8/23

Fig.6

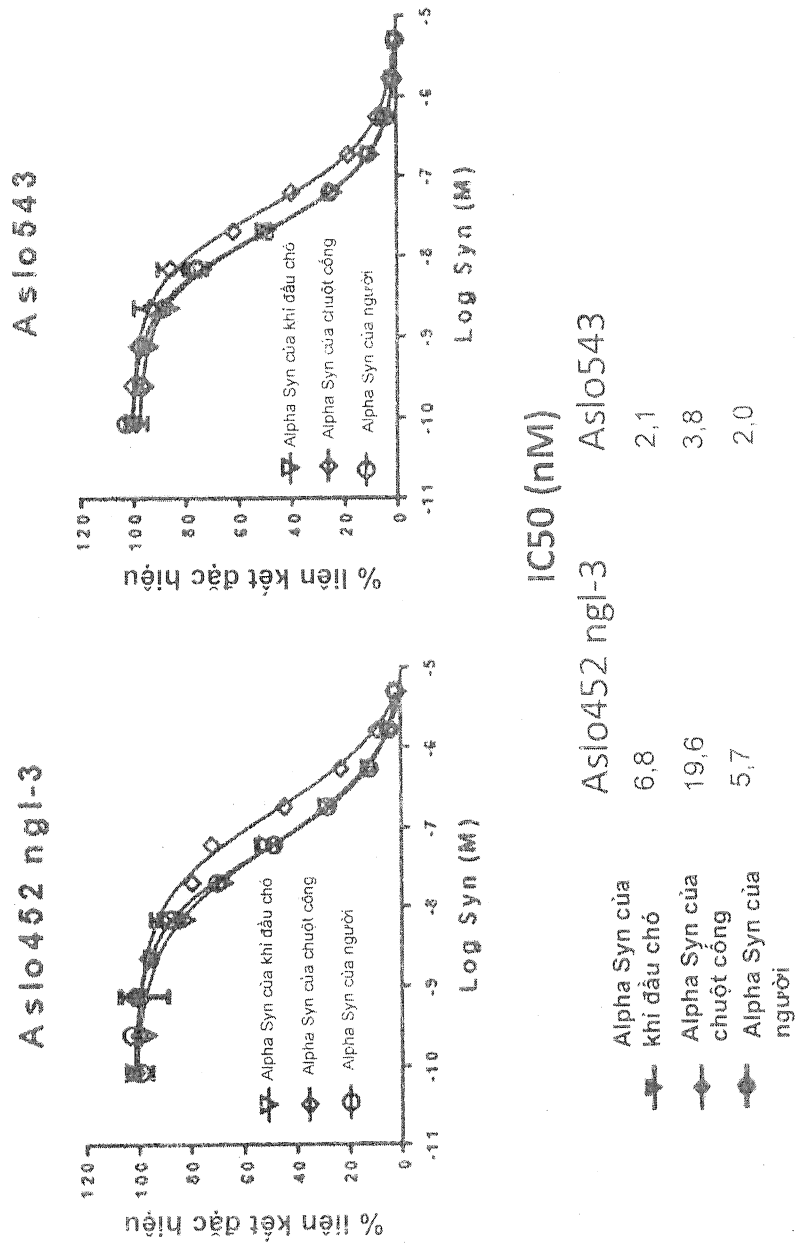


Fig.7B

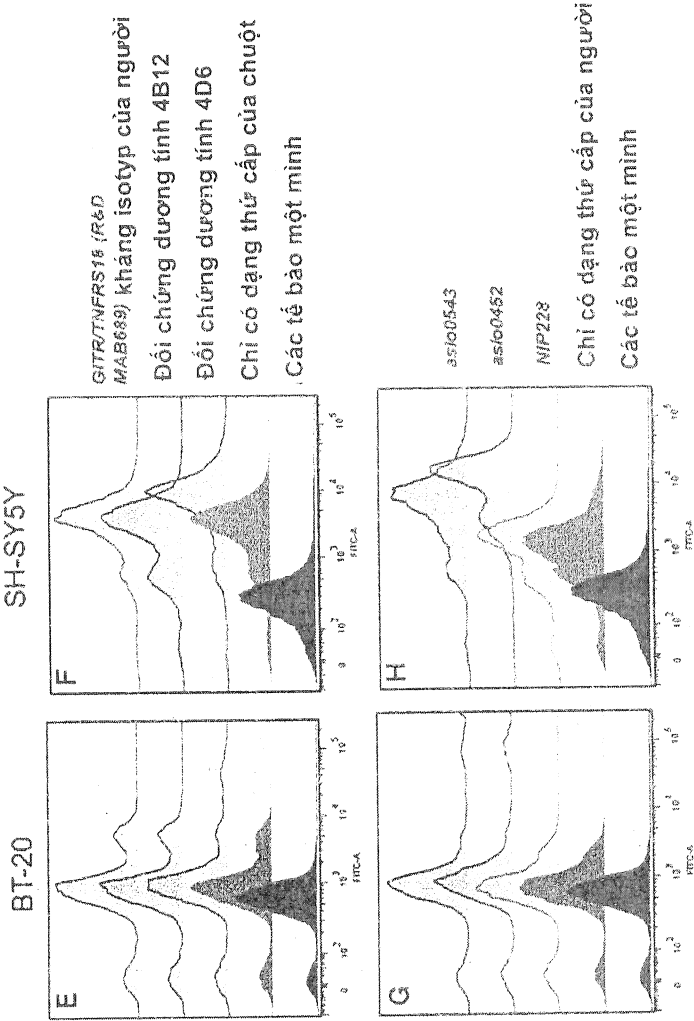
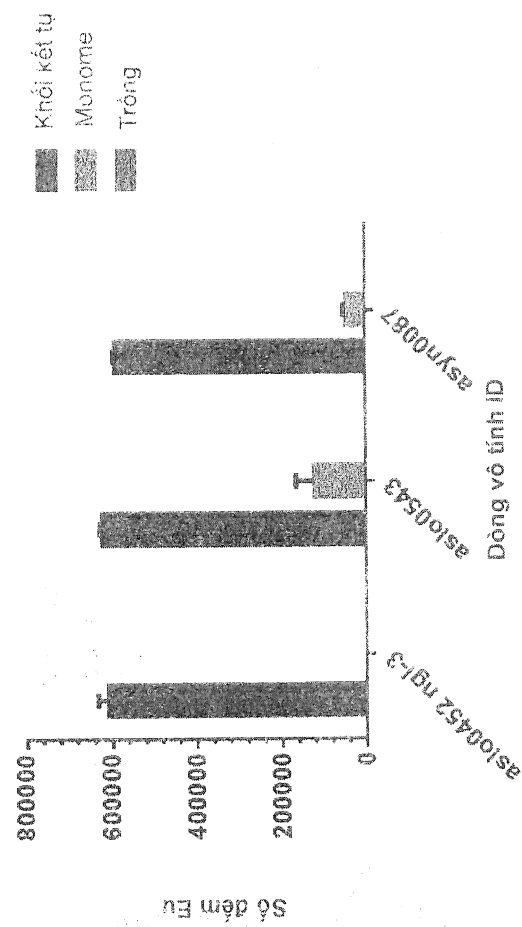


