



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

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

(11)



1-0039290

(51)^{2006.01} C07K 16/18; A61K 9/00; G01N 33/68;
C07K 16/44; A61K 39/00; A61P 25/28

(13) B

(21) 1-2019-05008

(22) 16/03/2018

(86) PCT/US2018/022782 16/03/2018

(87) WO 2018/170351 20/09/2018

(30) 62/472,214 16/03/2017 US

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/02/2020 383A

(73) JANSSEN BIOTECH, INC. (US)

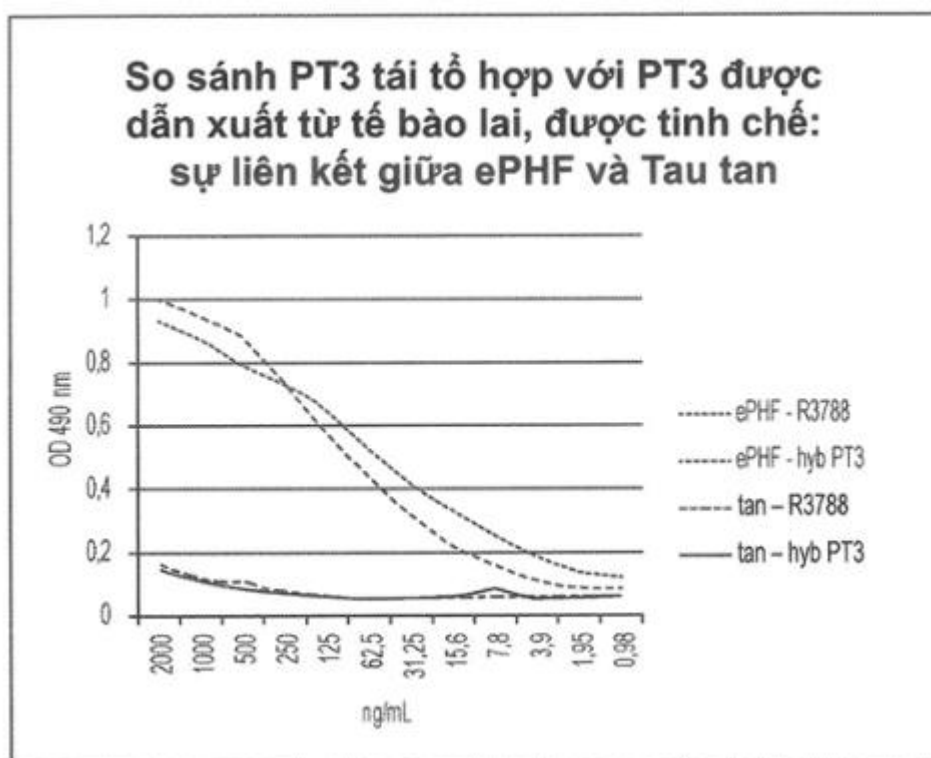
800/850 Ridgeview Drive Horsham, Pennsylvania 19044 (US)

(72) MERCKEN, Marc (BE); MALIA, Thomas (US); BORGERES, Marianne (BE); VAN KOLEN, Kristof (BE).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PHF-TAU, AXIT NUCLEIC ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA KHÁNG THỂ, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng PHF-tau đơn dòng và mảnh gắn kháng nguyên của chúng. Đồng thời sáng chế còn mô tả các axit nucleic mã hóa kháng thể, các chế phẩm bao gồm kháng thể, các phương pháp sản xuất kháng thể và sử dụng kháng thể để điều trị hoặc ngăn chặn tình trạng như bệnh lý do tau.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng PHF-tau, các axit nucleic và các vector biểu hiện mã hóa các kháng thể, các tế bào tái tổ hợp chứa vector, và các chế phẩm chứa kháng thể. Các phương pháp tạo kháng thể, các phương pháp sử dụng kháng thể để điều trị các tình trạng bao gồm các bệnh lý do protein tau gây ra, và các phương pháp sử dụng các kháng thể để chẩn đoán các bệnh lý này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Alzheimer (AD) là rối loạn não thoái hóa có đặc trưng lâm sàng là mất trí nhớ, nhận thức, tư duy, đánh giá và ổn định về mặt cảm xúc tiến triển, dần dần dẫn đến suy giảm thần kinh rõ rệt và cuối cùng là tử vong. AD là nguyên nhân rất phổ biến gây nên sự suy nhược thần kinh tiến triển (sa sút trí tuệ) ở những người lớn tuổi và được cho là nguyên nhân y khoa gây tử vong phổ biến thứ tư tại Hoa Kỳ. AD được ghi nhận có mặt trong các nhóm dân tộc thiểu số trên toàn thế giới và là một vấn đề y tế công cộng nghiêm trọng hiện nay và tương lai.

Bộ não của các cá nhân mắc bệnh AD biểu hiện các tổn thương đặc trưng gọi là mảng (hay dạng bột) ở người già, thoái hóa dạng bột (kết tủa dạng bột trong mạch máu) và đám rối sợi thần kinh. Phần lớn các tổn thương này, cụ thể là các mảng dạng bột và đám rối sợi thần kinh của các sợi xoắn ốc bất cặp, thường có mặt ở một số khu vực quan trọng đối với trí nhớ và chức năng nhận thức trong não của bệnh nhân AD.

Thực trạng điều trị AD hiện tại chỉ bao gồm các liệu pháp được chấp thuận để điều trị các triệu chứng về nhận thức ở bệnh nhân sa sút trí tuệ. Các liệu pháp được chấp thuận này không giúp điều hòa hoặc làm chậm sự tiến triển của AD. Các chất điều hòa bệnh tiềm năng bao gồm Solanezumab đơn dòng kháng $A\beta$ được nhân hóa Eli Lilly dành cho bệnh nhân AD nhẹ và chất ức chế BACE phân tử nhỏ Merck Verubecestat cho bệnh nhân AD thể nhẹ đến trung bình. Các liệu pháp này, và hầu hết các chất điều hòa bệnh tiềm năng khác có thể triển khai vào thập kỷ tới, nhắm đích $A\beta$ (thành phần chính của mảng dạng bột là một trong hai dấu hiệu bệnh lý “chủ chốt” của AD).

Các đám rối sợi thần kinh, dấu hiệu bệnh lý chủ chốt thứ hai của bệnh AD, chủ yếu được tạo thành từ các khối kết tụ protein tau được phosphoryl hóa mức cao. Chức năng sinh lý học chính của tau là trùng hợp và ổn định vi ống. Sự liên kết của tau với các vi ống diễn ra do các tương tác ion giữa các điện tích dương trong vùng liên kết vi ống của tau và các điện tích âm trên mạng vi ống (Butner và Kirschner, *J Cell Biol* (*Tạp chí Sinh học tế bào*). 115(3):717-30, 1991). Protein tau chứa 85 điểm phosphoryl hóa khả thi và sự phosphoryl hóa tại nhiều trong số các điểm này có ảnh hưởng đến chức năng chính của tau. Tau liên kết với mạng vi ống sợi trục có trạng thái thiếu hụt phosphoryl hóa, trong khi tau được kết tụ trong AD lại được phosphoryl hóa mức cao, cung cấp các epitope duy nhất khác biệt với nhóm tau có hoạt tính sinh lý học.

Giả thuyết lan truyền bệnh lý do tau đã được mô tả và dựa trên các giai đoạn Braak về tiến triển bệnh lý tau trong não người và sự lan truyền bệnh lý tau sau khi tiêm các khối kết tụ tau ở các mẫu tau tiền lâm sàng (Frost và cộng sự, *J Biol Chem. (Tạp chí Sinh hóa học)* 284:12845-52, 2009; Clavaguera và cộng sự, *Nat Cell Biol. (Sinh học tế bào Nature)* 11:909-13, 2009).

Việc phát triển thuốc điều trị ngăn chặn và loại bỏ sự kết tụ tau đã được quan tâm trong nhiều năm và các loại thuốc ứng viên, bao gồm các hợp chất kháng kết tụ và các chất ức chế kinaza, đã đi vào giai đoạn xét nghiệm lâm sàng (Brunden và cộng sự, *Nat Rev Drug Discov. (Tạp chí Khám phá thuốc Nature)* 8:783-93, 2009). Nhiều nghiên cứu đã công bố cho thấy các tác dụng điều trị có lợi của cả miễn dịch tau chủ động và bị động ở các mẫu chuột bị biến đổi gen (Chai và cộng sự, *J Biol Chem. (Tạp chí Sinh hóa học)* 286:34457-67, 2011; Boutajangout và cộng sự, *J Neurochem. (Tạp chí Hóa học thần kinh)* 118:658-67, 2011; Boutajangout và cộng sự, *J Neurosci. (Tạp chí Khoa học thần kinh)* 30:16559-66, 2010; Asuni và cộng sự, *J Neurosci. (Tạp chí Khoa học thần kinh)* 27:9115-29, 2007). Đã có báo cáo hoạt tính với cả kháng thể được định hướng phospho và kháng thể không được định hướng phospho (Schroeder và cộng sự, *J Neuroimmune Pharmacol. (Tạp chí Khoa dược lý Hệ miễn dịch thần kinh)* 11(1):9-25, 2016).

Mặc dù có sự phát triển trong ngành như vậy, vẫn cần phải có các loại thuốc điều trị hiệu quả ngăn chặn sự kết tụ tau và sự tiến triển của bệnh lý do tau để điều trị các bệnh lý do tau như AD và các bệnh thoái hóa thần kinh khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế thỏa mãn yêu cầu này bằng cách cung cấp các kháng thể kháng PHF-tau hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà có ái lực liên kết cao hướng đến sợi xoắn ốc bất cặp (PHF)-tau và được chọn lọc cho tau được phosphoryl hóa. Các kháng thể của sáng chế được tạo bằng cách cho các kháng thể đặc hiệu PHF-tau chuột thích ứng với khung của người (HFA). Người ta cho rằng tính chọn lọc của các kháng thể cho tau được phosphoryl hóa cho phép thể hiện tính hiệu lực kháng lại tau gây bệnh mà không ảnh hưởng đến chức năng tau bình thường. Sáng chế cũng cung cấp các axit nucleic mã hóa các kháng thể, các chế phẩm bao gồm kháng thể, và phương pháp tạo và sử dụng kháng thể. Các kháng thể kháng PHF-tau của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó ức chế mầm móng tau, như được đo bằng các xét nghiệm tế bào sử dụng mầm tau được dẫn xuất từ dịch thủy phân tế bào HEK hoặc từ dịch thủy phân tủy sống từ chuột biến đổi gen tau đột biến. Ngoài ra, kháng thể hỗn hợp có các vùng biến đổi của kháng thể kháng PHF-tau của sáng chế và các vùng hằng định của Ig chuột nhất, như các vùng hằng định của IgG2a chuột nhất, đã ức chế hoạt tính tạo mầm ở mẫu chuột biến đổi gen tau đột biến trong cơ thể sống.

Sự tiến triển của bệnh lý do protein tau trong não người mắc bệnh AD tuân thủ theo các mô hình lan truyền khác biệt. Các mẫu tiền lâm sàng đã cho thấy mầm phospho-tau ngoại bào có thể cảm ứng bệnh lý do tau trong các tế bào thần kinh (Clavaguera và cộng sự, PNAS 110(23):9535-40, 2013). Do đó, người ta tin rằng bệnh do tau có thể lan truyền theo cách prion (protein bị nhiễm độc) lan truyền từ một vùng não đến vùng tiếp theo. Quy trình lan truyền này có thể liên quan đến sự ngoại hóa mầm tau mà có thể được các tế bào thần kinh lân cận hấp thụ và cảm ứng bệnh lý do tau thêm nữa. Không bị ràng buộc bởi học thuyết nào, người ta cho rằng các kháng thể kháng PHF-tau hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó của sáng chế ngăn chặn sự kết tụ hoặc lan truyền bệnh lý tau trong não bằng cách tương tác với mầm phospho-tau.

Trong một phương án chung, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau. Trong một phương án cụ thể, kháng thể là kháng thể đơn dòng nhân hóa.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với protein tau được phosphoryl hóa tại epitope được phosphoryl hóa trong miền giàu prolin của protein tau. Trong một phương án cụ thể hơn, các epitope được phosphoryl hóa bao gồm T212 được phosphoryl hóa

và/hoặc T217 được phosphoryl hóa của protein tau, và epitope được phosphoryl hóa có hoặc nằm trong các trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 48, 52 và 54. Trong một số phương án, kháng thể của sáng chế liên kết với epitope được phosphoryl hóa bao gồm T212 được phosphoryl hóa và/hoặc T217 được phosphoryl hóa của protein tau.

Trong một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm:

- (1) các vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR) của globulin miễn dịch HCDR1, HCDR2 and HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là 4, 5 và 6, và các vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR) của globulin miễn dịch LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là 16, 17 và 18;
- (2) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 1, 2 và 3, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 13, 14 và 15;
- (3) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 7, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 19, 20 và 21;
- (4) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 10, 11 và 12, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 22, 23 và 24;
- (5) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là 80, 81 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 70, 20 và 21;
- (6) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 71, 72, 73, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 70, 20 và 21;
- (7) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 71, 72 và 73, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 19, 20 và 21;
- (8) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;

(9) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34;

(10) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34; hoặc

(11) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;

trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau, tốt hơn là PHF-tau người.

Trong phương án cụ thể hơn, các vùng khung trong miền vùng biến đổi chuỗi nặng và trong miền vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin từ globulin miễn dịch người.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 26, 27, 28 và 29 hoặc vùng V_H của chuỗi nặng bất kỳ có trình tự bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 74, 76, và 78, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 31, 32, 33 và 34 hoặc vùng V_L của chuỗi nhẹ bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 75, 77 và 79.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 45, 74, 76, và 78; và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 46, 75, 77 và 79.

Theo phương án cụ thể khác, các kháng thể đơn dòng được phân lập của sáng chế hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó còn bao gồm vùng hằng định, như vùng hằng định IgG của chuỗi nặng người hoặc chuột, và vùng hằng định kappa hoặc lambda của chuỗi nhẹ kháng thể người hoặc chuột.

Trong phương án chung khác, sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Trong phương án chung khác, sáng chế cũng đề cập đến vector bao gồm axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Trong phương án chung khác, sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ bao gồm axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó và chất mang được dụng.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm sự kết tụ tau gây bệnh hoặc sự lan truyền bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dược phẩm của sáng chế.

Theo phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dược phẩm của sáng chế. Bệnh lý do tau bao gồm, nhưng không giới hạn trong, một hoặc nhiều bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh tương tự như bệnh Alzheimer, bệnh Alzheimer rải rác, sa sút trí tuệ thùy trán-thái dương kèm hội chứng Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), liệt trên nhân tiến triển, thoái hóa hạch nền-vỏ não, bệnh Pick, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ tiến triển, sa sút trí tuệ chỉ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh lan tỏa kèm vôi hóa, sa sút trí tuệ do hạt ưa bạc, hội chứng Parkinson xơ cứng cột bên teo cơ-sa sút trí tuệ, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm cơ thể vùi, bệnh Creutzfeld-Jakob, teo tuyến nhiều hệ thống, bệnh Niemann-Pick týp C, bệnh mạch máu não do thoái hóa dạng bột có nguyên nhân từ protein bị nhiễm độc, viêm toàn não xơ hóa bán cấp, loạn trương lực cơ teo, bệnh xơ-ran thần kinh vận động không phải tại Guam có đám rối sợi thần kinh,

hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh lý não mạn tính do chấn thương, và sa sút trí tuệ dạng chấn thương não (bệnh của võ sĩ đấm bốc).

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó trong các điều kiện để có thể tạo ra kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, và bước thu hồi kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất được phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm bước kết hợp kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó với chất mang được dụng để thu về được phẩm.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của PHF-tau được phosphoryl hóa ở đối tượng hoặc phương pháp chẩn đoán bệnh lý do tau bằng cách phát hiện sự có mặt của PHF-tau ở đối tượng với việc sử dụng kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Các phương diện, đặc điểm và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được trình bày rõ ràng trong phần bộc lộ sau đây, bao gồm mô tả chi tiết về sáng chế và các phương án ưu tiên và các điểm yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Bản chất kỹ thuật của sáng chế nêu trên, cũng như phần mô tả chi tiết sau đây, sẽ được hiểu rõ hơn khi tham khảo các hình vẽ kèm theo. Cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn trong các phương án chính xác được minh họa trong các hình vẽ.

HÌNH 1 minh họa liên kết của PT3 được biểu hiện tái tổ hợp (“R3788”) và PT3 được biểu hiện trên tế bào lai (“hyb”) với PHF-tau và tau hòa tan.

HÌNH 2 minh họa phương pháp phân tích lai thấm protein (western blot analysis) kháng thể đơn dòng kháng tau của chuột sau khi SDS-PAGE tau người bình thường tái tổ hợp (“NT”) và PHF-tau không hòa tan trong sarcosyl (“PT”).

HÌNH 3A-3E minh họa phân tích hóa mô miễn dịch PT3 trên mô vùng hồi hải mã AD dương tính với kháng thể kháng 4G8 dạng bột. Các kháng thể đơn dòng được sử dụng là (A) PT1, (B) PT2, (C) PT3, (D) AT8 và (E) HT7.

HÌNH 4A-4E minh họa phân tích hóa mô miễn dịch PT3 trên mô vùng hồi hải mã đối chứng, âm tính với kháng thể kháng 4G8 dạng bột. Các kháng thể đơn dòng được sử dụng là (A) PT1, (B) PT2, (C) PT3, (D) AT8 và (E) HT7.

HÌNH 5A-5B minh họa mẫu hình nhuộm đặc hiệu phospho-tau của PT3 trong não chuột (A) bất hoạt tau hoặc (B) kiểu đại.

HÌNH 6A-6B minh họa mẫu hình nhuộm đặc hiệu không phải phospho-tau của tau-1 trong não chuột (A) bất hoạt tau hoặc (B) kiểu đại.

HÌNH 7 minh họa cấu trúc tinh thể của phức hợp PT3 Fab + peptit tau pT212/pT217, với PT3 Fab được minh họa theo dạng lấp đầy không gian (màu xám nhạt), và peptit tau được minh họa dưới dạng que (màu đen).

HÌNH 8 minh họa cấu trúc tinh thể của phức hợp PT3 Fab + peptit tau pT212/pT217, với PT3 được minh họa dưới dạng dải (màu xám nhạt) với các đơn phân paratope của nó được biểu diễn dưới dạng que, và peptit tau được minh họa dưới dạng que (màu đen).

HÌNH 9 minh họa sơ đồ tương tác của cấu trúc PT3 Fab + peptit tau pT212/pT217, với các đơn phân peptit được biểu diễn trong các ô màu đen, chữ trắng, các đơn phân VH trong các ô màu xám đậm, các đơn phân VL trong ô màu xám nhạt, và các đường đứt nét biểu diễn các liên kết hydro, các đường liền nét biểu diễn các tiếp xúc van der Waals.

HÌNH 10 minh họa các trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của PT3 của HFA, trong đó các biến thể HFA được bắt cặp với vùng V mẹ của chuột của PT3 (VH10 và VL7), các CDR mẹ được chuyển sang FR người được gạch chân, và các đơn phân được đánh số tuần tự.

HÌNH 11 minh họa cấu trúc tinh thể của phức hợp B324 + peptit tau pT212/pT217, với B324 được minh họa theo dạng lấp đầy không gian (màu xám nhạt), và peptit tau được minh họa dưới dạng que (màu đen).

HÌNH 12 minh họa cấu trúc tinh thể của phức hợp B324 + peptit tau pT212/pT217, với B324 được minh họa dưới dạng dải (màu xám nhạt) có các đơn phân paratope của nó được biểu diễn dưới dạng que, và peptit tau được minh họa dưới dạng que (màu đen), lưu ý rằng D92(L) và E93(L) không có mật độ electron cho $C^\pm$ và nguyên tử carboxyl hóa mạch bên.

HÌNH 13 minh họa sơ đồ tương tác của cấu trúc B324 + peptit tau pT212/pT217, với các đơn phân peptit được biểu diễn trong các ô màu đen, chữ trắng, các đơn phân VH trong các ô màu xám đậm, các đơn phân VL trong ô màu xám nhạt, và các đường

đứt nét biểu diễn các liên kết hydro, các đường liền nét biểu diễn các tiếp xúc van der Waals.

HÌNH 14 minh họa sơ đồ mẫu tế bào cảm biến sinh học FRET.

HÌNH 15 minh họa sự ức chế của PT3 đối với cảm ứng kết tụ K18 được gieo mầm bởi các chất đồng chất tế bào HEK chứa các khối kết tụ GFP-tauP301L, như được xác định bằng xét nghiệm BRET.

HÌNH 16 minh họa sự ức chế của PT3 đối với cảm ứng kết tụ K18 được gieo mầm bởi các chất đồng chất tùy sống TgP301S, như được xác định bằng xét nghiệm FRET.

HÌNH 17 minh họa kết quả xét nghiệm miễn dịch loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp (immunodepletion) tách chiết tùy sống TgP301S chuột, với dữ liệu từ 2 thí nghiệm độc lập.

HÌNH 18 minh họa xét nghiệm miễn dịch loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp (immunodepletion) tách chiết não AD người, với dữ liệu từ 2 thí nghiệm độc lập (trừ trường hợp HT7 và AT8, trong đó n=1). PT3 ức chế sự tạo mầm tau như được xác định bằng xét nghiệm FRET.

HÌNH 19A-19G minh họa sơ đồ mô hình tiêm ở chuột biến đổi gen biểu hiện tau P301L người đột biến. Các hình ảnh IHC minh họa các mẫu nhuộm AT8 đại diện từ bán cầu não chuột bị tiêm (A-B) chiết phẩm đối chứng 3 tháng sau khi tiêm (C-D) ePHF-tau dẫn xuất từ não AD 1 tháng sau khi tiêm và (E-F) ePHF-tau dẫn xuất từ não AD 3 tháng sau khi tiêm. (G) Sơ đồ trình bày dữ liệu hóa sinh tiêu biểu từ chuột được điều trị bằng ePHF với lượng gia tăng.

HÌNH 20 minh họa tác dụng đối với sự kết tụ tau khi sử dụng bằng đường ngoại vi (tiêm màng bụng, IP) PT3 sau đó gieo mầm PHF-tau dẫn xuất từ não AD ở chuột biến đổi gen biểu hiện tau P301L người đột biến.

HÌNH 21 minh họa tác dụng đối với sự kết tụ tau khi tiêm cùng lúc các liều PT3 giảm sau đó gieo mầm PHF-tau dẫn xuất từ não AD ở chuột biến đổi gen biểu hiện tau P301L người đột biến.

HÌNH 22A-22C minh họa tác dụng đối với sự kết tụ tau khi tiêm cùng lúc nhiều loại thuốc kết hợp với việc dùng các lớp kháng thể PT3 bằng đường IP sau đó gieo mầm PHF-tau dẫn xuất từ não AD ở chuột biến đổi gen biểu hiện tau P301L người đột

biến. Chuột được điều trị theo (A) thể hiện tác dụng trong (B) bán cầu não được tiêm và (C) bán cầu não không được tiêm.

HÌNH 23A-23B minh họa các nồng độ tau kết tụ trong chất đồng chất não được dẫn xuất từ các bệnh nhân PSP so với nồng độ chất đồng chất não dẫn xuất từ các bệnh nhân AD. Các kháng thể đơn dòng được sử dụng là (A) AT8 và (B) PT3.

HÌNH 24A-24J minh họa các hình ảnh nhuộm (A-C) các kháng thể AT8 hoặc (D-F) PT3 trên phần đông lạnh từ mô não của (A, D) bệnh nhân AD hoặc (B, C, E, F) bệnh nhân PSP cho thấy được nhuộm trong các vùng giải phẫu bị ảnh hưởng trong PSP. (G-J) Các đối chứng không cho thấy là bị nhuộm.

HÌNH 25A-25H minh họa liên kết SPR của các mAb (kháng thể đơn dòng) trưởng thành ái lực và các Fab của chúng với PHF-tau. Các đường liên nét (màu xám) chỉ báo việc làm phù hợp động học bằng mô hình liên kết lưỡng trị (mAb) hoặc mô hình 1:1 Langmuir (Fab). (A) mAb B296 (B) mAb B711 (C) mAb B809 (D) mAb B333 (E) Fab B324 của B296 (F) Fab B330 của B711 (G) Fab B332 của B809 (H) Fab B331 của B333.

HÌNH 26A-26B minh họa liên kết PT3-HFA và các biến thể trưởng thành ái lực với peptit pT212/pT217 trong xét nghiệm ELISA trực tiếp sử dụng (A) mAb hoặc (B) Fab.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nhiều ấn phẩm, bài báo và bằng sáng chế được nêu hoặc được mô tả trong phần tình trạng kỹ thuật của sáng chế và trong toàn bộ bản mô tả; mỗi tham chiếu này được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn. Việc trình bày về tài liệu, hoạt động, vật liệu, thiết bị, thành phần, v.v. đã được đưa vào bản mô tả nhằm mục đích cung cấp ngữ cảnh của sáng chế. Việc trình bày này không có ý rằng vấn đề bất kỳ hoặc tất cả các vấn đề này là một phần của kỹ thuật trước đây liên quan đến sáng chế bất kỳ được bộc lộ hoặc được yêu cầu bảo hộ.

Các định nghĩa

Trừ khi được quy định khác đi, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa thông thường theo hiểu biết của người có trình độ bình thường trong ngành mà sáng chế này có liên quan. Hoặc, các thuật ngữ nhất định được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như đã nêu trong bản mô tả. Tất cả bằng sáng chế, đơn xin cấp bằng sáng chế đã công bố và các ấn phẩm được nêu trong bản mô tả này

được kết hợp đầy đủ bằng viện dẫn. Cần lưu ý là khi được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ, dạng số ít “một” bao gồm cả các số nhiều trừ khi ngữ cảnh quy định khác.

Trừ khi được quy định khác, giá trị bằng số bất kỳ, như nồng độ hoặc khoảng nồng độ được mô tả trong bản mô tả này, được hiểu là sẽ được điều chỉnh trong tất cả các trường hợp theo thuật ngữ “khoảng”. Theo đó, giá trị bằng số thường bao gồm $\pm 10\%$ của giá trị được nêu. Ví dụ, nồng độ bằng 1 mg/mL bao gồm 0,9 mg/mL đến 1,1 mg/mL. Tương tự, khoảng nồng độ bằng từ 1 % đến 10 % (khối lượng/thể tích) bao gồm 0,9 % (khối lượng/thể tích) đến 11 % (khối lượng/thể tích). Trong bản mô tả này, việc sử dụng khoảng số rõ ràng bao gồm tất cả các khoảng phụ có thể có, tất cả từng giá trị bằng số trong khoảng đó, bao gồm các số nguyên trong các khoảng này và các phân số có các giá trị này trừ khi ngữ cảnh nêu ý khác một cách rõ ràng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “được phân lập” có nghĩa là một thành phần sinh học (như axit nucleic, peptit hay protein) về cơ bản đã được tách ra, được tạo thành riêng ra từ, hoặc tinh lọc ra khỏi các thành phần sinh học khác của sinh vật mà tại đó thành phần xuất hiện một cách tự nhiên, tức là các ARN và ADN thuộc nhiễm sắc thể và nằm ngoài nhiễm sắc thể, và các protein khác. Do đó, axit nucleic, peptit hay protein đã được “phân lập” bao gồm cả các axit nucleic và protein được tinh chế bằng các phương pháp tinh chế tiêu chuẩn. Axit nucleic, peptit hay protein đã được “phân lập” có thể là một phần trong thành phần và tiếp tục được phân lập nếu thành phần đó không phải là một phần của môi trường tự nhiên của axit nucleic, peptit hay protein đó. Thuật ngữ bao hàm cả các axit nucleic, peptit và protein được điều chế bằng cách biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào chủ và các axit nucleic được tổng hợp hóa học.

Thuật ngữ “kháng thể” hoặc “globulin miễn dịch” như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa trong phạm vi rộng và bao gồm các phân tử kháng thể hoặc globulin miễn dịch gồm các kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể đơn dòng chuột, người, thích nghi với người, nhân hóa và hỗn hợp, và các mảnh kháng thể.

Nhìn chung, kháng thể là các protein hoặc chuỗi peptit biểu hiện tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên đặc hiệu. Các cấu trúc của kháng thể đã được biết rộng rãi. Các globulin miễn dịch có thể được phân thành 5 lớp chính, là IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, tùy vào trình tự axit amin của miền hằng định chuỗi nặng. IgA và IgG còn được phân lớp nhỏ hơn, là các lớp kháng thể IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Theo đó, các kháng thể

của sáng chế có thể là loại bất kỳ trong năm loại chính hoặc các lớp kháng thể tương ứng. Tốt hơn là, các kháng thể của sáng chế là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Các kháng thể của sáng chế bao gồm các loại có các biến thể trong vùng Fc của chúng sao cho các tính chất của chúng thay đổi so với các vùng Fc kiểu đại bao gồm, nhưng không hạn chế, thời gian bán hủy dài hơn, các chức năng ADCC hoặc CDC và tế bào thực thi Fc bất hoạt giảm hoặc tăng. Chuỗi nhẹ của kháng thể từ loài động vật có xương sống bất kỳ có thể được phân thành một trong hai loại có sự khác biệt rõ ràng, được gọi là kappa và lambda, dựa trên trình tự axit amin của các miền hằng định của chúng. Theo đó, các kháng thể của sáng chế có thể chứa miền hằng định của chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể của sáng chế bao gồm các vùng hằng định của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ từ kháng thể của chuột hoặc người.

Ngoài các vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các kháng thể còn chứa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch bao gồm vùng “khung” bị can thiệp bởi các “điểm gắn kháng nguyên”. Các điểm gắn kháng nguyên được định nghĩa bằng các thuật ngữ và phương thức đánh số như sau:

- (i) Kabat: “Các vùng xác định bổ sung” hay “CDR” dựa trên sự biến đổi trình tự (Wu và Kabat, *J Exp Med (Tập chí Y học thực nghiệm)* 132:211-50, 1970). Nhìn chung, điểm gắn kháng nguyên có ba CDR trong mỗi vùng biến đổi (ví dụ, HCDR1, HCDR2 và HCDR3 trong vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL));
- (ii) Chothia: “Các vùng siêu biến”, “HVR”, hoặc “HV” chỉ các vùng của các miền biến đổi của kháng thể siêu biến trong cấu trúc như Chothia và Lesk đã định nghĩa (Chothia và Lesk, *J Mol Biol. (Tập chí Sinh học phân tử)* 196:901-17, 1987). Nhìn chung, điểm gắn kháng nguyên có ba vùng siêu biến trong mỗi VH (H1, H2, H3) và VL (L1, L2, L3). Các hệ thống đánh số cũng như chú thích về CDR và HV đã được sửa đổi bởi Abhinandan và Martin (Abhinandan và Martin, *Mol Immunol. (Miễn dịch học phân tử)* 45:3832-9, 2008);
- (iii) IMGT: Định nghĩa khác về các vùng tạo thành điểm gắn kháng nguyên đã được đề xuất bởi Lefranc (Lefranc và cộng sự, *Dev Comp Immunol. (Tập chí Miễn dịch học so sánh và thực nghiệm)* 27:55-77, 2003) dựa trên sự so sánh miền V của globulin miễn dịch và thụ thể tế bào T. Cơ sở dữ liệu International

ImMunoGeneTics (IMGT) cung cấp cách đánh số chuẩn hóa và định nghĩa các vùng này. Sự tương ứng giữa các mô tả về CDR, HV và IMGT được trình bày trong Lefranc và cộng sự, 2003, *Id.*;

(iv) AbM: Sự thống nhất giữa các phương thức đánh số của Kabat và Chothia là quy ước đánh số AbM được Martin mô tả (Martin ACR (2010) *Antibody Engineering* (Kiến tạo kháng thể, btv Kontermann R, Dubel S (Springer-Verlag, Berlin), Tập 2, tr. 33–51).

(v) Điểm gắn kháng nguyên cũng có thể được mô tả dựa trên “Specificity Determining Residue Usage” (Cách sử dụng đơn phân quyết định tính đặc hiệu, SDRU) (Almagro, *Mol Recognit. (Nhận diện phân tử)* 17:132-43, 2004), trong đó SDR, chỉ đơn phân axit amin của globulin miễn dịch tham gia trực tiếp vào tiếp xúc kháng nguyên.

“Khung” hoặc “trình tự khung” là các trình tự còn lại của vùng biến đổi của kháng thể ngoài các trình tự được định nghĩa là trình tự của điểm gắn kháng nguyên. Bởi vì có thể định nghĩa chính xác điểm gắn kháng nguyên bằng nhiều thuật ngữ khác nhau như mô tả trên đây, trình tự khung chính xác tùy thuộc vào việc điểm gắn kháng nguyên được định nghĩa như thế nào. Vùng khung (FR) là phần có tính bảo thủ cao hơn của miền biến đổi. Các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tự nhiên mỗi miền bao gồm bốn FR (lần lượt là FR1, FR2, FR3 và FR4), nhìn chung sử dụng cấu hình phiến gấp beta (beta-sheet), được kết nối bởi ba vòng siêu biến. Vòng siêu biến ở mỗi chuỗi được bố trí cùng nhau gần các FR và, với vòng siêu biến từ chuỗi kia, góp phần tạo nên điểm gắn kháng nguyên của kháng thể. Phân tích cấu trúc của kháng thể cho thấy mối quan hệ giữa trình tự và hình dáng của điểm gắn do các vùng xác định bổ sung tạo thành (Chothia và cộng sự, *J. Mol. Biol. (Sinh học phân tử và tế bào)*. 227: 799-817, 1992; Tramontano và cộng sự, *J. Mol. Biol. (Sinh học phân tử và tế bào)*. 215:175-182, 1990). Mặc dù có sự biến đổi trình tự cao, năm trong số sáu vòng chỉ sử dụng một tập hợp nhỏ cấu hình mạch chính gọi là “cấu trúc hợp chuẩn”. Các cấu hình này trước hết được xác định theo độ dài của vòng, sau đó theo sự có mặt của các đơn phân chính tại một số vị trí nhất định trong vòng và trong vùng khung xác định cấu hình thông qua sự sắp xếp chặt, liên kết hydro của chúng hoặc khả năng mang cấu hình mạch chính không phổ biến của chúng.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “mảnh gắn kháng nguyên” chỉ mảnh kháng thể, ví dụ như diabody (kháng thể đặc hiệu đôi tái tổ hợp), Fab, Fab', F(ab')₂, mảnh Fv, đoạn

Fv ổn định disulfua (dsFv), (dsFv) 2, dsFv đặc hiệu đôi (dsFv-dsFv'), diabody ổn định disulfua (ds diabody), phân tử kháng thể đơn chuỗi (scFv), kháng thể đơn miền (sdab), dime scFv (diabody lưỡng trị), kháng thể đa hiệu được hình thành từ một phần của kháng thể bao gồm một hoặc nhiều CDR, kháng thể đơn miền được camel hóa, nanobody (kháng thể đơn vùng), kháng thể miền, kháng thể miền lưỡng trị hoặc mảnh kháng thể bất kỳ khác liên kết với kháng nguyên nhưng không bao gồm cấu trúc kháng thể hoàn chỉnh. Mảnh gắn kháng nguyên có khả năng liên kết với cùng kháng nguyên mà kháng thể mẹ hoặc mảnh kháng thể mẹ liên kết. Theo các phương án cụ thể, mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, vùng hằng định chuỗi nhẹ, và đoạn Fd của vùng hằng định của chuỗi nặng. Theo các phương án cụ thể khác, mảnh gắn kháng nguyên bao gồm Fab và F (ab').