Fig.8



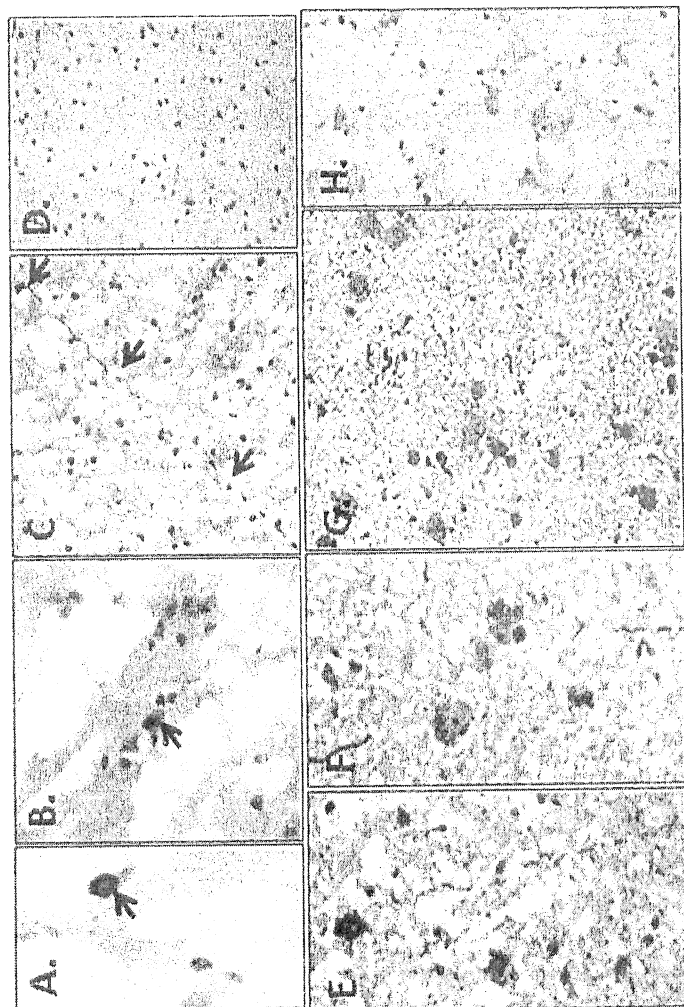


Fig. 9A

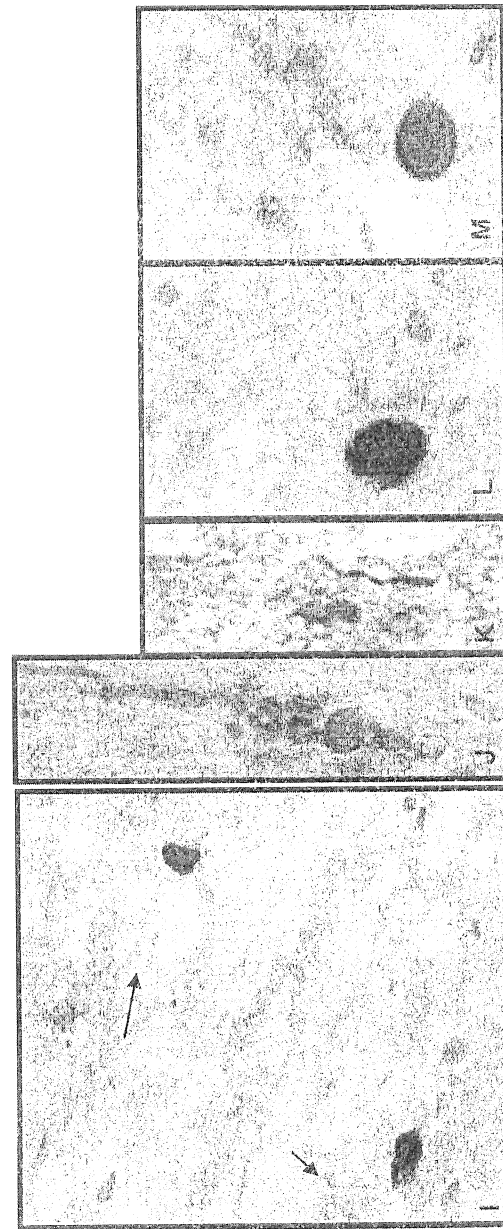


Fig.9B

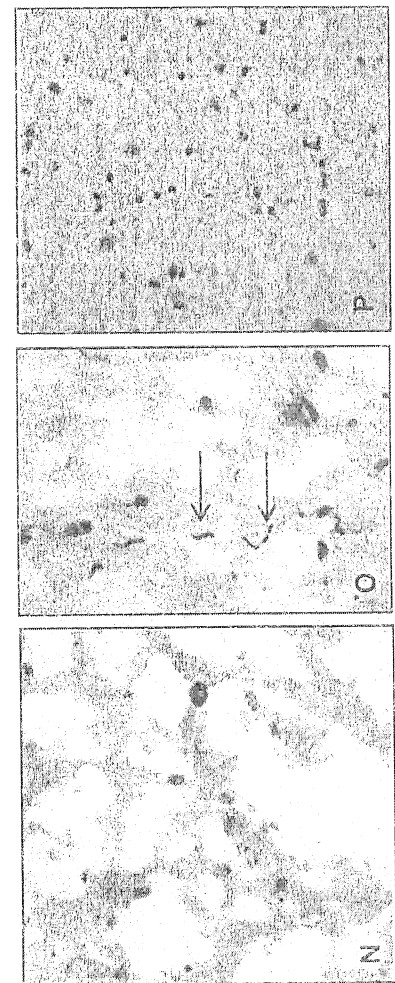
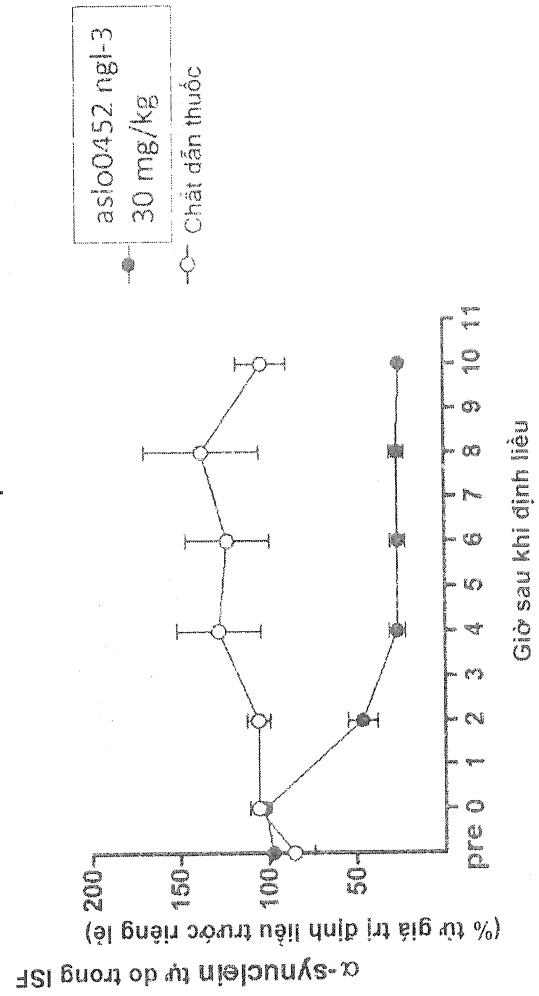
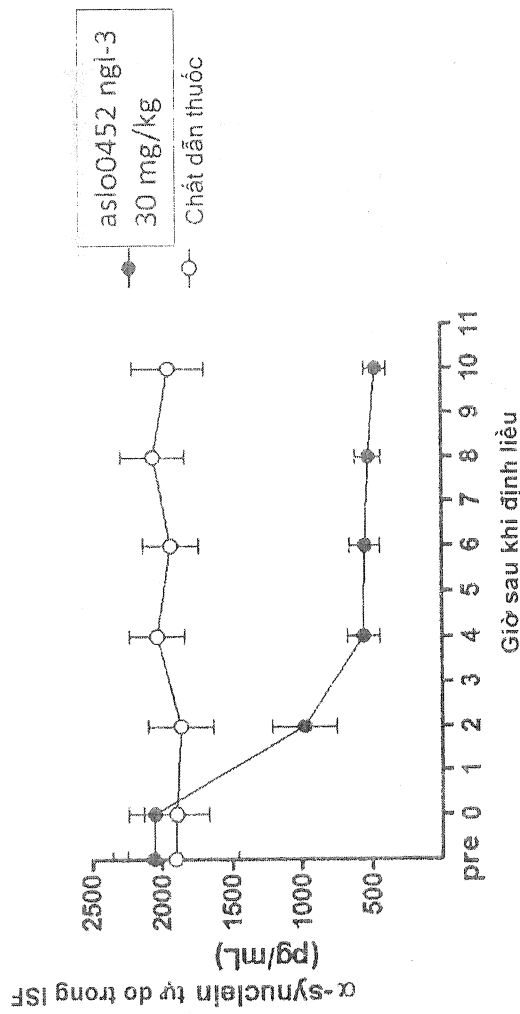