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể nhân hóa” chỉ kháng thể không phải của con người được cải biến để tăng tính tương đồng trình tự với trình tự của kháng thể người, sao cho các đặc tính gắn kháng nguyên của kháng thể được giữ lại, nhưng tính kháng nguyên trong cơ thể người thì bị khử.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “epitope” chỉ vị trí trên kháng nguyên mà globulin miễn dịch, kháng thể, hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu tại đó. Epitope có thể được tạo cả từ các axit amin liên kề hay từ các axit amin không liên kề nhưng ở cạnh nhau bằng cách cuộn gấp protein làm ba. Epitope tạo thành từ các axit amin liên kề thường vẫn còn khi phơi nhiễm với dung môi làm biến chất, trong khi epitope được tạo bằng cách cuộn gấp protein làm ba thường bị mất khi xử lý với dung môi làm biến chất. Epitope thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin trong cấu hình không gian duy nhất. Các phương pháp xác định cấu hình không gian của epitope bao gồm, ví dụ, tinh thể học tia X và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (Giao thức ánh xạ epitope trong các phương pháp trong sinh học phân tử), Tập 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Trong tài liệu này, thuật ngữ “tau” hoặc “protein tau” chỉ protein của hệ thần kinh trung ương và ngoại vi dư thừa có nhiều thể đồng dạng. Trong hệ thần kinh trung ương (CNS), sáu thể đồng dạng tau chính có các độ dài từ 352 đến 441 axit amin do sự cắt nối có chọn lọc (Hanger và cộng sự, *Trends Mol Med. (Xu hướng trong Dược phân tử)* 15:112-9, 2009). Các thể đồng dạng khác nhau do việc đưa vào có điều hòa 0-2 đoạn

chèn đầu N, và 3 hoặc 4 đoạn lặp lại liên kết với vi ống được sắp xếp liền kề, và được gọi là 0N3R (SỐ ID TRÌNH TỰ: 64), 1N3R (SỐ ID TRÌNH TỰ: 65), 2N3R (SỐ ID TRÌNH TỰ: 66), 0N4R (SỐ ID TRÌNH TỰ: 67), 1N4R (SỐ ID TRÌNH TỰ: 68) và 2N4R (SỐ ID TRÌNH TỰ: 69). Trong tài liệu này, thuật ngữ “tau đối chứng” chỉ thể đồng dạng tau có SỐ ID TRÌNH TỰ: 69 không bị phosphoryl hóa và các điều hòa sau dịch mã khác. Trong tài liệu này, thuật ngữ “tau” bao gồm các protein gồm có các đột biến, ví dụ: đột biến điểm, mảnh kháng thể, đột biến chèn đoạn, đột biến mất đoạn và các biến thể cắt nối của tau kiểu đại đầy đủ chiều dài. Thuật ngữ “tau” còn bao hàm điều hòa sau dịch mã trình tự axit amin tau. Điều hòa sau dịch mã bao gồm, nhưng không giới hạn trong phosphoryl hóa.

Tau liên kết với các vi ống và điều hòa vận chuyển các chất qua các tế bào, quy trình này có thể được điều hòa bằng cách phosphoryl hóa. Trong AD và các rối loạn liên quan, sự phosphoryl hóa tau bất thường chiếm ưu thế và được cho là quá trình xảy ra trước khi và/hoặc kích hoạt sự kết tụ tau thành các sợi, được gọi là sợi xoắn ốc bắt cặp (PHF). Thành phần chính của PHF là tau được phosphoryl hóa mức cao. Trong tài liệu này, thuật ngữ “sợi xoắn ốc bắt cặp-tau” hay “PHF-tau” chỉ tau kết tụ thành các sợi xoắn ốc bắt cặp. Hai khu vực chính trong cấu trúc PHF hiển thị rõ ràng trong kính hiển vi điện tử, là vỏ xoắn và sợi lõi; Vỏ xoắn dễ bị phân giải protein và nằm ngoài sợi, và lõi kháng proteaza của sợi tạo thành khung của PHF (Wischik và cộng sự, *Proc Natl Acad Sci USA. (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ)* 85:4884-8, 1988).

Trong bản mô tả này, “kháng thể nhân hóa phân lập liên kết với PHF-tau” hoặc “kháng thể kháng PHF-tau nhân hóa được phân lập” nhằm chỉ kháng thể kháng PHF-tau được nhân hóa và phân lập về cơ bản được tách ra khỏi các kháng thể khác có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể kháng PHF-tau nhân hóa được phân lập về căn bản được tách khỏi các kháng thể liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác ngoài PHF-tau). Tuy nhiên, kháng thể kháng PHF-tau nhân hóa được phân lập có thể có phản ứng chéo với các kháng nguyên liên quan khác, ví dụ từ các loài khác (như đồng đẳng loài của PHF-tau).

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” hoặc “liên kết một cách đặc hiệu” như sử dụng trong tài liệu này chỉ khả năng của kháng thể kháng PHF-tau của sáng chế trong việc liên kết với đích được xác định trước bằng hằng số phân ly (K_D) bằng khoảng 1×10^{-6} M hoặc chặt

hơn, ví dụ, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-12} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1×10^{-13} M. Thuật ngữ KD thu được từ tỷ lệ K_D với K_A (tức là, K_D/K_A) và được biểu diễn dưới dạng nồng độ mol (M). Có thể xác định giá trị KD cho các kháng thể bằng các phương pháp trong ngành theo quan điểm của sáng chế. Ví dụ, có thể xác định giá trị KD của kháng thể kháng PHF-tau bằng cách sử dụng cộng hưởng plasmon bề mặt, như sử dụng hệ thống cảm biến sinh học, ví dụ, hệ thống Biacore®, thiết bị Proteon (BioRad), dụng cụ KinExA (Sapidyne), ELISA hoặc các xét nghiệm liên kết cạnh tranh đã được người có trình độ trong ngành biết đến. Thông thường, kháng thể kháng PHF-tau liên kết với đích được xác định trước (tức là PHF-tau) bằng K_D nhỏ hơn ít nhất mười lần so với K_D của nó đối với đích không đặc hiệu như được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng, ví dụ, ProteOn Instrument (BioRad). Tuy nhiên, các kháng thể kháng PHF-tau liên kết đặc hiệu với PHF-tau có thể có phản ứng chéo với các đích liên quan khác, ví dụ, với cùng đích được xác định trước từ các loài khác (đồng đẳng loài).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “polynucleotit”, đồng nghĩa với “phân tử axit nucleic”, “nucleotit” hay “axit nucleic”, chỉ polyribonucleotit hay polydeoxyribonucleotit bất kỳ, có thể là ARN hay ADN chưa điều hòa hoặc ARN hay ADN đã điều hòa. “Polynucleotit” bao gồm, không giới hạn, ADN sợi đơn và sợi kép, ADN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, các ARN sợi đơn và sợi kép, và ARN là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép, các phân tử lai chứa ADN và ARN có thể là sợi đơn hoặc, điển hình hơn, là sợi kép hoặc là hỗn hợp của các vùng sợi đơn và sợi kép. Ngoài ra, “polynucleotit” chỉ các vùng có cấu trúc ba mạch bao gồm ARN hoặc ADN hoặc cả ARN và ADN. Thuật ngữ polynucleotit còn bao gồm các ADN hoặc ARN chứa một hoặc nhiều base (gốc) đã điều hòa và ADN hoặc ARN với các khung được điều hòa cho mục đích ổn định hoặc cho các lý do khác. Các base “điều hòa” bao gồm, ví dụ, các base đã bổ sung nhóm bảo vệ trityl và các base không thông thường khác như inosin. Có thể thực hiện nhiều kiểu điều hòa khác nhau đối với ADN và ARN; do đó, “polynucleotit” bao gồm các dạng được điều hòa hóa học, điều hòa bằng enzym hoặc bằng cách chuyển hóa của polynucleotit như thường thấy trong tự nhiên, cũng như trong các dạng hóa học đặc trưng của ADN và ARN của các vi rút và tế bào. “Polynucleotit” đồng thời bao gồm cả những mạch axit nucleic tương đối ngắn, thường được gọi là oligonucleotit.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vectơ” là đơn vị sao chép, trong đó một đoạn axit nucleic khác có thể sẽ được chèn vào để có thể tạo nên sự sao chép hoặc biểu hiện đoạn đó.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tế bào chủ” chỉ tế bào bao gồm phân tử axit nucleic của sáng chế. “Tế bào chủ” có thể là loại tế bào bất kỳ, ví dụ, tế bào sơ cấp, tế bào trong môi trường nuôi cấy, hoặc tế bào từ dòng tế bào. Trong một phương án, “tế bào chủ” là tế bào được chuyển nhiễm với phân tử axit nucleic của sáng chế. Trong phương án khác, “tế bào chủ” là thế hệ con hoặc thế hệ con tiềm năng của tế bào được chuyển nhiễm này. Thế hệ con của tế bào này có thể đồng nhất hoặc không đồng nhất với tế bào mẹ, ví dụ, do các đột biến hoặc ảnh hưởng môi trường có thể xảy ra ở các thế hệ tiếp theo hoặc sự hợp nhất phân tử axit nucleic vào bộ gen tế bào chủ.

Thuật ngữ “biểu hiện” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ sự sinh tổng hợp một sản phẩm gen. Thuật ngữ này bao hàm sự phiên mã một gen tạo thành ARN. Thuật ngữ này cũng bao hàm sự dịch mã ARN thành một hoặc nhiều polypeptit, và còn bao hàm tất cả các điều hòa diễn ra tự nhiên sau phiên mã và sau dịch mã. Kháng thể nhân hóa được biểu hiện hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau có thể nằm trong tế bào chất của tế bào chủ, môi trường ngoại bào như môi trường sinh trưởng để nuôi cấy tế bào, hoặc được neo gắn với màng tế bào.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang” chỉ tá dược, chất pha loãng, chất làm đầy, dung dịch đệm, muối, chất ổn định, chất làm tan, dầu, lipid, lipid chứa túi tinh, vi cầu, bao nang trong hạt mỡ, hoặc vật liệu khác phổ biến trong ngành để sử dụng trong dược phẩm. Cần hiểu rằng các đặc trưng của chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng sẽ phụ thuộc vào đường dùng được áp dụng cụ thể. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang dược dụng” chỉ vật liệu không gây độc hại và không ảnh hưởng đến hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế hoặc hoạt tính sinh học của chế phẩm theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, theo quan điểm của bản mô tả này, chất mang dược dụng bất kỳ phù hợp để sử dụng trong dược phẩm kháng thể có thể được sử dụng trong sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “đối tượng” chỉ động vật, tốt hơn là động vật có vú. Theo các phương án cụ thể, đối tượng là động vật có vú bao gồm động vật không phải linh trưởng (ví dụ: lạc đà, lừa, ngựa vằn, bò, lợn, ngựa, dê, cừu, mèo, chó, chuột, thỏ, chuột lang hoặc chuột nhắt) hoặc linh trưởng (ví dụ: khỉ, tinh tinh hoặc con người). Trong các phương án cụ thể, đối tượng là con người.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng điều trị hữu hiệu” chỉ lượng hoạt chất hoặc thành phần tạo ra các đáp ứng sinh học hoặc dược học mong muốn ở đối tượng. Có thể xác định lượng điều trị hữu hiệu theo thực nghiệm và thường xuyên, liên quan đến mục đích được đặt ra. Ví dụ, các xét nghiệm *trong ống nghiệm* có thể tùy chọn được sử dụng để giúp xác định khoảng liều lượng tối ưu. Người có trình độ trong ngành có thể xác định chọn liều hữu hiệu cụ thể (ví dụ, qua các thử nghiệm lâm sàng) dựa trên việc xem xét một số yếu tố, bao gồm căn bệnh được điều trị hoặc ngăn ngừa, các triệu chứng liên quan, khối lượng cơ thể của bệnh nhân, tình trạng miễn dịch của bệnh nhân và các yếu tố khác mà người có trình độ trong ngành đã biết. Liều chính xác được sử dụng trong chế phẩm cũng sẽ phụ thuộc vào đường truyền thuốc, và mức độ nghiêm trọng của bệnh, và phải được quyết định theo đánh giá của chuyên gia và từng hoàn cảnh của bệnh nhân. Có thể ngoại suy liều hữu hiệu từ đường cong liều lượng đáp ứng được truy xuất từ hệ thống thử nghiệm mẫu động vật hoặc *trong ống nghiệm*.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” đều chỉ việc cải thiện, đảo ngược ít nhất một thông số cơ thể có thể đo được liên quan đến bệnh lý do tau không nhất thiết được thể hiện ra ở đối tượng, nhưng có thể được thể hiện ra ở đối tượng. Thuật ngữ “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” có thể chỉ việc dẫn đến sự thoái lui, ngăn chặn hoặc ít nhất làm chậm sự tiến triển của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ sự làm giảm nhẹ, ngăn chặn sự tiến triển hoặc khởi phát, hoặc giảm thời gian diễn ra một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh lý do tau. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ việc ngăn chặn sự tái phát của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ mức tăng thời gian sống sót của đối tượng mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng. Trong phương án cụ thể, “trị bệnh”, “trị”, và “điều trị” chỉ việc loại bỏ bệnh, rối loạn hoặc tình trạng ở đối tượng.

Trong tài liệu này, “bệnh lý do tau” bao gồm bệnh thoái hóa thần kinh bất kỳ liên quan đến sự kết tụ tau gây bệnh bên trong não. Ngoài bệnh tương tự như bệnh Alzheimer, bệnh Alzheimer rải rác, các ví dụ về bệnh lý do tau là sa sút trí tuệ thùy trán-thái dương kèm hội chứng Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), liệt trên nhân tiến triển, thoái hóa hạch nền-vỏ não, bệnh Pick, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ tiến triển, sa sút trí tuệ chỉ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh lan tỏa kèm vôi hóa, sa sút trí tuệ do hạt ura bạc, hội chứng Parkinson xơ cứng cột bên teo

cơ-sa sút trí tuệ, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm cơ thể vùi, bệnh Creutzfeld-Jakob, teo tuyến nhiều hệ thống, bệnh Niemann-Pick tít C, bệnh mạch máu não do thoái hóa dạng bột có nguyên nhân từ protein bị nhiễm độc, viêm toàn não xơ hóa bán cấp, loạn trương lực cơ teo, bệnh nơ-ron thần kinh vận động không phải tại Guam có đám rối sợi thần kinh, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh lý não mạn tính do chấn thương, như sa sút trí tuệ dạng chấn thương não (bệnh của võ sĩ đấm bốc) (Morris và cộng sự, *Neuron (Tế bào thần kinh)*, 70:410-26, 2011).

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “kết hợp” trong ngữ cảnh sử dụng hai hoặc nhiều liệu pháp điều trị cho đối tượng, chỉ việc sử dụng nhiều hơn một liệu pháp. Việc sử dụng thuật ngữ “kết hợp” không giới hạn trình tự sử dụng liệu pháp điều trị cho đối tượng. Ví dụ, có thể cho đối tượng sử dụng liệu pháp thứ nhất (ví dụ, chế phẩm được mô tả trong tài liệu này) trước khi (ví dụ, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, 6 tuần, 8 tuần, hoặc 12 tuần trước), đồng thời với, hoặc sau khi (ví dụ, 5 phút, 15 phút, 30 phút, 45 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 16 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 5 tuần, 6 tuần, 8 tuần, hoặc 12 tuần sau) sử dụng liệu pháp thứ hai.

Kháng thể kháng PHF-tau

Trong một phương án chung, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau. Các kháng thể kháng PHF-tau này có thể có các tính chất liên kết với epitope được phosphoryl hóa trên PHF-tau hoặc liên kết với epitope không được phosphoryl hóa trên PHF-tau. Các kháng thể kháng PHF-tau có thể được sử dụng hữu ích làm thuốc điều trị, và làm các thuốc thử nghiên cứu hoặc chẩn đoán để phát hiện PHF-tau trong các mẫu sinh học, ví dụ trong mô hoặc tế bào.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với protein tau được phosphoryl hóa tại epitope trong miền giàu prolin của protein tau. Trong một phương án cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với protein tau được phosphoryl hóa tại epitope bao gồm các đơn phân T212 và/hoặc T217 được phosphoryl hóa. Trong một phương án cụ thể hơn, sáng chế

đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với epitope được phosphoryl hóa có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 48, 52 và 54. Trong một phương án cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với epitope được phosphoryl hóa có SỐ ID TRÌNH TỰ: 48. Kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể nhân hóa.

Bảng 1 trình bày các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng cho 5 mAb nhân hóa liên kết với phospho tau theo SỐ ID TRÌNH TỰ. Các trình tự của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng cho mAb nhân hóa B296 cũng được trình bày. mAb này đã trưởng thành ái lực (xem Bảng 3).

Bảng 2 minh họa các đơn phân của điểm gắn kháng nguyên (tức là các vùng CDR) của các kháng thể ví dụ của sáng chế được xác định theo phương pháp đánh số Chothia, ABM, Kabat và IMGT. Các trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng mẫu được trình bày theo các SỐ ID TRÌNH TỰ: 26-29, và các trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ mẫu được trình bày theo các SỐ ID TRÌNH TỰ: 31-34.

Bảng 3 trình bày các trình tự của các kháng thể đơn dòng trưởng thành ái lực được tạo từ B296 (tức là B333, B711 và B809). Các trình tự vùng biến đổi được gạch chân trong các trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các axit amin được tô đậm trong các CDR của các kháng thể đơn dòng trưởng thành ái lực chỉ báo sự thay thế so với trình tự CDR của B296. Các trình tự CDR được xác định theo phương pháp đánh số Kabat.