Fig.9C

14/23



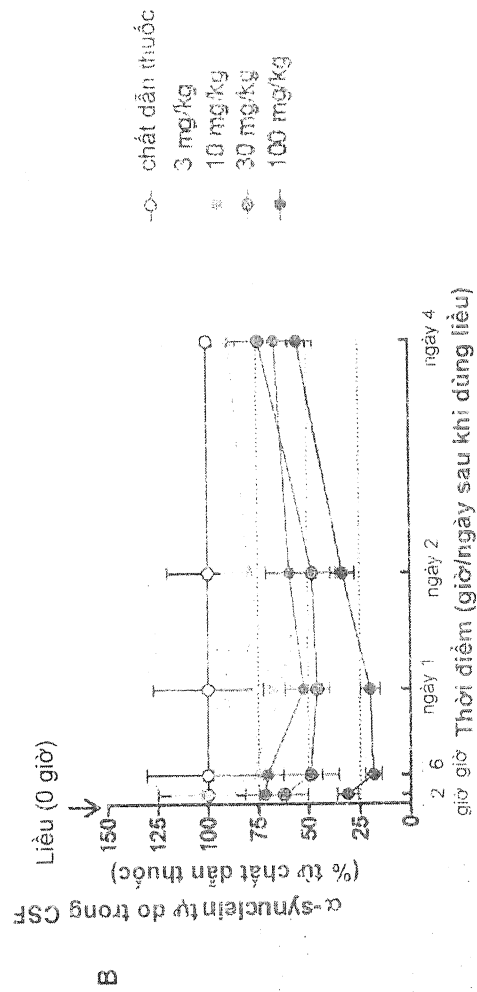
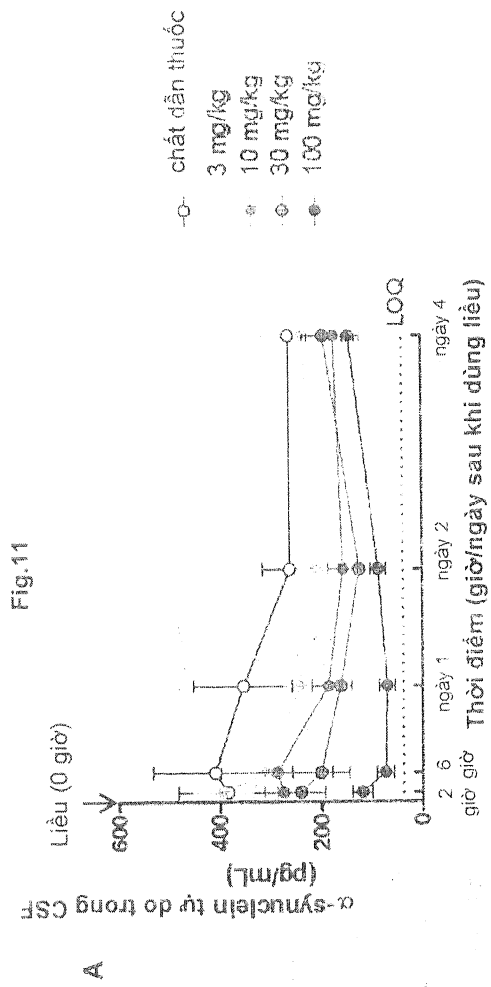


Fig.12

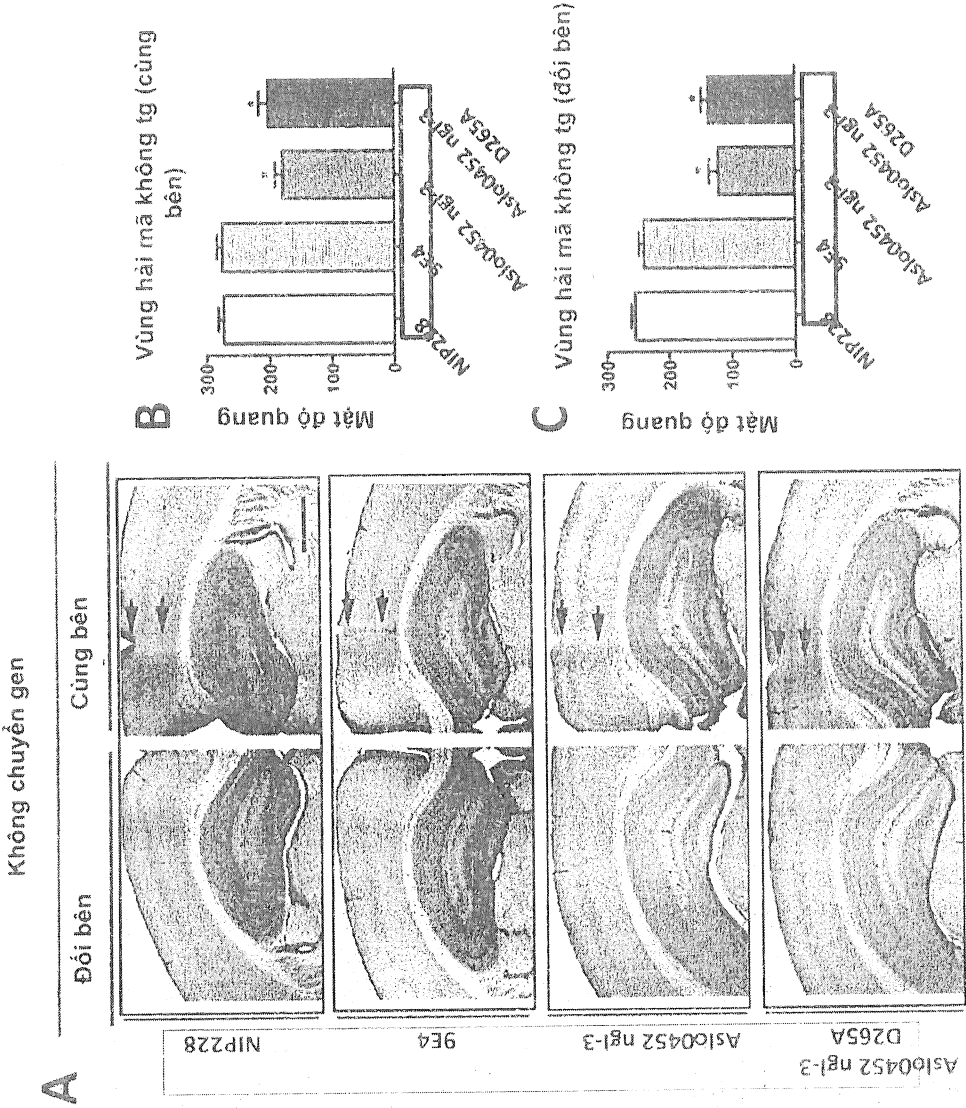


Fig.13

Không chuyển gen

A

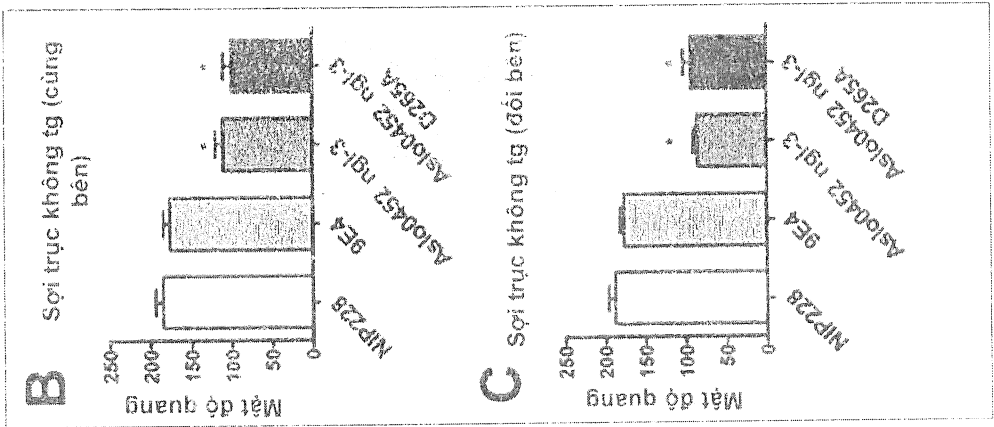
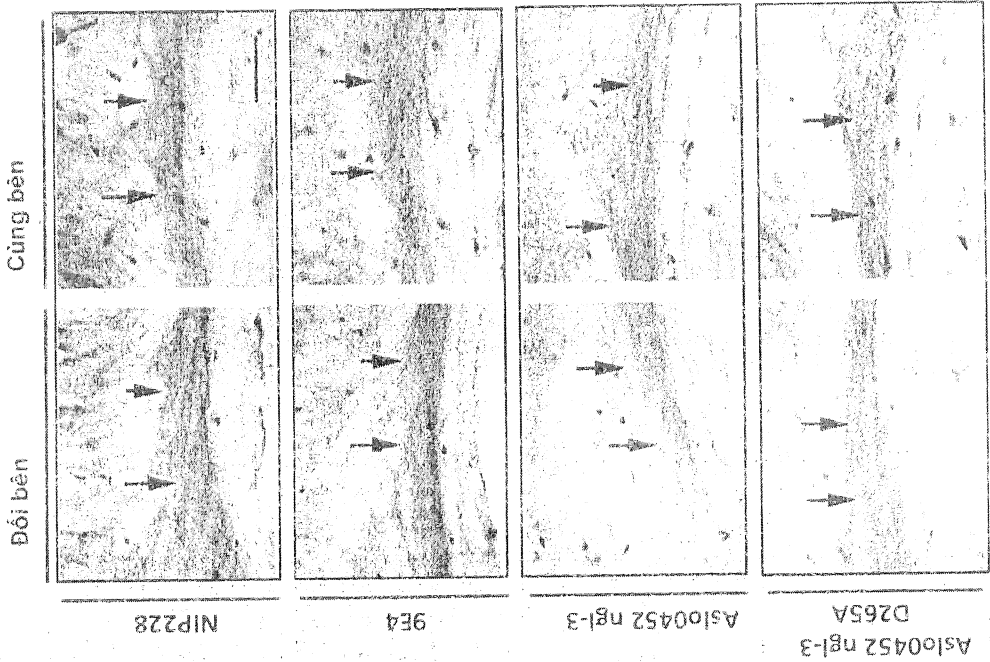