Bảng 1: Các mAb phospho tau nhân hóa

mAb (kháng thể đơn dòng)	V _H	V _L	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ
B235	26	31		
B252	28	34		
B280	26	34		
B282	28	31		
B296	27	31	45	46

Bảng 2: Các trình tự CDR cho miền VH (VH10) và VL (VL7) của kháng thể kháng PHF-tau nhân hóa B296

ID vùng V	Phương pháp đánh số Chothia		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSY (SỐ ID TRÌNH TỰ: 1)	SKGGN (SỐ ID TRÌNH TỰ: 2)	GWGDYGWFA Y (SỐ ID TRÌNH TỰ: 3)
VL7	KASQDINRYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ: 13)	RANRLLD (SỐ ID TRÌNH TỰ: 14)	LQYDEFPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ: 15)
	Phương pháp đánh số ABM		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYAMS (SỐ ID TRÌNH TỰ: 4)	SISKGGNTY (SỐ ID TRÌNH TỰ: 5)	GWGDYGWFA Y (SỐ ID TRÌNH TỰ: 6)
VL7	KASQDINRYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ: 16)	RANRLLD (SỐ ID TRÌNH TỰ: 17)	LQYDEFPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ: 18)
	Phương pháp đánh số Kabat		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	SYAMS (SỐ ID TRÌNH TỰ: 7)	SISKGGNTYYADSVKG (SỐ ID TRÌNH TỰ: 8)	GWGDYGWFA Y (SỐ ID TRÌNH TỰ: 9)
VL7	KASQDINRYLN (SỐ ID TRÌNH TỰ: 19)	RANRLLD (SỐ ID TRÌNH TỰ: 20)	LQYDEFPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ: 21)
	Phương pháp đánh số IMGT		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3
VH10	GFTFSSYA (SỐ ID TRÌNH TỰ: 10)	ISKGGNT (SỐ ID TRÌNH TỰ: 11)	ARGWGDYGWFA YW (SỐ ID TRÌNH TỰ: 12)
VL7	QDINRY (SỐ ID TRÌNH TỰ: 22)	RAN (SỐ ID TRÌNH TỰ: 23)	LQYDEFPLT (SỐ ID TRÌNH TỰ: 24)

Bảng 3: B296 trưởng thành ái lực

mAb (kháng thể đơn dòng)	Tên	SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự
PT1B333			
	V _H	CDR1 80	SSYAMS
		CDR2 81	SISKGGNTYYADSVKG
		CDR3 9	GWGDYGWFA Y

mAb (kháng thể đơn dòng)	Tên		SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự
		Chuỗi nặng	74	<u>QVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE</u> <u>WVASISKGGNTYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLRAEDTAV</u> <u>YYCARGWGDYGW</u> <u>FAYW</u> <u>GQVTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC</u> <u>PAPELLGGPSVFLFPPKPKD</u> <u>TL</u> <u>MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF</u> <u>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC</u> <u>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT</u> <u>CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT</u> <u>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
	V _L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		Chuỗi nhẹ	75	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRWLNWFQOKPGKAPK</u> <u>SLIYRANRLLDGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLQPEDFATYYCLQ</u> <u>YDEFPLTFGQGTKLEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL</u> <u>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK</u> <u>DSTYLSSTLT</u> <u>LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
PT1B711				
	V _H	CDR1	71	TSYAMS
		CDR2	72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGIYGFAY
		Chuỗi nặng	76	<u>QVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSRLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGK</u> <u>GLEWVASITKGGNTYYADSVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMNSLR</u> <u>AEDTAVYYCARGWGIYGW</u> <u>FAYW</u> <u>GQVTLVTVSSASTKGPSVFPL</u> <u>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP</u> <u>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK</u> <u>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD</u> <u>TL</u> <u>MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
	V _L	CDR1	70	KASQDINRWLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		Chuỗi nhẹ	77	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRWLNWFQOKPGKAP</u> <u>KSLIYRANRLLDGVP</u> <u>SRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLQPEDFATYYC</u> <u>LQYDEFPLTFGQGTKLEIK</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV</u>

mAb (kháng thể đơn dòng)	Tên		SỐ ID TRÌNH TỰ:	Trình tự
				VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PT1B809				
	V _H	CDR1	71	TSYAMS
		CDR2	72	SITKGGNTYYADSVKG
		CDR3	73	GWGIYGFAY
		Chuỗi nặng	78	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPG</u> <u>KGLEWVASITKGGNTYYADSVKGRTISRDNKNTLYLQMNS</u> <u>LRAEDTAVYYCARGWGIYGFAYWGQVTLTVSSASTKGPSVF</u> PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	V _L	CDR1	19	KASQDINRYLN
		CDR2	20	RANRLLD
		CDR3	21	LQYDEFPLT
		Chuỗi nhẹ	79	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYLNWFQQKPG</u> <u>KAPKSLIYRANRLLDGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPED</u> <u>FATYYCLQYDEFPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE</u> QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

Các kháng thể nhân hóa có các đơn phân của khung vùng biến đổi về cơ bản là từ kháng thể người (được gọi là kháng thể đối tượng nhận) và các vùng xác định bổ sung về cơ bản là từ kháng thể không phải của người (tức là, kháng thể chuột) (được gọi là globulin miễn dịch của đối tượng cho). Xem Queen và cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ)* 86:10029-10033, 1989, WO 90/07861, US5693762, US5693761, US5585089, US5530101, và US5225539. Các vùng hằng định, nếu có, về cơ bản hoặc hoàn toàn cũng là globulin miễn dịch người. Các miền biến đổi người thường được chọn từ các kháng thể người có các trình tự khung biểu hiện tính đồng

nhất trình tự mức cao với các miền của vùng biến đổi chuột mà CDR có nguồn gốc từ đó. Các đơn phân của khung vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể có nguồn gốc từ cùng một trình tự kháng thể người hoặc từ các trình tự kháng thể người khác nhau. Các trình tự kháng thể người có thể là các trình tự của kháng thể người tồn tại một cách tự nhiên hoặc có thể là các trình tự liên ứng của một số kháng thể người. Xem WO 92/22653. Một số axit amin từ các đơn phân của khung vùng biến đổi của người được chọn để thay thế dựa trên ảnh hưởng có thể có của chúng đối với cấu hình CDR và/hoặc tính liên kết với kháng nguyên. Nghiên cứu các tác động có thể có này được thực hiện bằng cách tạo mô hình, kiểm tra các đặc trưng của các axit amin tại một số vị trí cụ thể, hoặc quan sát thực nghiệm các ảnh hưởng của việc thay thế hoặc tạo đột biến các axit amin cụ thể.

Ví dụ, khi axit amin khác với đơn phân của khung vùng biến đổi của chuột và đơn phân của khung vùng biến đổi của người đã chọn, axit amin của khung người thường được thay thế bằng axit amin khung tương tự từ kháng thể chuột, trong đó người ta mong đợi một cách hợp lý rằng axit amin: (1) liên kết không cộng hóa trị với kháng nguyên một cách trực tiếp, (2) liên kề với vùng CDR, (3) tương tác với vùng CDR theo cách khác (ví dụ, bên trong khoảng 6 angstrom của vùng CDR), hoặc (4) tham gia trong giao diện VL-VH.

Các ứng viên khác để thay thế là các axit amin khung người của đối tượng nhận không bình thường đối với globulin miễn dịch người tại vị trí đó. Các axit amin này có thể được thay thế bằng các axit amin từ vị trí tương tự của kháng thể đối tượng cho là chuột hoặc từ vị trí tương tự của globulin miễn dịch người điển hình hơn. Các ứng viên khác để thay thế là các axit amin khung người của đối tượng nhận không bình thường đối với globulin miễn dịch người tại vị trí đó. Các khung vùng biến đổi của globulin miễn dịch nhân hóa thường biểu hiện đồng nhất trình tự ít nhất 85 % với các trình tự khung vùng biến đổi người hoặc trình tự liên ứng của các trình tự này.

Có thể thực hiện nhân hóa kháng thể bằng các phương pháp đã biết, như tái tạo bề mặt đơn phân xác định tính đặc hiệu (SDRR) (US2010/0261620), tái tạo bề mặt (Padlan và cộng sự *Mol. Immunol (Miễn dịch học phân tử)* 28:489-98, 1991), siêu nhân hóa (WO 04/006955) và tối ưu hóa hàm lượng chuỗi của người (US7657380). Người có trình độ trong ngành có thể chọn các trình tự khung hữu ích để ghép hoặc nhân hóa từ cơ sở dữ liệu phù hợp. Các khung được chọn có thể được cải biến thêm để bảo toàn hoặc tăng cường ái lực liên kết bằng các kỹ thuật như các kỹ thuật được bộc lộ trong

(Queen và cộng sự, 1989, *Id.*) Theo các phương án cụ thể, các phương pháp nhân hóa các kháng thể kháng PHF-tau từ kháng thể mẹ từ chuột bao gồm các phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4 dưới đây.

Có thể sản xuất kháng thể của sáng chế bằng nhiều loại kỹ thuật, ví dụ bằng phương pháp tế bào lai (Kohler và Milstein, *Nature*. 256:495-7, 1975). Các kháng thể đơn dòng hỗn hợp chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ kháng thể đối tượng cho (thường là chuột) liên kết với các vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ kháng thể đối tượng nhận (thường là loài động vật có vú khác như con người) có thể được điều chế bằng phương pháp bộc lộ trong US4816567. Các kháng thể đơn dòng được ghép CDR có CDR có nguồn gốc từ globulin miễn dịch đối tượng cho không phải là người (thường là chuột) và các phần dẫn xuất từ globulin miễn dịch còn lại có nguồn gốc từ một hoặc nhiều globulin miễn dịch của người có thể được điều chế bằng các kỹ thuật được những người có trình độ trong ngành biết như các kỹ thuật bộc lộ trong US5225539. Có thể điều chế kháng thể đơn dòng người đầy đủ nhưng thiếu trình tự không phải của người bất kỳ từ chuột biến đổi gen globulin miễn dịch người bằng các kỹ thuật được dẫn trong (Lonberg và cộng sự, *Nature*. 368:856-9, 1994; Fishwild và cộng sự, *Nat Biotechnol. (Công nghệ sinh học tự nhiên)* 14:845-51, 1996; Mendez và cộng sự, *Nat Genet. (Di truyền học tự nhiên)* 15:146-56, 1997). Có thể điều chế và tối ưu hóa các kháng thể đơn dòng người từ các thư viện biểu hiện trên thực khuẩn (Knappik và cộng sự, *J Mol Biol. (Tạp chí Sinh học phân tử)* 296:57-86, 2000; Krebs và cộng sự, *J Immunol Methods. (Tạp chí Phương pháp miễn dịch học)* 254:67-84, 2001; Shi và cộng sự, *J Mol Biol. (Tạp chí sinh học phân tử)* 397:385-96, 2010).

Các kháng thể đơn dòng của sáng chế bao gồm các kháng thể có HCDR1 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số sau: 1, 4, 7, 10, 71, 80; HCDR2 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số sau: 2, 5, 8, 11, 72, 81; HCDR3 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 3, 6, 9, 12, 73; LCDR1 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 13, 16, 19, 22, 70; LCDR2 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 14, 17, 20, 23; LCDR3 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 15, 18, 21, 24. Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể đơn dòng có các trình tự CDR đồng nhất ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn là ít nhất 98 %, tốt hơn nữa là ít nhất 99 % với HCDR1 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số sau: 1, 4, 7, 10, 71, 80; HCDR2 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số sau: 2, 5, 8, 11, 72, 81; HCDR3 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 3, 6, 9, 12, 73; LCDR1

có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 13, 16, 19, 22, 70; LCDR2 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 14, 17, 20, 23; LCDR3 có SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số: 15, 18, 21, 24.

Trong một phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến các kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc các mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm:

- (1) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là 4, 5 và 6, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17 và 18;
- (2) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 1, 2 và 3, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 13, 14 và 15;
- (3) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 7, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 19, 20 và 21;
- (4) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 10, 11 và 12, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 22, 23 và 24;
- (5) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là 80, 81 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 70, 20 và 21;
- (6) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 71, 72, 73, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 70, 20 và 21;
- (7) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 71, 72 và 73, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 19, 20 và 21;
- (8) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;
- (9) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34;

(10) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34; hoặc

(11) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;

trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau, tốt hơn là PHF-tau người, và trong đó các vùng khung trong miền vùng biến đổi chuỗi nặng và trong miền vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin từ globulin miễn dịch người.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 26, 27, 28 hoặc 29, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với SỐ ID TRÌNH TỰ: 31, 32, 33 hoặc 34.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với vùng biến đổi trong chuỗi nặng có trình tự có các SỐ ID TRÌNH TỰ bất kỳ trong các số sau: 74, 76, và 78, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 75, 77 và 79.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit

đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 31.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 34.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 34.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 31.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit

đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 31.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với vùng biến đổi trong chuỗi nặng có trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với vùng biến đổi trong chuỗi nặng có trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 77.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với vùng biến đổi trong chuỗi nặng có trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 79.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 45 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là

ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 46. Trong một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 45 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 46.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 75. Trong một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 77. Trong một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 77.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với trình tự có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 79. Trong một phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể

nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 79.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng hằng định IgG1 chuỗi nặng người và vùng hằng định kappa chuỗi nhẹ người.

Theo phương án cụ thể khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên liên kết với PHF-tau người với hằng số phân ly (K_D) nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-9} M, tốt hơn là K_D nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, trong đó K_D được đo bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt, chẳng hạn như bằng cách sử dụng hệ thống Biacore hoặc ProteOn.

Hoạt tính hoạt động của kháng thể nhân hóa và mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau có thể được đặc trưng hóa bằng các phương pháp đã biết trong ngành và các phương pháp được mô tả trong tài liệu này. Các phương pháp đặc trưng hóa kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau bao gồm, nhưng không giới hạn, các xét nghiệm về ái lực và tính đặc hiệu bao gồm Biacore, ELISA, và phân tích FACS; phân tích hóa mô miễn dịch; các xét nghiệm tế bào trong ống nghiệm và xét nghiệm tiêm trong cơ thể sống để xác định hiệu lực của các kháng thể trong việc ức chế sự gieo mầm tau; xét nghiệm về tính gây độc tế bào để phát hiện sự có mặt của hoạt tính gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và/hoặc gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) của các kháng thể; v.v. Theo các phương án cụ thể, các phương pháp đặc trưng hóa kháng thể và mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau bao gồm các phương pháp được mô tả trong Ví dụ 5, 6, 8 và 9 dưới đây. Ví dụ về kháng thể mẹ từ chuột của các kháng thể nhân hóa liên kết với PHF-tau chứ không phải tau đối chứng là kháng thể PT3, có vùng biến đổi chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 25 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 30 (xem, ví dụ, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 9,371,376, được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn).

Có thể sử dụng một số phương pháp đã biết để xác định epitope liên kết của kháng thể của sáng chế. Ví dụ, khi cấu trúc của cả hai thành phần đều được biết, thì có thể thực hiện mô phỏng trên máy tính kỹ thuật kết nối protein-protein (protein-protein docking). Có thể thực hiện trao đổi hydro-deuteri (H/D) với phức hợp kháng

nguyên và kháng thể để ánh xạ các vùng trên kháng nguyên liên kết bởi kháng thể. Có thể sử dụng kỹ thuật gây đột biến đoạn và điểm đối với kháng nguyên để định vị các axit amin quan trọng cho việc liên kết kháng thể. Cấu trúc đồng tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể được sử dụng để nhận dạng các đơn phân đóng góp tạo nên epitope và paratope. Theo các phương án cụ thể, các phương pháp xác định epitope liên kết của kháng thể bao gồm các phương pháp được mô tả trong Ví dụ 2, 3 và 7 dưới đây.

Các kháng thể của sáng chế có thể là kháng thể đặc hiệu đôi hoặc đa hiệu. Kháng thể đặc hiệu đôi mẫu có thể liên kết với hai epitope khác nhau trên PHF-tau hoặc có thể liên kết với PHF-tau và beta dạng bột (Abeta). Kháng thể đặc hiệu đôi mẫu khác có thể liên kết với PHF-tau và thụ thể xuyên bào qua hàng rào máu não nội sinh như thụ thể insulin, thụ thể chuyển, thụ thể yếu tố tăng trưởng như insulin-1, và thụ thể lipoprotein. Kháng thể mẫu thuộc loại IgG1.

Đặc tính thực thi miễn dịch của kháng thể của sáng chế có thể được tăng cường hoặc bất hoạt bằng cách điều hòa Fc bằng các kỹ thuật được những người có trình độ trong ngành biết. Ví dụ, các chức năng thực thi của Fc như liên kết C1q, độc tính đối với tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), độc tính đối với tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào (phagocytosis), giảm biểu hiện thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), v.v. có thể được cung cấp và/hoặc điều khiển bằng cách điều hòa các gốc trong Fc chịu trách nhiệm cho các hoạt tính này. Các đặc tính dược động học cũng có thể được tăng cường bằng cách gây đột biến các đơn phân trong miền Fc kéo dài thời gian bán thải của kháng thể (Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* (Quan điểm hiện nay về công nghệ sinh học) 20:685-91, 2009).

Ngoài ra, các kháng thể của sáng chế có thể được điều hòa sau khi dịch mã bằng các quy trình như glycosyl hóa, isome hóa, khử đường ra khỏi glycogen hoặc điều hòa cộng hóa trị xảy ra phi tự nhiên như bổ sung các phần polyetylen glycol và điều hòa bằng cách liên kết với chất béo (lipidation). Các điều hòa này có thể xảy ra *trong cơ thể sống* hoặc *trong ống nghiệm*. Ví dụ, các kháng thể của sáng chế có thể được tiếp hợp vào polyetylen glycol (tiếp hợp với PEG) để tăng mức dược động học của chúng. Có thể thực hiện tiếp hợp bằng các kỹ thuật mà các chuyên gia trong ngành đã biết. Việc tiếp hợp các kháng thể điều trị với PEG đã được chứng tỏ là làm tăng cường dược lực học trong khi không làm ảnh hưởng đến chức năng (Knight và cộng sự, *Plateles* (Tiểu cầu) 15:409-18,

2004; Leong và cộng sự, *Cytokine*. 16:106-19, 2001; Yang và cộng sự, *Protein Eng* (Kiến tạo protein) 16:761-70, 2003).

Trong phương án chung khác, sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Những người có trình độ trong ngành sẽ hiểu rằng trình tự mã hóa của protein có thể được thay đổi (ví dụ, được thay thế, bị làm mất đoạn, bị chèn đoạn) mà không thay đổi trình tự axit amin của protein. Theo đó, những người có trình độ trong ngành sẽ hiểu rằng trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể nhân hóa của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có thể được thay đổi mà không thay đổi trình tự axit amin của các protein này. Các ví dụ về polynucleotit phân lập là các polynucleotit mã hóa polypeptit bao gồm các CDR chuỗi nặng của globulin miễn dịch HCDR1, HCDR2 và HCDR3 được thể hiện theo SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là 4, 5 và 6, hoặc các polypeptit bao gồm các CDR chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được thể hiện theo các SỐ ID TRÌNH TỰ lần lượt là 16, 17 và 18. Các ví dụ khác về polynucleotit phân lập là các polynucleotit có các trình tự được thể hiện theo các SỐ ID TRÌNH TỰ: 36-39 hoặc 41-44, mã hóa các vùng biến đổi của kháng thể của sáng chế. Trong trường hợp có suy biến mã di truyền hoặc ưu tiên codon trong hệ biểu hiện đã cho, các polynucleotit khác mã hóa các kháng thể của sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Axit nucleic phân lập của sáng chế có thể được tạo bằng kỹ thuật tổng hợp hoặc tái tổ hợp đã biết. ADN mã hóa kháng thể đơn dòng đã được phân lập và giải trình tự bằng các phương pháp đã biết trong ngành. Khi tế bào lai được tạo ra, các tế bào này có thể có vai trò làm nguồn của ADN này. Hoặc, có thể sử dụng các kỹ thuật biểu hiện trong đó trình tự mã hóa và sản phẩm dịch mã được liên kết, như thư viện biểu hiện trên trục khuẩn hoặc ribô thể.