Fig.14

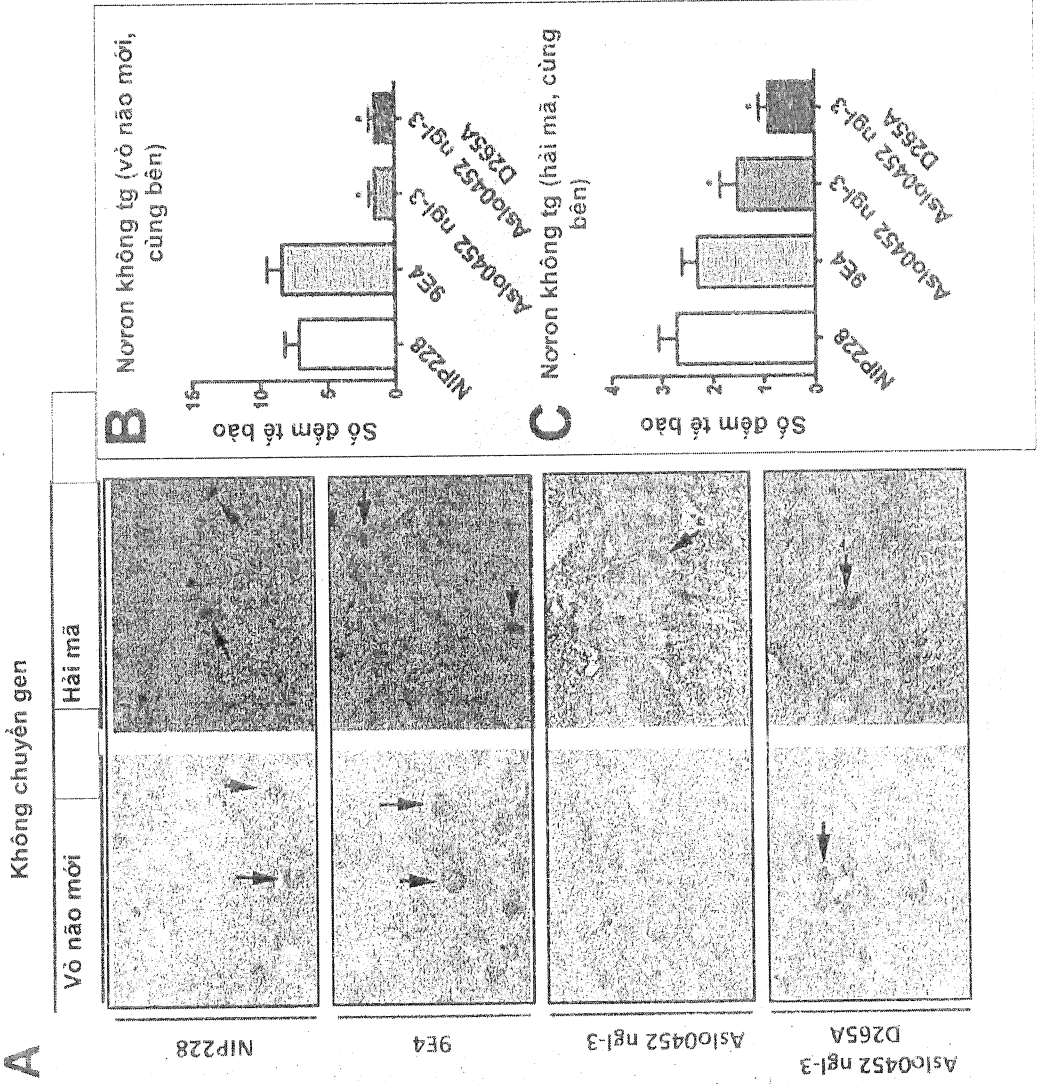
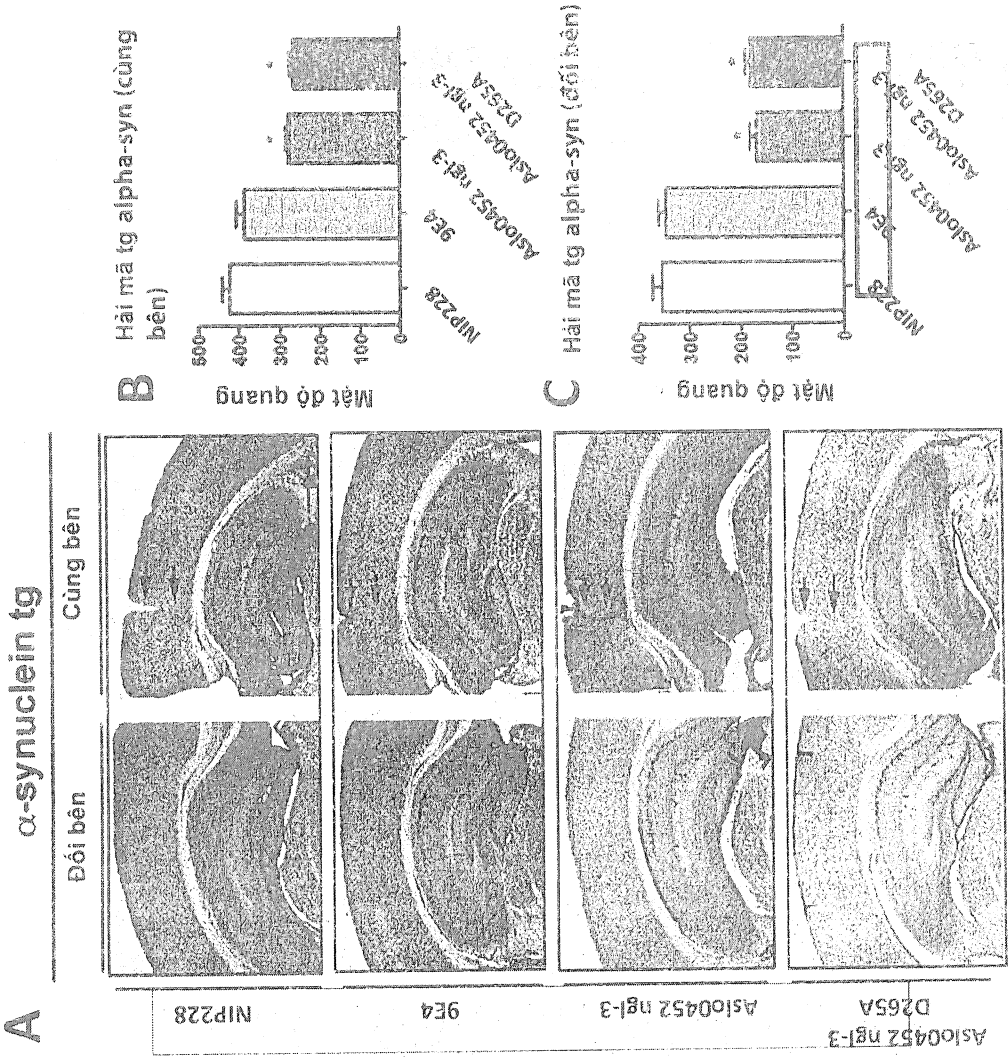