Trong phương án chung khác, sáng chế cũng đề cập đến vector bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Có thể sử dụng vector bất kỳ được người có trình độ trong ngành biết đến theo quan điểm của sáng chế, như plasmid, cosmid, vector thực khuẩn hoặc vector vi rút. Trong một số phương án, vector là vector biểu hiện tái tổ hợp như plasmid. Vector có thể bao gồm phần tử bất kỳ để thiết lập chức năng thông thường của vector biểu hiện, ví dụ, vùng khởi động, phần tử bám ribô thể, vùng kết thúc, vùng tăng cường, dấu ấn chọn lọc, hoặc gốc sao chép. Vùng khởi động có thể là vùng khởi động cơ định, cảm ứng hoặc ức chế. Số vector biểu hiện có khả năng đưa axit nucleic đến tế

bào đã được biết đến trong ngành và có thể được sử dụng ở đây để sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó trong tế bào. Có thể sử dụng các kỹ thuật tạo dòng thông thường hoặc tổng hợp gen nhân tạo để tạo vector biểu hiện tái tổ hợp theo phương án của sáng chế.

Trong phương án chung khác, sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ bao gồm polynucleotit được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Có thể sử dụng tế bào chủ bất kỳ được người có trình độ trong ngành biết đến theo quan điểm của sáng chế để biểu hiện tái tổ hợp kháng thể của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Các tế bào chủ có thể là tế bào nhân thực, tế bào vi khuẩn, tế bào thực vật hoặc tế bào cổ khuẩn. Các tế bào nhân thực có thể có nguồn gốc từ, ví dụ, động vật có vú, côn trùng, gia cầm, hoặc các loại động vật khác. Các tế bào nhân thực nguồn gốc động vật có vú bao gồm các dòng tế bào bất tử như dòng tế bào lai hoặc dòng tế bào u tủy như các dòng tế bào chuột SP2/0 (Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, Va., CRL-1581), NS0 (Bộ sưu tập châu Âu về nuôi cấy tế bào (European Collection of Cell Cultures, ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC No. 85110503), FO (ATCC CRL-1646) và Ag653 (ATCC CRL-1580). Ví dụ về dòng tế bào u tủy người là U266 (ATTC CRL-TIB-196). Các dòng tế bào hữu ích khác bao gồm các dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào buồng trứng chuột hamster Trung Quốc (CHO) như CHO-K1 (Lonza Biologics), CHO-K1 (ATCC CRL-61, Invitrogen) hoặc DG44.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, bao gồm bước nuôi cấy tế bào bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó trong các điều kiện để có thể tạo ra kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, và bước thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào (ví dụ, từ lớp bề mặt). Có thể thu hoạch các kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó từ các tế bào và được tinh chế theo các kỹ thuật thông thường trong ngành.

Dược phẩm và phương pháp điều trị

Các kháng thể kháng PHF-tau của sáng chế hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng để điều trị, giảm hoặc phòng ngừa các triệu chứng ở bệnh nhân mắc bệnh thoái

hóa thần kinh liên quan đến sự tích tụ tau gây bệnh bên trong não, hoặc bệnh lý do tau, như các bệnh nhân AD.

Theo đó, trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó và chất mang được dụng.

Theo phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị hoặc làm giảm triệu chứng của bệnh, rối loạn hoặc tình trạng như bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng được phẩm của sáng chế.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm sự kết tụ tau gây bệnh hoặc sự lan truyền bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng được phẩm của sáng chế.

Theo phương án của sáng chế, được phẩm bao gồm một lượng điều trị hữu hiệu của kháng thể kháng PHF-tau đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó. Như được sử dụng trong tài liệu này, liên quan đến kháng thể kháng PHF-tau đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó, lượng điều trị hữu hiệu có nghĩa là lượng kháng thể kháng PHF-tau đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó có tác dụng điều trị bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng; ngăn chặn hoặc làm chậm sự tiến triển bệnh, chứng rối loạn, hoặc tình trạng; hoặc làm giảm hoặc giảm nhẹ các triệu chứng liên quan đến bệnh, chứng rối loạn, hoặc tình trạng miễn dịch.

Theo các phương án cụ thể, lượng điều trị hữu hiệu là lượng điều trị đủ để đạt một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hiệu quả sau đây: (i) giảm hoặc cải thiện mức độ nghiêm trọng của bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (ii) giảm thời gian bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (iii) ngăn chặn sự tiến triển bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (iv) làm thoái lui bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (v) ngăn chặn sự phát triển hoặc khởi phát bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (vi) ngăn chặn sự tái phát bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (vii) giảm việc nhập viện của đối tượng bị bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (viii) giảm thời gian nằm viện của đối tượng bị bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan; (ix) tăng khả năng sống của đối tượng bị bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan;

(xi) ức chế hoặc làm giảm bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị hoặc triệu chứng liên quan ở đối tượng; và/hoặc (xii) tăng cường hoặc cải thiện hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa của liệu pháp khác.

Theo các phương án cụ thể, bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị là bệnh lý do tau gây ra. Theo các phương án cụ thể hơn, bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn, bệnh Alzheimer, bệnh Alzheimer rải rác, sa sút trí tuệ thùy trán-thái dương kèm hội chứng Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), liệt trên nhân tiến triển, thoái hóa hạch nền-vỏ não, bệnh Pick, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ tiến triển, sa sút trí tuệ chỉ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh lan tỏa kèm vô hóa, sa sút trí tuệ do hạt ưa bạc, hội chứng Parkinson xơ cứng cột bên teo cơ-sa sút trí tuệ, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm cơ thể vùi, bệnh Creutzfeld-Jakob, teo tuyến nhiều hệ thống, bệnh Niemann-Pick týp C, bệnh mạch máu não do thoái hóa dạng bột có nguyên nhân từ protein bị nhiễm độc, viêm toàn não xơ hóa bán cấp, loạn trương lực cơ teo, bệnh nơ-ron thần kinh vận động không phải tại Guam có đám rối sợi thần kinh, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh lý não mạn tính do chấn thương, và sa sút trí tuệ dạng chấn thương não (bệnh của võ sĩ đấm bốc).

Kiểu hình hành vi liên quan đến bệnh lý do tau bao gồm, nhưng không giới hạn, suy giảm nhận thức, biến đổi nhân cách sớm và mất phản xạ có điều kiện, vô cảm, mất ý chí, không nói, mất khả năng điều khiển động tác, lỗi tồn lưu, rối loạn động tác/hành vi định hình, kiểm tra/đụng chạm vào đối tượng bằng mồm (hyperorality), vô tổ chức, không có khả năng lập kế hoạch hoặc tổ chức các công việc tuần tự, ích kỷ/nhẫn tâm, xu hướng chống đối xã hội, thiếu thông cảm, khập khiễng, khó nói đúng ngữ pháp với các lỗi loạn ngôn thường xuyên nhưng tương đối hiểu được, hiểu kém và khó tìm từ, mất ổn định đáng đi tiến triển, đi giật lùi, đông cứng, ngã thường xuyên, cứng đờ cơ trực phản ứng không phải do levodopa, liệt giả hành não, mất khả năng điều khiển chi, loạn trương lực cơ, mất cảm giác vỏ não và rung.

Bệnh nhân cần được điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn, người không có triệu chứng nhưng có nguy cơ bị AD hoặc các bệnh lý khác do tau, cũng như các bệnh nhân hiện đang biểu hiện triệu chứng. Các bệnh nhân cần được điều trị bao gồm những người có nguy cơ di truyền đã biết về bệnh AD, như có tiền sử gia đình mắc AD hoặc có các yếu tố nguy cơ di truyền trong bộ gen. Ví dụ về các yếu tố nguy cơ là các đột biến trong

protein tiền thân dạng bột (APP), cụ thể tại vị trí 717 và các vị trí 670 và 671 (lần lượt là các đột biến Hardy và Swedish) Các yếu tố nguy cơ khác là các đột biến trong các gen preselinin PS1 và PS2 và trong ApoE4, tiền sử gia đình về bệnh tăng cholesterol máu hoặc xơ vữa. Có thể nhận diện những người đang mắc AD từ biểu hiện bệnh sa sút trí tuệ đặc trưng với sự có mặt của các yếu tố nguy cơ kể trên. Ngoài ra, cũng có một số xét nghiệm chẩn đoán để nhận dạng những người mắc bệnh AD. Các xét nghiệm này bao gồm phép đo tau trong dịch não tủy và các nồng độ Abeta 42. Nồng độ tau tăng và Abeta 42 giảm là biểu hiện của bệnh AD. Người mắc bệnh AD cũng có thể được chẩn đoán theo tiêu chí của Hiệp hội AD và các rối loạn liên quan.

Các kháng thể kháng PHF-tau của sáng chế phù hợp cho cả thuốc điều trị và phòng ngừa nhằm điều trị hay phòng ngừa các bệnh thoái hoá thần kinh liên quan đến sự kết tụ tau gây bệnh, như AD hoặc bệnh lý khác do tau. Ở các bệnh nhân không biểu hiện triệu chứng, có thể bắt đầu điều trị ở độ tuổi bất kỳ (ví dụ, khoảng 10, 15, 20, 25, 30 tuổi). Tuy nhiên, thông thường, không cần thiết phải bắt đầu điều trị cho đến khi bệnh nhân đến tuổi 40, 50, 60, hoặc 70. Điều trị thông thường đòi hỏi sử dụng nhiều liều lượng trong một khoảng thời gian nhất định. Có thể giám sát điều trị bằng cách xét nghiệm các đáp ứng kháng thể hoặc tế bào T hoặc tế bào B hoạt hóa đối với thuốc điều trị theo thời gian. Nếu đáp ứng giảm, có thể chỉ định liều tăng cường.

Trong các ứng dụng phòng ngừa, các dược phẩm hoặc dược phẩm được sử dụng cho bệnh nhân dễ bị, hay có nguy cơ bị AD với một lượng đủ để loại trừ hoặc làm giảm nguy cơ, giảm độ nghiêm trọng hoặc trì hoãn khởi phát bệnh, bao gồm các triệu chứng sinh hóa, mô học và/hoặc hành vi của bệnh, các biến chứng của bệnh và kiểu hình bệnh trung gian biểu hiện trong thời gian phát triển bệnh. Trong các ứng dụng điều trị, các chế phẩm hoặc dược phẩm được sử dụng cho bệnh nhân nghi ngờ hoặc đang mắc bệnh với một lượng đủ để làm giảm, ngừng phát triển hoặc trì hoãn triệu chứng bất kỳ của bệnh (ví dụ triệu chứng sinh hóa, mô học và/hoặc hành vi). Việc sử dụng thuốc điều trị có thể làm giảm hoặc loại trừ biểu hiện suy giảm nhận thức thể nhẹ ở bệnh nhân chưa phát triển bệnh lý Alzheimer đặc trưng.

Liều hoặc lượng điều trị hữu hiệu có thể thay đổi theo nhiều yếu tố, như bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng được điều trị, cách sử dụng, vị trí đích, tình trạng sinh lý học của đối tượng (bao gồm, ví dụ, tuổi, cân nặng, sức khỏe), dù đối tượng là người hoặc con vật, dược phẩm khác được sử dụng, và dù việc điều trị là phòng ngừa hoặc

chữa bệnh. Các liệu điều trị được chuẩn độ tối ưu để tối ưu hóa tính an toàn và hiệu quả.

Các kháng thể của sáng chế có thể được điều chế làm được phẩm chứa lượng điều trị hữu hiệu kháng thể làm hoạt chất trong chất mang dược dụng. Chất mang này có thể là chất lỏng, như nước và dầu, bao gồm chất lỏng có nguồn gốc dầu hỏa, động vật, rau củ hoặc tổng hợp, như dầu đậu phộng, dầu nành, dầu khoáng, dầu mè, v.v. Ví dụ, có thể sử dụng dung dịch muối đẳng trương 0,4 % và glyxin 0,3 %. Các dung dịch này vô trùng và thường không có vật chất dạng hạt. Chúng có thể được khử trùng bằng kỹ thuật khử trùng thông thường đã biết (ví dụ, lọc). Các chế phẩm có thể chứa chất phụ trợ dược dụng theo yêu cầu đối với các tình trạng sinh lý học liên quan như chất đệm và điều chỉnh pH, chất ổn định, chất làm dày, chất bôi trơn và chất tạo màu, v.v. Nồng độ của các kháng thể của sáng chế trong dược phẩm này có thể thay đổi trong phạm vi rộng, nghĩa là từ nhỏ hơn khoảng 0,5 %, thông thường ở khoảng hoặc ít nhất khoảng 1 % lên đến mức 15 hoặc 20 % khối lượng và có thể được lựa chọn chủ yếu theo liều lượng, thể tích chất lỏng, độ nhớt theo yêu cầu, v.v., theo đường dùng cụ thể đã chọn.

Đường dùng kháng thể của sáng chế cho mục đích điều trị có thể là đường dùng phù hợp bất kỳ truyền được thuốc đến vật chủ. Ví dụ, các chế phẩm được mô tả ở đây có thể có công thức phù hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi hoặc nội sọ, hoặc có thể được truyền vào dịch não tủy của não hoặc cột sống.

Điều trị có thể theo lịch cho liều dạng đơn liều, hoặc đa liều trong đó giai đoạn điều trị chính có thể bao gồm 1-10 liều riêng biệt, sau đó cho thêm các liều khác cách quãng theo yêu cầu để duy trì và/hoặc củng cố đáp ứng, ví dụ, ở thời điểm sau 1-4 tháng cho liều thứ hai, và nếu cần, (các) liều tiếp theo sau vài tháng. Các ví dụ về lịch điều trị phù hợp bao gồm: (i) 0, 1 tháng và 6 tháng, (ii) 0, 7 ngày và 1 tháng, (iii) 0 và 1 tháng, (iv) 0 và 6 tháng, hoặc các lịch trình khác đủ để tạo ra các đáp ứng mong muốn cần thiết để làm giảm các triệu chứng bệnh hoặc giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh.

Các kháng thể của sáng chế có thể được đông khô để bảo quản và được hoàn nguyên trong chất mang phù hợp trước khi sử dụng. Kỹ thuật này đã cho thấy hiệu quả với kháng thể và các chế phẩm protein khác và có thể sử dụng kỹ thuật đông khô và hoàn nguyên được biết đến trong ngành.

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm được sử dụng trong điều trị bệnh lý do tau có thể được sử dụng kết hợp với các chất khác có hiệu quả điều trị đối với bệnh thoái hóa thần kinh liên quan. Trong trường hợp AD, các kháng thể của sáng chế có thể được cho sử dụng kết hợp với các chất làm giảm hoặc ngăn chặn sự kết tụ amyloid-beta (Abeta). Có thể các bệnh lý PHF-tau và Abeta có tính đồng vận. Do đó, liệu pháp điều trị kết hợp nhắm đích loại trừ cùng lúc cả bệnh lý liên quan đến PHF-tau và Abeta và bệnh lý liên quan đến Abeta sẽ có hiệu quả hơn là nhắm đích từng bệnh. Trong trường hợp bệnh Parkinson và các bệnh thoái hóa thần kinh liên quan, điều hòa miễn dịch để thanh thải các dạng protein alpha-synuclein kết tụ cũng là một liệu pháp mới nổi. Liệu pháp điều trị kết hợp nhằm thanh thải đồng thời cả protein tau và protein alpha-synuclein có thể hiệu quả hơn là nhắm đích từng protein.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất được phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm bước kết hợp kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó với chất mang được dùng để thu về được phẩm.

Phương pháp chẩn đoán và kit chẩn đoán

Các kháng thể kháng PHF-tau đơn dòng của sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán AD hoặc các bệnh lý khác do tau ở đối tượng.

Trong phương án chung khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của PHF-tau ở đối tượng và phương pháp chẩn đoán bệnh lý do tau bằng cách phát hiện sự có mặt của PHF-tau ở đối tượng với việc sử dụng kháng thể đơn dòng của sáng chế hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó.

Có thể phát hiện tau được phosphoryl hóa ở mẫu sinh học lấy từ đối tượng (ví dụ, mẫu máu, huyết thanh, huyết tương, dịch ruột hoặc dịch não tủy) bằng cách cho mẫu sinh học tiếp xúc với thuốc thử chứa kháng thể chẩn đoán, và phát hiện sự liên kết của thuốc thử chứa kháng thể chẩn đoán với tau được phosphoryl hóa trong mẫu từ đối tượng. Các xét nghiệm phát hiện bao gồm các phương pháp đã biết như ELISA, hóa mô miễn dịch, phương pháp lai thâm protein, hoặc ghi hình *trong cơ thể sống*. Ví dụ về kháng thể chẩn đoán là kháng thể PT3 của sáng chế.

Có thể sử dụng các kháng thể chẩn đoán hoặc thuốc thử tương tự bằng cách tiêm tĩnh mạch vào cơ thể bệnh nhân, hoặc trực tiếp vào não bằng đường phù hợp truyền được thuốc vào vật chủ. Liều kháng thể cần phải nằm trong khoảng giống như

khoảng dùng trong các phương pháp điều trị. Thông thường, kháng thể được gắn nhãn, mặc dù trong một số phương pháp, kháng thể sơ cấp có ái lực với tau được phosphoryl hóa không được gắn nhãn, và thuốc thử được gắn nhãn thứ cấp được sử dụng để liên kết với kháng thể sơ cấp. Việc lựa chọn nhãn tùy thuộc vào phương tiện phát hiện. Ví dụ, nhãn huỳnh quang phù hợp để phát hiện dạng quang. Sử dụng nhãn thuận từ phù hợp để phát hiện theo dạng chụp cắt lớp mà không cần can thiệp phẫu thuật. Các nhãn phóng xạ cũng có thể được dùng để phát hiện bằng PET hoặc SPECT.

Thực hiện chẩn đoán bằng cách so sánh số lượng, kích thước, và/hoặc cường độ của PHF-tau được gắn nhãn, các khối kết tụ tau và/hoặc các đám rối sợi thần kinh ở mẫu lấy từ đối tượng, với các giá trị ở thời điểm khởi điểm tương ứng. Các giá trị ở thời điểm khởi điểm có thể là các nồng độ trung bình ở nhóm cá thể khỏe mạnh. Các giá trị ở thời điểm khởi điểm cũng có thể là các nồng độ trước đó được xác định ở cùng đối tượng.

Cũng có thể sử dụng các phương pháp chẩn đoán kể trên để theo dõi đáp ứng của đối tượng với liệu pháp bằng cách phát hiện sự có mặt của tau được phosphoryl hóa ở đối tượng trước, trong hoặc sau khi điều trị. Các giá trị giảm so với thời điểm khởi điểm là tín hiệu cho thấy đáp ứng tích cực với điều trị. Các giá trị cũng có thể tạm thời tăng trong các dịch sinh học do tau gây bệnh đang bị thanh thải ra khỏi não.

Sáng chế còn đề cập đến kit để thực hiện các phương pháp chẩn đoán và theo dõi kể trên. Thông thường, các kit này chứa các thuốc thử chẩn đoán như các kháng thể của sáng chế và, tùy chọn, nhãn có thể được phát hiện. Kháng thể chẩn đoán tự nó có thể chứa nhãn có thể được phát hiện (ví dụ, phân tử huỳnh quang, biotin, v.v.) mà có thể được phát hiện trực tiếp hoặc được phát hiện qua phản ứng phụ (ví dụ, phản ứng với streptavidin). Hoặc, có thể sử dụng thuốc thử thứ hai chứa nhãn có thể được phát hiện, trong đó thuốc thử thứ hai có tính đặc hiệu liên kết với kháng thể sơ cấp. Trong kit chẩn đoán phù hợp để đo PHF-tau trong mẫu sinh học, các kháng thể của kit có thể được cung cấp trong tình trạng liên kết trước với pha rắn, như với các giếng của đĩa vi chuẩn.

Nội dung của tất cả tài liệu tham chiếu được nêu (bao gồm các tài liệu tham chiếu bằng văn bản, bằng sáng chế đã được cấp, đơn xin cấp bằng sáng chế đã công bố, đơn xin cấp bằng sáng chế cùng đang chờ xử lý) trong đơn này đều được kết hợp vào đơn này một cách đầy đủ bằng viện dẫn.

CÁC PHƯƠNG ÁN

Sáng chế còn cung cấp các phương án không giới hạn sau đây.

Phương án 1 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với protein tau được phosphoryl hóa tại epitope được phosphoryl hóa trong miền giàu prolin của protein tau.

Phương án 2 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với protein tau được phosphoryl hóa tại epitope được phosphoryl hóa bao gồm T212 được phosphoryl hóa của protein tau, tốt hơn là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với epitope được phosphoryl hóa có hoặc thuộc trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ:54.

Phương án 3 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với protein tau được phosphoryl hóa tại epitope được phosphoryl hóa bao gồm T217 được phosphoryl hóa của protein tau, tốt hơn là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với epitope được phosphoryl hóa có hoặc thuộc trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ:52.

Phương án 4 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với protein tau được phosphoryl hóa tại epitope được phosphoryl hóa bao gồm T212 được phosphoryl hóa và T217 được phosphoryl hóa của protein tau, tốt hơn là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với epitope được phosphoryl hóa có hoặc thuộc trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ:48.

Phương án 5 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm:

- (1) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 4, 5 và 6, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 16, 17 và 18;
- (2) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 1, 2 và 3, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 13, 14 và 15;

- (3) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 7, 8 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 19, 20 và 21;
 - (4) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 10, 11 và 12, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 22, 23 và 24;
 - (5) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 80, 81 và 9, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 70, 20 và 21;
 - (6) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 71, 72, 73, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 70, 20 và 21;
 - (7) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 71, 72 và 73, và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 có các trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: lần lượt là 19, 20 và 21;
 - (8) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;
 - (9) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34;
 - (10) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34; hoặc
 - (11) HCDR1, HCDR2 và HCDR3 của vùng V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của vùng V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;
- trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó liên kết với PHF-tau, và
- trong đó, các vùng khung trong miền vùng biến đổi chuỗi nặng và trong miền vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin từ globulin miễn dịch người.

Phương án 6 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với SỐ ID TRÌNH TỰ: 26, 27, 28 hoặc 29, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với SỐ ID TRÌNH TỰ: 31, 32, 33 hoặc 34.

Phương án 7 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với vùng biến đổi trong chuỗi nặng có trình tự bất kỳ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74, 76, và 78, hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự bất kỳ có các SỐ ID TRÌNH TỰ: 75, 77 và 79.

Phương án 8 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm:

(1) V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;

(2) V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34;

(3) V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 26 và V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 34;

(4) V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 28 và V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;

(5) V_H có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 27 và V_L có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ: 31;

(6) V_H có trình tự polypeptit của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 74 và V_L có trình tự polypeptit của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 75;

(7) V_H có trình tự polypeptit của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 76 và V_L có trình tự polypeptit của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 77; hoặc

(8) V_H có trình tự polypeptit của chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 78 và V_L có trình tự polypeptit của chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 79.

Phương án 9 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 % với SỐ ID TRÌNH TỰ: 45 và chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit đồng nhất ít nhất 80 %, tốt hơn là ít nhất 85 %, tốt hơn là ít nhất 90 %, tốt hơn là ít nhất 95 %, tốt hơn nữa là ít nhất 98 %, và tốt nhất là 100 %, với SỐ ID TRÌNH TỰ: 46.

Phương án 10 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 9, bao gồm vùng hằng định IgG1 của chuỗi nặng người và vùng hằng định kappa của chuỗi nhẹ người.

Phương án 11 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 10, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên liên kết với PHF-tau người với K_D nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-9} M, tốt hơn là K_D nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, trong đó K_D được đo bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt, chẳng hạn như bằng cách sử dụng hệ thống Biacore.

Phương án 12 là axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 12.

Phương án 13 là vectơ bao gồm axit nucleic được phân lập theo phương án 12.

Phương án 14 là tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo phương án 13.

Phương án 15 là dược phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11 và chất mang dược dụng.

Phương án 16 là phương pháp làm giảm sự kết tụ tau gây bệnh hoặc sự lan truyền bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dược phẩm theo phương án 15.

Phương án 17 là phương pháp điều trị bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng dược phẩm theo phương án 15.

Phương án 18 là phương pháp theo phương án 17, còn bao gồm bước cho đối tượng sử dụng chất bổ sung để điều trị bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị.

Phương án 19 là phương pháp điều trị bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị, bao gồm bước cho đối tượng sử dụng được phẩm theo phương án 15, trong đó bệnh lý do tau được chọn từ nhóm bao gồm bệnh tương tự như bệnh Alzheimer, bệnh Alzheimer rải rác, sa sút trí tuệ thùy trán-thái dương kèm hội chứng Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), liệt trên nhân tiến triển, thoái hóa hạch nền-vỏ não, bệnh Pick, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ tiến triển, sa sút trí tuệ chỉ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh lan tỏa kèm vô hóa, sa sút trí tuệ do hạt ưa bạc, hội chứng Parkinson xơ cứng cột bên teo cơ-sa sút trí tuệ, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm cơ thể vùi, bệnh Creutzfeld-Jakob, teo tuyến nhiều hệ thống, bệnh Niemann-Pick tít C, bệnh mạch máu não do thoái hóa dạng bột có nguyên nhân từ protein bị nhiễm độc, viêm toàn não xơ hóa bán cấp, loạn trương lực cơ teo, bệnh nơ-ron thần kinh vận động không phải tại Guam có đám rối sợi thần kinh, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh lý não mạn tính do chấn thương, và sa sút trí tuệ dạng chấn thương não (bệnh của võ sĩ đấm bốc).

Phương án 20 là phương pháp theo phương án 19, còn bao gồm bước cho đối tượng sử dụng chất bổ sung để điều trị bệnh lý do tau ở đối tượng cần điều trị.

Phương án 21 là phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11, bao gồm bước nuôi cấy tế bào bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên trong các điều kiện để có thể tạo ra kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, và bước thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào.

Phương án 22 là phương pháp sản xuất được phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11, phương pháp bao gồm bước kết hợp kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên với chất mang được dụng để thu về được phẩm.

Phương án 23 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11 dùng để điều trị bệnh lý do tau, ở đối tượng cần sử dụng.

Phương án 24 là kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11 hoặc được phẩm theo phương án 15 dùng để điều trị bệnh lý do tau, chẳng hạn như bệnh tương tự như bệnh Alzheimer, bệnh Alzheimer rải rác, sa sút trí tuệ thùy trán-thái dương kèm hội chứng Parkinson liên

kết với nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), liệt trên nhân tiến triển, thoái hóa hạch nền-vỏ não, bệnh Pick, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ tiến triển, sa sút trí tuệ chỉ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh lan tỏa kèm vôi hóa, sa sút trí tuệ do hạt ưa bạc, hội chứng Parkinson xơ cứng cột bên teo cơ-sa sút trí tuệ, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm cơ thể vùi, bệnh Creutzfeld-Jakob, teo tuyến nhiều hệ thống, bệnh Niemann-Pick tít C, bệnh mạch máu não do thoái hóa dạng bột có nguyên nhân từ protein bị nhiễm độc, viêm toàn não xơ hóa bán cấp, loạn trương lực cơ teo, bệnh nơ-ron thần kinh vận động không phải tại Guam có đám rối sợi thần kinh, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh lý não mạn tính do chấn thương, hoặc sa sút trí tuệ dạng chấn thương não (bệnh của võ sĩ đấm bốc), ở đối tượng cần điều trị.

Phương án 25 là việc sử dụng kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11 để sản xuất được phẩm điều trị bệnh lý do tau ở đối tượng cần sử dụng.

Phương án 26 là việc sử dụng kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11 để sản xuất được phẩm điều trị bệnh lý do tau, chẳng hạn như bệnh tương tự như bệnh Alzheimer, bệnh Alzheimer rải rác, sa sút trí tuệ thùy trán-thái dương kèm hội chứng Parkinson liên kết với nhiễm sắc thể 17 (FTDP-17), liệt trên nhân tiến triển, thoái hóa hạch nền-vỏ não, bệnh Pick, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ tiến triển, sa sút trí tuệ chỉ do đám rối sợi thần kinh, đám rối sợi thần kinh lan tỏa kèm vôi hóa, sa sút trí tuệ do hạt ưa bạc, hội chứng Parkinson xơ cứng cột bên teo cơ-sa sút trí tuệ, hội chứng Down, bệnh Gerstmann-Sträussler-Scheinker, bệnh Hallervorden-Spatz, viêm cơ thể vùi, bệnh Creutzfeld-Jakob, teo tuyến nhiều hệ thống, bệnh Niemann-Pick tít C, bệnh mạch máu não do thoái hóa dạng bột có nguyên nhân từ protein bị nhiễm độc, viêm toàn não xơ hóa bán cấp, loạn trương lực cơ teo, bệnh nơ-ron thần kinh vận động không phải tại Guam có đám rối sợi thần kinh, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh lý não mạn tính do chấn thương, hoặc sa sút trí tuệ dạng chấn thương não (bệnh của võ sĩ đấm bốc), ở đối tượng cần điều trị.

Phương án 27 là phương pháp phát hiện sự có mặt của tau được phosphoryl hóa trong mẫu sinh học từ đối tượng, bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến

11, và bước phát hiện sự liên kết của kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên với PHF-tau trong mẫu từ đối tượng.

Phương án 28 là phương pháp theo phương án 27, trong đó mẫu sinh học là mẫu máu, huyết thanh, huyết tương, dịch ruột hoặc dịch não tủy.

Phương án 29 là phương pháp chẩn đoán bệnh lý do tau ở đối tượng bằng cách phát hiện sự có mặt của tau được phosphoryl hóa trong mẫu sinh học từ đối tượng, bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong các phương án từ 1 đến 11, và bước phát hiện sự liên kết của kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên với PHF-tau trong mẫu từ đối tượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây của sáng chế minh họa rõ hơn bản chất của sáng chế. Cần hiểu rằng các ví dụ sau không giới hạn sáng chế và phạm vi của sáng chế được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1 – Sự đặc trưng hóa kháng thể

PT3 và tập hợp kháng thể được dẫn xuất từ sự tạo miễn dịch cho chuột Balb/c với PHF-tau được làm giàu (ePHF-tau) từ não AD được thử nghiệm về tính chọn lọc đích đối với phospho- tau so với không phospho-tau trong xét nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn với enzym (ELISA) trực tiếp, phương pháp lai thấm protein (Western blot) và hóa mô miễn dịch (IHC). PT3 là kháng thể được dẫn xuất từ tế bào lai chuột có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng có SỐ ID TRÌNH TỰ: 25, và trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có SỐ ID TRÌNH TỰ: 30. Trình tự CDR đối với miền VH và VL của PT3 được trình bày trong Bảng sáng chế Hoa Kỳ số 9,371,376. PT3 được nhân hóa bằng phương pháp thích ứng với khung của người (HFA) (xem Ví dụ 4) để tạo kháng thể kháng phospho-tau nhân hóa của sáng chế (xem Bảng 1 và 2). B296 nhân hóa có các trình tự CDR giống như PT3. Kháng thể nhân hóa B296 được trưởng thành ái lực để tạo các kháng thể bổ sung của sáng chế (xem Bảng 3).

ELISA

PT3 tái tổ hợp là IgG1 chuột (mIgG1) được đánh giá về sự liên kết với PHF-tau được làm giàu và tau kiểu đại tái tổ hợp ở người trong định dạng ELISA. PT3 được dẫn xuất tái tổ hợp này được so sánh với PT3 được tinh chế, dẫn xuất từ tế bào lai. Các kết quả cho thấy các đường cong chuẩn độ liên kết tương đương giữa cả hai lô kháng thể PT3 được dẫn xuất tái tổ hợp và được dẫn xuất từ tế bào lai được tinh chế (HÌNH

1). Sự liên kết mạnh xuất hiện ở PHF-tau và liên kết yếu xuất hiện ở tau hòa tan với nồng độ cao hơn.

Phương pháp lai thẩm protein

Phương pháp phân tích lai thẩm protein được thực hiện với PT3 kháng tau người tái tổ hợp không phosphoryl hóa được tinh chế và PHF-tau không tan trong sarcosyl được điều chế từ não AD. PT3 biểu hiện phản ứng chọn lọc với PHF-tau, tương tự với các kháng thể tham chiếu chọn lọc phospho AT8 pS202/pT205/pS208 (Mercken và cộng sự, *Acta Neuropathol. (Tập chí bệnh học thần kinh Acta)* 84(3):265-72, 1992; Malia và cộng sự, *Proteins*. 84:427-434, 2016) và AT100 pT212/pS214 (Mercken và cộng sự, 1992, *Id.*; Hoffmann và cộng sự, *Biochemistry. (Hóa sinh)* 36(26):8114-24, 1997) (HÌNH 2). Kháng thể tham chiếu không phụ thuộc phospho HT7 (Mercken, Giáo sư Thesis: Đại học Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991) phản ứng với cả PHF-tau và tau tái tổ hợp. BT2, hướng đến epitope nhạy với phospho, chỉ phản ứng với tau tái tổ hợp không được phosphoryl hóa tại S199/S202 (Mercken, 1991, *Id.*). Trong các thí nghiệm lai thẩm protein khác, PT3 biểu hiện phản ứng yếu với tau tái tổ hợp ngay cả khi được lai thẩm với nồng độ cao hơn.

Hóa mô miễn dịch trên não người

Phân tích hóa mô miễn dịch được thực hiện trên các phần nhúng parafin được cố định bằng formalin của AD và não đối chứng để xác nhận phản ứng với bệnh lý do tau *tại chỗ*. PT3 biểu hiện mẫu phản ứng tương tự, nhưng mạnh hơn làm đối chứng dương kháng thể chẩn đoán đặc hiệu bệnh lý do tau AT8 (HÌNH 3). Không phát hiện phản ứng đáng kể với tau bình thường trong não đối chứng trong các điều kiện thí nghiệm này (HÌNH 4).

Hóa mô miễn dịch trên chuột bắt hoạt tau và kiểu đại

Phân tích IHC được thực hiện với PT3 trong não chuột bắt hoạt tau và kiểu đại. Phân tích IHC với PT3 trong não chuột kiểu đại cho thấy phản ứng với nhóm tau kiểu đại đã chọn có thể được ghi nhận trong điều kiện bảo toàn epitope tối ưu. Mẫu nhuộm PT3 cho thấy sự khu trú somatodentritic (HÌNH 5, mũi tên), giống như việc nhuộm đã mô tả trong tài liệu cho các kháng thể kháng phospho-tau trong mô dẫn xuất từ sinh thiết người và chuột (Matsuo và cộng sự, *Neuron*. 13(4):989-1002, 1994). Mẫu nhuộm sợi trục không phospho điển hình cho tau như đã ghi nhận với kháng thể tau-1 (HÌNH 6, mũi tên) không hiện diện, cho thấy PT3 có phản ứng giới hạn với nhóm tau liên kết vi ống quan trọng về

mặt sinh lý. Việc không có phản ứng ở động vật bất hoạt tau đã xác nhận tính đặc hiệu tau của mẫu nhuộm PT3.

Sự xuất hiện phosphoryl hóa ở epitope PT3 (pT212/pT217, xem Ví dụ 2) trong não chuột kiểu dại được hỗ trợ bằng cách phát hiện sự phosphoryl hóa ở chất đồng đẳng chuột T212 và T217 trong phân tích khối phổ theo Morris và cộng sự (*Nat Neurosci.* (Tạp chí khoa học thần kinh tự nhiên) 18(8):1183-9, 2015). Qua đó cho thấy epitope PT3 cũng sẽ có mặt ở giai đoạn đầu của sự phosphoryl hóa và hình thành kết tụ tau, điều này sẽ được ưu tiên cho epitope kháng thể điều trị.

Đánh giá liên kết bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)

Sự tương tác với PHF-tau và tau tái tổ hợp được đánh giá bằng SPR trên thiết bị ProteOn (Bio-Rad, Hercules, CA) và Biacore (Biacore, Uppsala, Sweden) cho các kháng thể kháng PHF-tau PT1 và PT3. Kháng thể tổng tau HT7 được thử nghiệm làm đối chứng dương, và AT8 được thử nghiệm làm kháng thể kháng PHF-tau tham chiếu.

Bảng 4 và 5 trình bày kết quả đại diện của việc đánh giá ái lực của các kháng thể với PHF tau và tau tái tổ hợp. Kháng thể đơn dòng PT3 biểu hiện liên kết rất chặt với PHF-tau (Bảng 4).