Fig.15



20/23

Fig.16

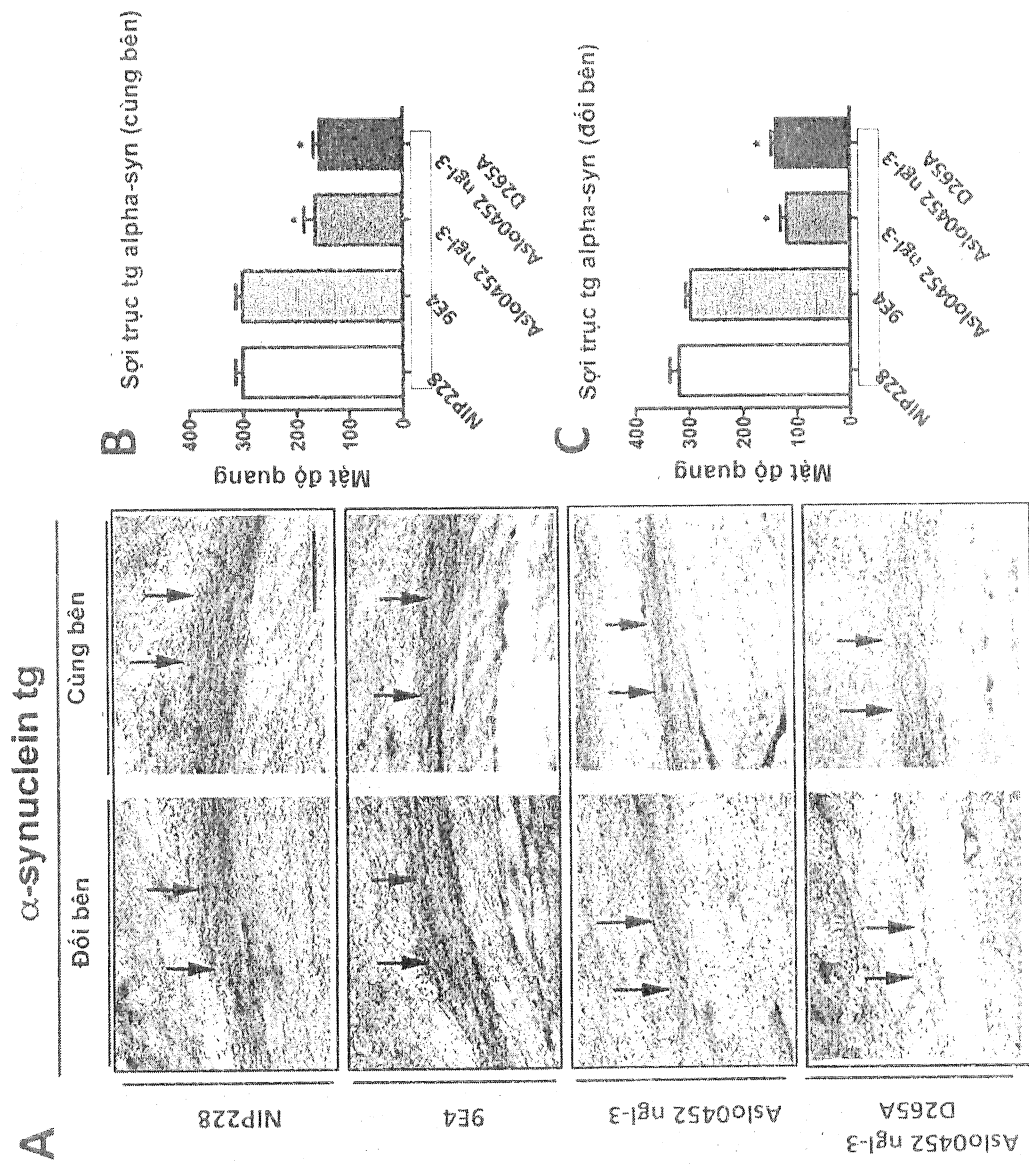


Fig.17

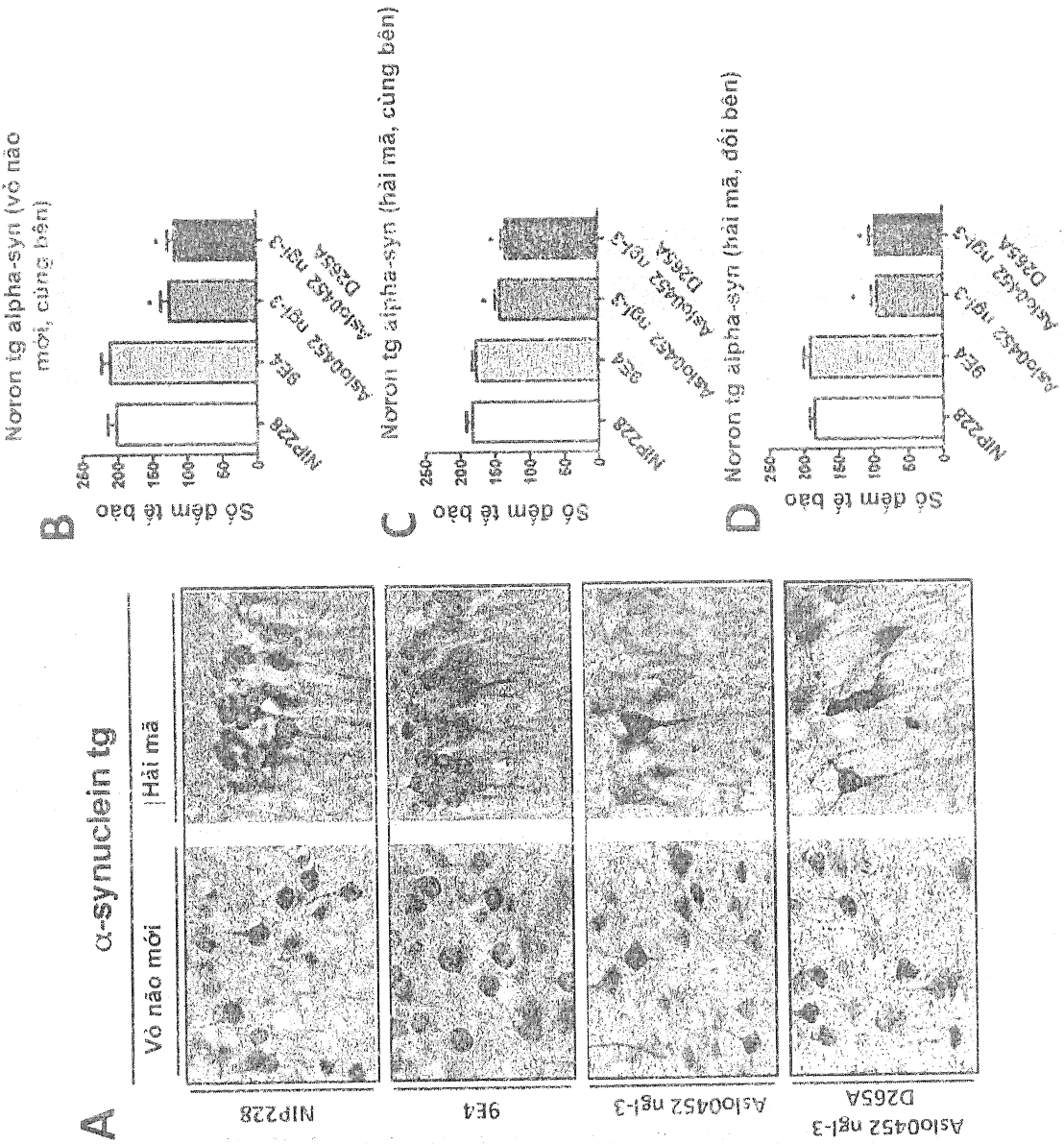