Bảng 4. Ái lực SPR ProteOn cho các mAb tái tổ hợp và tế bào lai và các Fab với PHF-tau

Tên mAb/Fab	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM) ^a
mAb HT7	$(7,06 \pm 0,62) \times 10^5$	$(9,26 \pm 2,77) \times 10^{-5}$	131 ± 41
mAb PT1 (hyb)	$2,01 \times 10^5$	$6,47 \times 10^{-5}$	322
mAb PT3 (mG2a rec)	$(3,12 \pm 0,40) \times 10^6$	$< 5,0 \times 10^{-5}$	≤ 16
Fab PT3	$(1,83 \pm 0,08) \times 10^6$	$(1,15 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	63 ± 3
mAb AT8 (hyb)	$(2,30 \pm 0,19) \times 10^6$	$(2,11 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	92 ± 8
Fab AT8	$(8,89 \pm 0,87) \times 10^5$	$(2,30 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	$25,844 \pm 2,995$

Với $n \geq 3$ mẫu trùng lặp, độ lệch chuẩn được báo cáo;

hyb, mAb được biểu hiện trên tế bào lai; rec, mAb tái tổ hợp;

^a Các giá trị K_D trong dấu ngoặc thu được bằng cách loại bỏ nồng độ mAb được thêm 75 nM.

Ái lực liên kết rõ ràng (K_D) của PT3-mG2a tái tổ hợp bằng hoặc chặt hơn 16 pM với tốc độ phân ly rất chậm. Chỉ ái lực liên kết quá yếu với tau tái tổ hợp mới được ghi nhận cho PT3 được biểu hiện trên tế bào lai trong một trong số bốn mẫu trùng lặp (Bảng 5).

Bảng 5: Ái lực SPR Biacore cho các mAb tái tổ hợp và tế bào lai và các Fab với tau tái tổ hợp

Tên mAb/Fab	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)
mAb HT7	$(3,86 \pm 2,00) \times 10^6$	$(1,18 \pm 0,54) \times 10^2$	$3,050 \pm 2,110$
mAb PT1 (hyb)		Không liên kết đáng kể ^a	
mAb PT3 (hyb)		Chỉ liên kết thấp được ghi nhận trong 1 trong số 4 mẫu trùng lặp ^a	
mAb PT3 (mG2a rec)		Không liên kết	
Fab PT3		Không liên kết	
mAb AT8 (hyb)		Không liên kết ^a	

hyb, mAb được biểu hiện trên tế bào lai; rec, tái tổ hợp;

^a Được thử nghiệm trên ProteOn với tau tái tổ hợp từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) (0,12-75 nM khi pha loãng gấp 5 lần) được xác định sau đó là sẽ kết tụ. Đối với tất cả mẫu thử nghiệm khác, tau tái tổ hợp được tạo tại chỗ được sử dụng trên Biacore.

Vì bản chất đa phân/kết tụ của PHF-tau với nhiều bản sao epitope và bản chất lưỡng trị của IgG, ái lực kháng thể đơn dòng bị ảnh hưởng bởi ái lực trong định dạng nghiên cứu này. Ái lực Fab cung cấp thông tin về ái lực nội sinh của kháng thể. Fab PT3 biểu hiện ái lực liên kết nội sinh mạnh với PHF-tau ($K_D = 63$ pM) và tốc độ phân ly chậm (Bảng 4). Phản ứng của Fab với tau tái tổ hợp trong SPR Biacore là dưới mức giới hạn phát hiện trong các điều kiện phân tích (Bảng 5).

Các nghiên cứu về sự đặc trưng hóa đã chứng minh rằng PT3 liên kết chọn lọc với PHF-tau và có ái lực cao hướng đến PHF-tau dẫn xuất từ não AD.

Ví dụ 2 - Ánh xạ epitope của PT3

Epitope của PT3 được xác định bởi cộng hưởng plasmon bề mặt (ProteOn) với nhóm phosphopeptit được mô tả trong Bảng 6.

Vật liệu và phương pháp. Fab PT3 (B187) được tạo như một phiên bản hỗn hợp với vùng hằng định IgG1/ κ người và vùng biến đổi chuột, với nhãn 6xHis tại đầu C của chuỗi nặng (VH10, SỐ ID TRÌNH TỰ: 25 và VL7, SỐ ID TRÌNH TỰ: 30). Fab được tạo bằng biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK 293, được tinh chế bằng sắc ký ái lực Ni và được thẩm tách trong Tris 50 mM với pH 7,4, NaCl 50 mM (Sino Biologicals).

Ái lực liên kết của Fab PT3 hướng đến từng phosphopeptit tau trong số 14 phosphopeptit tau được trình bày trong Bảng 6 được đánh giá bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sử dụng Bio-Rad ProteOn XPR36. Các peptit được tổng hợp bằng phương pháp hóa học tiêu chuẩn (New England Peptide) với biotin chuỗi ngắn và một phần PEG4 ở đầu N. Peptit được biotin hóa thu được trên chip bộ cảm biến sinh học NLC được phủ neutravidin và Fab PT3 chảy trên bề mặt để đo thông số động học.

Tất cả thí nghiệm đều được thực hiện ở 25 °C sử dụng dung dịch muối đệm phosphat, pH 7,4, Tween 20 0,005 % (PBST) làm dung dịch đệm đang chảy và dung dịch đệm pha loãng mẫu. Trước các mẫu đang chảy, chip NLC được tạo điều kiện bằng PBST đang chảy trên bề mặt chip trong 1 giờ. Khoảng 5-10 RU của peptit thu được trên bề mặt chip bằng cách pha loãng peptit đến 10 ng/mL trong PBST và tiêm vào các kênh dòng chảy với lượng 30 µL/phút trong 100 giây. Dung dịch pha loãng tuần tự Fab PT3 (1,1 – 90 nM) được phân tích và, ngoại trừ Peptit-8, mỗi nồng độ được đo theo bộ đôi. Sau khi bắt peptit, chuẩn độ kháng thể được tiêm với lượng 60 µL/phút trong 3 phút (pha kết hợp), sau đó là 300 giây chỉ tiêm dung dịch đệm (pha phân ly).

Dữ liệu được tham chiếu kép bằng cách trừ sự đáp ứng liên điểm và đường cong được tạo bằng việc chỉ tiêm dung dịch đệm. Bề mặt chip được tái tạo bằng một mũi tiêm axit phosphoric 0,85 % với lượng 30 µL/phút trong thời gian tiếp xúc 100 giây, sau đó là 4 mũi tiêm dung dịch đệm đang chảy trước khi tiêm chuẩn độ kháng thể tiếp theo. Việc xử lý dữ liệu và phân tích động học được thực hiện bằng phần mềm thiết bị. Dữ liệu được phân tích bằng mô hình liên kết Langmuir 1:1 đơn giản.

Kết quả. Hằng số tốc độ động học và ái lực liên kết cân bằng cho Fab PT3 được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6: Dữ liệu ái lực SPR ProteOn cho Fab PT3 liên kết với peptit

Tên peptit	Điểm được phosphoryl hóa	Trình tự***	KD trung bình (nM)	Khoảng KD hoặc STDEV (nM)	Ka trung bình (1/Ms)	khoảng ka hoặc STDEV (1/Ms)	Kd trung bình (1/s)	khoảng kd hoặc STDEV (1/s)	# của mẫu trùng lặp
Peptit-1	212/214/ 217	GTPGSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 47)	0,26	0,14 - 0,38	1,27 E+06	(0,87 - 1,67) E+06	2,80 E-04	(2,36 - 3,24) E-04	2
Peptit-2	212/217	GTPGSRSR(pT)PSLP(pT)PPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 48)	0,27	0,09 - 0,45	7,64 E+05	(5,46 - 9,82) E+05	1,68 E-04	(0,91 - 2,45) E-04	2
Peptit-3*	214/217	GTPGSRSRTP(pS)LP(pT)PPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 49)	5,57	1,64	1,04 E+06	2,83 E+06	5,47 E-03	1,77 E-04	3
Peptit-4	210/217	GTPGSR(pS)RTPSLP(pT)PPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 50)	6,60	6,48 - 6,71	9,68 E+05	(9,22 - 9,68) E+05	6,27 E-03	(6,19 - 6,27) E-03	2
Peptit-5	210/214/ 217	GTPGSR(pS)RTP(pS)LP(pT)PPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 51)	8,70	6,6 - 10,8	7,04 E+05	(5,45 - 8,63) E+05	5,84 E-03	(5,69 - 5,98) E-03	2
Peptit-6	217	GTPGSRSRTPSLP(pT)PPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 52)	11,4	10,9 - 11,9	5,41 E+05	(5,24 - 5,58) E+05	6,16 E-03	(6,06 - 6,25) E-03	2
Peptit-7	212/214	GTPGSRSR(pT)P(pS)LPTPPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 53)	13,5	11,3 - 15,7	4,22 E+05	(3,57 - 4,87) E+05	5,55 E-03	(5,49 - 5,60) E-03	2
Peptit-8**	212	GTPGSRSR(pT)PSLPPTPPTREPKK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 54)	23	n/a	2,81 E+05	n/a	6,46 E-03	n/a	1

Tên peptit	Điểm được phosphoryl hóa	Trình tự***	KD trung bình (nM)	Khoảng KD hoặc STDEV (nM)	Ka trung bình (1/Ms)	khoảng ka hoặc STDEV (1/Ms)	Kd trung bình (1/s)	khoảng kd hoặc STDEV (1/s)	# của mẫu trùng lặp
Peptit-9	214	GTPGSRSRTP(pS)LPTPTREPCK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 55)	> 500	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1
Peptit-10	210/214	GTPGSR(pS)RTP(pS)LPTPTREPCK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 56)	>500	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
Peptit-11 [#]	208/212/ 214	SPGTPG(pS)RSR(pT)P(pS)LPTPPT (SỐ ID TRÌNH TỰ: 57)	không liên kết	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1
Peptit-12	210	GTPGSR(pS)RTPSLPTPTREPCK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 58)	không liên kết	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
Peptit-13	214/220	GTPGSRSRTP(pS)LPTPP(pT)REPCK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 59)	không liên kết	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	2
Peptit-C	không	GTPGSRSRTPSLPTPTREPCK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 60)	không liên kết	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	4

Với n=2, khoảng được báo cáo;

* Với Peptit-3, n=3, độ lệch chuẩn được báo cáo;

** Với Peptit-8, n=1, không có giá trị trung bình hoặc khoảng được báo cáo;

***Trừ khi được quy định, tất cả peptit đều bao gồm đơn phân tau 204-225 (thể đồng dạng 2N4R) và chứa phần biotin chuỗi ngắn (SCBiot) và dPEG4 ở đầu N và amit ở đầu C;

Peptit-11 bao gồm các đơn phân tau 202-220 (thể đồng dạng 2N4R).

Fab PT3 biểu hiện liên kết nanomol với các peptit được phosphoryl hóa tại T212 hoặc T217, và liên kết của Fab PT3 được tăng cường khi cả T212 hoặc T217 được phosphoryl hóa. Fab PT3 liên kết tốt nhất với các peptit chứa pT212 và/hoặc pT217. Fab PT3 liên kết với ái lực tương tự với peptit tau được phosphoryl hóa tại T212/T217 (Peptit-2) và với peptit tau được phosphoryl hóa tại T212/S214/T217 (Peptit-1), chứng minh rằng việc phosphoryl hóa bổ sung tại S214 không tăng sự liên kết của Fab PT3. Fab PT3 chỉ có liên kết rất yếu với peptit pS214-tau (Peptit-9). Có ít hoặc không có tác dụng liên kết quan sát được khi S210 được phosphoryl hóa một mình hoặc kết hợp với các đơn phân được phosphoryl hóa khác. Sự phosphoryl hóa ở T220 xuất hiện để góp phần làm mất hoạt tính liên kết cho Fab PT3 (Peptit-9 so với Peptit-13). Không phát hiện được hoạt tính liên kết cho Fab PT3 kháng peptit tau không phosphoryl hóa (Peptit-C). PT3 liên kết với phosphoepitope trong miền tau giàu prolin.

Các nghiên cứu về sự liên kết cho thấy rằng epitope PT3 bao gồm pT212 và pT217, và epitope liên kết tối đa của PT3 bao gồm pT212/pT217-tau được phosphoryl hóa gấp đôi. Epitope của PT3 khác với các epitope được báo cáo khác cho các kháng thể kháng tau phụ thuộc phospho, như AT8 (pS202/pT205/pS208; Malia và cộng sự, 2016 *Id.*), AT180 (pT231; Goedert và cộng sự, *Biochemical J.* (Tập chí hóa sinh) 301(Pt3):871-877), AT270 (pT181; Goedert và cộng sự, *Id.*), PHF1 (pS396/pS404; Otvos và cộng sự, *J Neurosci Res.* (Tập chí nghiên cứu khoa học thần kinh) 39(6):669-73, 1994), 12E8 (pS262; Seubert và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 270(32):18917-22, 1995), kháng thể pS422 kháng tau (Collin và cộng sự, *Brain.* (Não) 137(Pt 10):2834-46, 2014), và kháng thể pS409 kháng tau (Lee và cộng sự, *Cell Rep.* (Báo cáo tế bào) 16(6):1690-700, 2016).

Ví dụ 3 – Cấu trúc tinh thể của phức hợp Fab PT3 + peptit tau pT212/pT217

Đồng cấu trúc của Fab PT3 (B187) với hai phosphopeptit tau được xác định bởi tinh thể học tia X dẫn đến việc xác định epitope tau và paratope PT3.

Điều chế và kết tinh mẫu. Các peptit để kết tinh được tổng hợp bởi New England Peptides và có các trình tự sau: Ac-GSRSR(pT)P(pS)LP(pT)PPT-OH (SỐ ID TRÌNH TỰ: 61) tương ứng với các đơn phân 207-220 của tau-441 (thể đồng dạng 2N4R) được phosphoryl hóa tại các đơn phân T212, S214, và T217 (peptit tau T212/pS214/pT217), và Ac-SR(pT)PSLP(pT)PPTRE-OH (SỐ ID TRÌNH TỰ: 62), tương ứng với các đơn

phân 210-222 được phosphoryl hóa tại T212 và T217 (peptit tau T212/pT217). Các peptit đông khô được hòa tan trong Tris 100 mM có pH 8,5 đến khoảng 55 mg/mL.

Fab PT3 được cô đặc đến 19,64 hoặc 17,76 mg/mL và được trộn với lượng dư mol gấp 10,7 hoặc 9,3 lần của peptit tau pT212/pS214/pT217 hoặc peptit tau pT212/pT217 để mang đến nồng độ phức hợp cuối cùng là 16,9 và 16,7 mg/mL lần lượt trong Tris 20 mM với pH 7,5, NaCl 100 mM hoặc 50 mM. Việc kết tinh được thực hiện với việc sàng lọc tại chỗ và PEG (Qiagen) bằng cách sử dụng rôbot làm kết tinh, trộn 150 nL phức hợp và 150 nL dung dịch trong dụng cụ chứa. Các tinh thể để nhiễu xạ thu được trong các điều kiện sau: Phức hợp Fab PT3 + peptit tau pT212/pS214/pT217 trong axetat 0,1 M với pH 4,5, PEG 3350 18 %, MgCl_2 , 0,2 và phức hợp Fab PT3 + peptit tau pT212/pT217 trong PEG 3350 20 %, nhôm phosphat 0,2 M (monobazơ).

Thu thập dữ liệu và xác định cấu trúc. Tinh thể của phức hợp Fab PT3 + peptit tau pT212/pS214/pT217 thu được từ axetat 0,1 M với pH 4,5, PEG 3350 18 %, MgCl_2 0,2 M (dung dịch mẹ) và được trộn với dung dịch bảo vệ cryo bao gồm dung dịch mẹ được bổ sung glyxerol 20 %. Tinh thể được làm mát nhanh trong nitơ lỏng và dữ liệu được thu thập trên máy phát tia X tiêu điểm siêu nhỏ Rigaku MicroMax™-007HF được trang bị thiết bị quang học đồng tiêu Osmic™ VariMax™, thiết bị dò Saturn 944 CCD và hệ thống làm lạnh cryo X-stream™ 2000 (Rigaku).

Dữ liệu được xử lý với XDS (Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):125-32, 2010). Việc thay thế phân tử được thực hiện với bộ định pha (McCoy và cộng sự, *J Appl Crystallogr.* (Tập chí tinh thể học ứng dụng) 40(Pt 4):658-674, 2007) trong các chương trình PHENIX (Adams và cộng sự, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):213-21, 2010) sử dụng Fab H3-23:L1-39 (PDB ID: 5I19) Fab làm mô hình tìm kiếm. Phenix.xtriage đã xác định song tinh pseudomeroherdal (giả đối xứng một phần) trong tinh thể với 7 % phần song tinh. Việc tinh chế được thực hiện bằng cách tinh chế song tinh cho phần lớn việc xây dựng mô hình. Xây dựng mô hình với Coot (Emsley và Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004) và tinh chế với phenix.refine (Adams và cộng sự, 2010, *Id.*). Giai đoạn tinh chế cuối cùng không có tinh chế song tinh, vì sau đó xác định rằng tinh chế song tinh không cải thiện sơ đồ. Dữ liệu và số liệu thống kê về sự tinh chế được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7: Dữ liệu tia X và số liệu thống kê về sự tinh chế

	Phức hợp Fab PT3+peptit tau pT212/pS214/pT217	Phức hợp Fab PT3+peptit tau pT212/pT217
Đường chùm/thiết bị dò	Rigaku MicroMax-007HF / Saturn 944	APS IMCA-CAT/ Pilatus 6M
<i>Dữ liệu</i>		
Bước sóng (Å)	1,5418	1,000
Khoảng hòa tan (Å)	30-2,5 (2,6-2,5)	8,94-2,0 (2,05-2,00)
Nhóm không gian	C2	C2
Trục ô đơn vị (Å)	125,21, 83,50, 167,41	126,24, 83,66, 166,87
Góc ô đơn vị (°)	90,00, 91,71, 90,00	90,00, 92,50, 90,00
Phân tử/đơn vị bất đối xứng	3	3
V_m (Å ³ /Da)/dung môi (%)	2,92 / 58	3,08 / 60
Tính hoàn chỉnh (%)	97,0 (89,3)	99,2 (99,6)
$R_{\text{hợp nhất}}$	0,108 (0,318)	0,053 (0,555)
$I/\sigma(I)$ trung bình	4,9 (1,7)	13,09 (2,49)
Số phản xạ được đo	177373 (11739)	384718 (27833)
Số phản xạ duy nhất	57942 (3878)	116430 (8607)
Hệ số B (Wilson) (Å ²)	29,1	36,49
<i>Thống kê về sự tinh chế</i>		
Số nguyên tử	11165	10968
Số phân tử nước	961	779
$R_{\text{hoạt động}}/R_{\text{tự do}}$ (%)	19,4/23,1	18,6 / 21,3
R.m.s.d. từ hình học lý tưởng		
Độ dài liên kết (Å)	0,005	0,008
Góc liên kết (°)	1,005	1,215
Hệ số B trung bình (Å ²)	26,87	41,2
Biểu đồ Ramachandran		
Các đơn phân trong vùng ưu tiên (%)	97,23	98,31

Các đơn phân trong vùng cho phép (%)	2,47	1,62
Phân tử ngoại lai (%)	0,31	0,08

Các giá trị trong ngoặc cho vỏ có độ phân giải cao nhất.