Fig.18

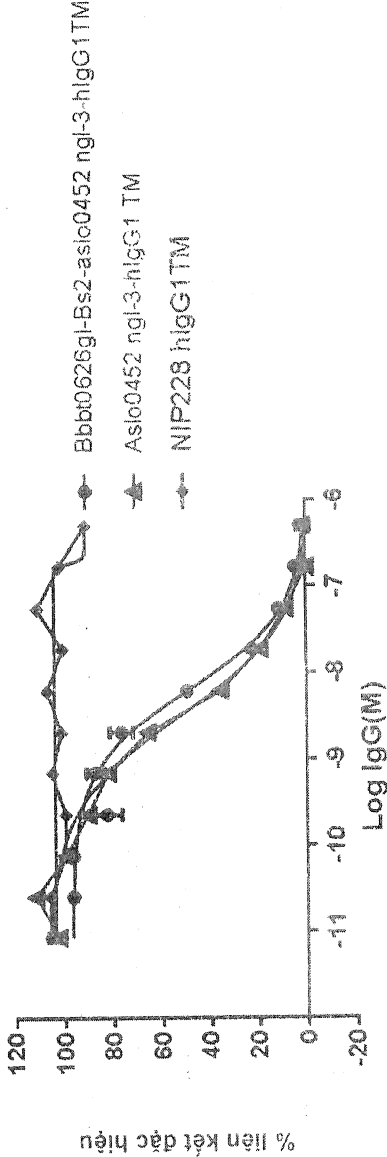
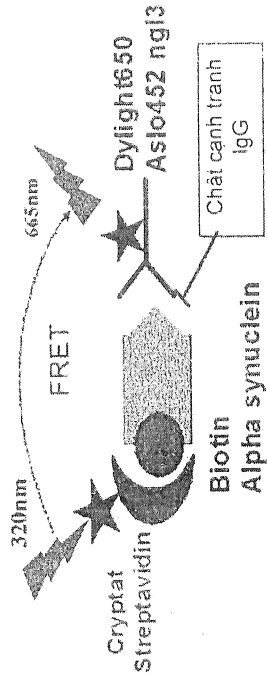


Fig.9