Tinh thể đơn của phức hợp Fab PT3+ peptit tau pT212/pT217 được dẫn xuất từ giọt tinh thể, được ngâm vài giây trong dung dịch của dụng cụ chứa (PEG 33500 20 %, nhôm phosphat 0,2 M (monobazơ)) được bổ sung glyxerol 20 % và được làm mát nhanh trong nitơ lỏng. Dữ liệu được thu thập trên đường chùm IMCA-CAT 17-ID-B tại 100 K của Advanced Photon Source (Nguồn photon năng cao) (Argonne, IL). Cường độ nhiễu xạ được thu thập trên thiết bị dò Pilatus 6M trên phép quay 180° với thời gian phơi nhiễm là 0,5 giây cho mỗi ảnh nửa độ. Dữ liệu được xử lý với XDS (Kabsch, 2010, *Id.*) đến độ phân giải tối đa là 2,0 Å. Cấu trúc được xác định bằng cách thay phân tử bằng chương trình Phaser (McCoy và cộng sự, 2007, *Id.*) sử dụng cấu trúc Fab PT3 + peptit tau pT212/pS214/pT217 làm mô hình tìm kiếm. Việc tinh chế cấu trúc được thực hiện với phenix.refine sử dụng NCS (Adams và cộng sự, 2010, *Id.*). Việc điều chỉnh mô hình được thực hiện bằng chương trình Coot (Emsley và Cowtan, 2004, *Id.*). Thu thập dữ liệu tia X và số liệu thống kê về sự tinh chế được trình bày trong Bảng 7. Khoảng cách tiếp xúc liên phân tử được tính với CONTACT (Collaborative Computational Project (Dự án tính toán phối hợp), Số 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50(Pt 5):760-3, 1994) sử dụng ngưỡng khoảng cách là 4,0 Å và được kiểm tra trực quan với Pymol.

Phân tích cấu trúc. Cấu trúc của Fab PT3 với peptit tau pT212/pS214/pT217 được xác định ở độ phân giải 2,5 Å. Có ba bản sao phức hợp cho mỗi đơn vị bất đối xứng như đã mô tả bên dưới cho cấu trúc Fab PT3 + peptit tau pT212/pT217. Cấu trúc cho thấy PT3 không tương tác với phosphat của pS214 khi T212 và T217 cũng được phosphoryl hóa (dữ liệu không được trình bày), được hỗ trợ bởi ánh xạ phosphopeptit bởi ProteOn (Ví dụ 2).

Cấu trúc của Fab PT3 với peptit tau pT212/pT217 được xác định bởi tinh thể học tia X ở độ phân giải 2,0 Å (HÌNH 7). Có ba bản sao phức hợp theo đơn vị bất đối xứng (bản sao 1: chuỗi A, C, E; bản sao 2: chuỗi B, D, F; bản sao 3: chuỗi H, L, P), bao gồm chuỗi nặng A, C, và H, chuỗi nhẹ B, D, và L, và chuỗi peptit E, F, và P. Ba bản sao rất giống nhau – các vùng biến đổi nằm trong rmsd 0,3 Å. HÌNH 7-8 là bản sao 3 (chuỗi H, L, P). Như minh họa trong HÌNH 7, chuỗi nặng và nhẹ Fab tạo túi liên

kết cận, và peptit nằm trên Fab. Phosphopeptit tau nằm trong cấu hình mở rộng với các đặc trưng nhất quán với cấu trúc bậc hai đoạn xoắn polyprollin-II.

Các đơn phân epitope peptit tau pT212/pT217 và paratope Fab PT3 bao gồm giao diện tương tác được minh họa trong HÌNH 8 và 9, và trong Bảng 8. Giao diện giữa PT3 và epitope peptit được tạo từ van der Waals và sự tương tác tĩnh điện, kéo dài từ đơn phân peptit 211 đến 221. Cấu trúc của Fab PT3 trong phức hợp với peptit tau pT212/pT217 cho thấy epitope bao gồm phosphat của pT212 và pT217. Nhóm hydroxyl chuỗi nặng Y32 tạo liên kết hydro quan trọng với oxy phosphat của pT212. Nhóm hydroxyl mạch bên của T28 (VH) cũng tạo liên kết hydro với oxy phosphat của pT212. Chuỗi nặng K53 tạo tương tác cầu muối chính với pT217. Chuỗi nặng W99 tạo tương tác kỵ nước với các đơn phân mạch bên của L215 và P216 của peptit. Đơn phân chuỗi nặng W104 có tương tác mở rộng với peptit và cũng tạo một phần giao diện VH/VL. Chuỗi nhẹ Y23 tạo tương tác kỵ nước với P219. Các tương tác tĩnh điện với phosphat của pT212 và pT217 là rất quan trọng đối với tính chọn lọc của PT3 cho phospho-tau, và các tương tác kỵ nước góp thêm vào ái lực cao của PT3 cho pT212/pT217-tau (Ví dụ 5) và PHF-tau (Ví dụ 1 và 6).

Bảng 8: Epitope và paratope của Fab PT3 + peptit tau pT212/pT217. Các đơn phân từ VL hoặc VH Fab PT3 tương tác với các đơn phân peptit tau pT212/pT217 được biểu thị. Các tương tác liên kết hydro được biểu thị với kiểu in đậm.

V _H	Peptit	V _L
T28	R211	
F27, T28 , S31 , Y32	pT212	
S31	P213	
S31, K53	S214	
S31 , Y32, K53 , W99	L215	
W99 , G100	P216	
S52, K53 , W104	pT217	
W99, G100, G103, W104	P218	
G100, D101	P219	Y32
W104	T220	Y91 , D92, E93, F94, L96
	R221	D92 , E93, F94

Ví dụ 4 – Thích ứng với khung của người cho PT3

Kháng thể chuột kháng tau PT3 được nhân hóa bằng phương pháp Thích ứng với khung người (HFA) (Fransson và cộng sự, *J Mol Biol.* (Tập chí sinh học phân tử) 398(2):214-31, 2010). Để thích ứng với khung của người, CDR được xác định theo Martin (Martin và Thornton, *J Mol Biol.* (Tập chí sinh học phân tử) 263(5):800-15, 1996). Để tìm sự kết hợp tốt nhất giữa LC và HC nhân hóa, một số trình tự vùng V chuỗi nặng và nhẹ ở người được chọn để thử nghiệm. Bốn vùng biến đổi chuỗi nặng PT3 được thích ứng với khung của người và bốn vùng biến đổi chuỗi nhẹ PT3 được thích ứng với khung của người được thiết kế và tạo dưới dạng IgG1 chuỗi nặng người hoàn chỉnh và phân tử kappa chuỗi nhẹ người (HÌNH 10). Dựa trên trình tự tương tự với VL và VH PT3 chỉ trong vùng khung (FR), gen V dòng mầm người (4 cho VH: IGHV3-23*01, IGHV3-33*01, IGHV3-11*01 và IGHV1-3*01; 4 cho VL: IGVK1-16*01, IGVK1-16*01+, IGKV1-39*01 và IGKV2-24*01) được chọn để tạo các biến thể VL và VH được thích ứng với khung của người. VL78 (IGVK1-16*01+) là đột biến một điểm của VL77 (IGVK1-16*01) và chứa đột biến D56S để loại bỏ rủi ro isome hóa tiềm ẩn. Các tên của 16 kháng thể đơn dòng biến thể HFA bắt nguồn từ sự kết hợp giữa bốn phân tử HFA HC và bốn phân tử HFA LC được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9: Biến thể HFA-PT3. B234 chứa vùng biến đổi mẹ của chuột và được đưa vào làm đối chứng dương. Dòng mầm người tương ứng được trình bày trong ngoặc. VL78 (IGVK1-16*01+) chứa đột biến một điểm của VL77 (IGVK1-16*01).

	VH10 (PT3) (SỐ ID TRÌNH TỰ:35)	VH91 (IGHV3-23*01) (SỐ ID TRÌNH TỰ:36)	VH92 (IGHV3-33*01) (SỐ ID TRÌNH TỰ:37)	VH93 (IGHV3-11*01) (SỐ ID TRÌNH TỰ:38)	VH94 (IGHV1-3*01) (SỐ ID TRÌNH TỰ:39)
VL7 (PT3) (SỐ ID TRÌNH TỰ:40)	B234				
VL77 (IGVK1-16*01) (SỐ ID TRÌNH TỰ:41)		B235	B296	B282	B268

VL78 (IGVK1-16*01+) (SỐ ID TRÌNH TỰ:42)		B250	B236	B297	B283
VL79 (IGKV1-39*01) (SỐ ID TRÌNH TỰ:43)		B265	B251	B237	B298
VL80 (IGKV2-24*01) (SỐ ID TRÌNH TỰ:44)		B280	B266	B252	B238

Sự tạo dòng và tổng hợp ADN cho nhóm gồm 16 biến thể HFA-PT3 (hIgG1/ κ) được thực hiện bằng các phương pháp tiêu chuẩn. ADN được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK (Expi293) bằng quy trình tiêu chuẩn, và các lớp tế bào nổi được thu thập sau 5 ngày trong môi trường nuôi cấy. Lớp bề mặt đã làm sạch được tinh chế bằng Protein BioSolutions ProteinMaker (Gaithersburg, MD) để tinh chế song song thông lượng cao bằng cách thu IgG trên nhựa MabSelectSure Protein A được cân bằng trước trong 1x dPBS, pH 7,2. Sau khi rửa cột với 1x dPBS, pH 7,2, kháng thể đơn dòng được rửa giải bằng natri axetat 0,1 M, pH 3,5. Các phần rửa giải được trung hòa bằng cách bổ sung Tris-HCl 2,5 M, pH 7,2 đến 20 % khối lượng, và chế phẩm protein cuối cùng là Na axetat 0,8 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 7,1.

Đánh giá ban đầu về nhóm HFA dựa trên năng suất tinh chế, mức sắc ký lỏng hiệu năng cao loại cỡ (SE-HPLC), sự liên kết với PHF-tau trong xét nghiệm liên kết ELISA và sự đặc trưng hóa lý sinh.

Fab của B296 (B324) và Fab của B252 (B326) cũng được tạo bằng cách bắt cặp vùng biến đổi HC và LC của các kháng thể đơn dòng tương ứng với vùng hằng định IgG1/ κ người và thẻ 6xHis ở đầu C của chuỗi nặng. B324 và B326 được biểu hiện trong các tế bào HEK (Expi293) và được tinh chế bằng phương pháp tương tự như đã mô tả (Zhao và cộng sự, *Protein Expr Purif.* (Tập chí Tinh chế và Biểu hiện protein) 67(2):182-9, 2009).

Ví dụ 5 – Đặc trưng hóa các kháng thể HFA-PT3 bằng SPR trên phosphopeptit

Tập con các biến thể của kháng thể đơn dòng HFA-PT3, được chọn dựa trên sự đặc trưng hóa lý sinh và sự liên kết với PHF theo ELISA, được phân tích bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) với ProteOn XPR36 để liên kết với các phosphopeptit sau: peptit

tau pT212/pT217 (Peptit-2, SỐ ID TRÌNH TỰ: 48) và peptit tau pT212 (Peptit-8, SỐ ID TRÌNH TỰ: 54). Tất cả thí nghiệm đều được thực hiện ở 25 °C bằng cách sử dụng PBST, pH 7,4, (Bio-Rad Cat# 176-2720) làm dung dịch đệm đang chảy và dung dịch đệm pha loãng mẫu.

Kháng thể đơn dòng/Liên kết peptit. Sau khi đặt điều kiện trước với PBST, bề mặt bộ cảm biến sinh học được chuẩn bị bằng cách bao phủ chip Biorad GLC bằng kháng thể kháng Fc người (Jackson 109-005-098) đến khi đạt mật độ khoảng 6500 RU. Kháng thể kháng IgG người được ghép đôi amin với bề mặt chip bằng cách sử dụng EDC/NHS, sau đó rửa bằng etanolamin. Các kháng thể được pha loãng đến 2 µg/mL trong PBST và được tiêm lên bề mặt trong 5 phút với lượng 30 µL/phút để đạt mật độ 900-1000 RU. Các peptit được tiêm làm chất phân tích với lượng 60 µL/phút trong 3 phút, sau đó là phân ly 5 phút. Peptit-2 được pha loãng trong PBST để tạo loạt nồng độ gấp ba lần (0-30 nM) và được đo theo bộ đôi. Các phép đo đơn về liên kết kháng thể đơn dòng với Peptit-8 được ghi lại qua khoảng nồng độ 0-100 nM.

Liên kết Fab/peptit. Peptit được biotin hóa thu được trên chip bộ cảm biến sinh học NLC được phủ neutravidin được đặt điều kiện trước với PBST, và Fab chảy trên bề mặt để đo thông số động học. Khoảng 5-10 RU peptit thu được trên bề mặt chip bằng cách pha loãng peptit đến 10 ng/mL trong PBST và tiêm vào các kênh dòng chảy với lượng 30 µL/phút trong 100 giây. Dung dịch pha loãng tuần tự của Fab PT3 (1,1 nM đến 90 nM) được tiêm với lượng 60 µL/phút trong 3 phút (pha kết hợp), sau đó là 300 giây chỉ tiêm dung dịch đệm (pha phân ly).

Dữ liệu được tham chiếu kép bằng cách trừ sự đáp ứng liên điểm và đường cong được tạo bằng việc chỉ tiêm dung dịch đệm. Bề mặt chip được tái tạo với axit phosphoric 0,85 %, sau đó tiêm PBST trước khi tiêm chuẩn độ kháng thể tiếp theo. Việc xử lý dữ liệu và phân tích được thực hiện bằng phần mềm thiết bị. Dữ liệu được làm khớp bằng mô hình liên kết Langmuir 1:1 đơn giản.

Hằng số tốc độ động học và ái lực liên kết cân bằng cho IgG HFA-PT3 hướng đến Peptit-8 được trình bày trong Bảng 10. B234 chứa vùng biến đổi PT3 chuột và vùng hằng định IgG1/κ người. Trong các biến thể được nhân hóa, B296 biểu hiện tính liên kết mạnh nhất với Peptit-8 (pT212-tau).

Bảng 10: Dữ liệu ái lực SPR ProteOn cho nhóm mAb HFA-PT3 liên kết với Peptit-8

Mẫu	Mô tả protein	k_a trung bình, (1/Ms)	k_d trung bình, (1/s)	K_D trung bình, nM
B234	PT3 chuột, hIgG1	2,31E+06	8,02E-03	3,48
B235	VH91 / VL77	Không liên kết		
B252	VH93 / VL80	7,42E+05	2,42E-02	32,6
B280	VH91 / VL80	2,18E+05	7,57E-03	34,7 (khớp dữ liệu kém)
B282	VH93 / VL77	4,42E+05	3,82E-02	86,5
B296	VH92 / VL77	8,56E+05	2,30E-02	26,8

n=2 cho tất cả kháng thể

Hằng số tốc độ động học và ái lực liên kết cân bằng cho IgG HFA-PT3 hướng đến Peptit-2 được trình bày trong Bảng 11. B252 và B296 biểu hiện tính liên kết mạnh nhất với Peptit-2 (pT212/pT217-tau), với giá trị K_D trung bình lần lượt là 172 và 190 pM.

Bảng 11: Dữ liệu ái lực SPR ProteOn cho nhóm mAb HFA-PT3 liên kết với Peptit-2

Mẫu	Mô tả protein	k_a trung bình, (1/Ms)	Khoảng k_a	k_d trung bình, (1/s)	Khoảng k_d	K_D trung bình, pM	Khoảng K_D (pM)
B234	PT3 chuột, hIgG1	9,35 E+06	(8,7-10) E+06	3,25 E-04	(2,42-4,08) E-04	29,2	(27,8-30,6)
B235	VH91 / VL77	3,21 E+06	(2,84-3,58) E+06	5,69 E-03	(5,28-6,10) E-03	1790	(1710-1860)
B252	VH93 / VL80	5,75 E+06	(3,95-7,54) E+06	9,01 E-04	(8,56-9,46) E-04	172	(126-217)
B280	VH91 / VL80	4,71 E+06	(2,21-7,20) E+06	2,74 E-03	(2,46-3,01) E-03	769	(418-1120)
B282	VH93 / VL77	3,12 E+06	(2,34-3,89) E+06	1,32 E-03	(1,24-1,40) E-03	445	(360-529)
B296	VH92 / VL77	5,00 E+06	(3,10-6,90) E+06	8,26 E-04	(7,88-8,63) E-04	190	(125-255)

n=2 cho tất cả kháng thể

Ái lực của Fab của B296 và B252 được đo trên peptit tau pT212/pT217 (Peptit-2) bằng ProteOn và được so sánh với Fab mẹ B187 của chuột (Bảng 12). Có sự tăng tốc độ phân ly gấp 2,7-5,1 và tăng giá trị K_D gấp 3,5-5,6 lần cho các Fab HFA so với Fab mẹ ở chuột. Fab của B296 (B324) biểu hiện ái lực mạnh hơn cho peptit tau pT212/pT217 so với Fab của B252 (B326), cũng như tốc độ phân ly chậm hơn.

Bảng 12: Dữ liệu ái lực SPR ProteOn cho Fab HFA-PT3 liên kết với Peptit -2

Mẫu	Mô tả	k_a trung bình (1/Ms)	Khoảng k_a (1/Ms)	k_d trung bình (1/s)	Khoảng k_d (1/s)	K_D trung bình (pM)	Khoảng K_D (pM)
B187	Fab mẹ của PT3 ở chuột	7,76 E+05	(4,91-10,6) E+05	6,39 E-05	(4,93-7,84) E-05	87,4	(73,8-101)
B324	Fab của B296	6,10 E+05	(4,27-7,93) E+05	1,74 E-04	(1,61-1,86) E-04	305	(234-376)
B326	Fab của B252	7,10 E+05	(5,07-9,12) E+05	3,29 E-04	(3,04-3,53) E-04	493	(387-599)

n=2 cho tất cả Fab

Ví dụ 6 – Đặc trưng hóa các kháng thể HFA-PT3 bằng SPR trên PHF-tau và tau tái tổ hợp

Tập con gồm các kháng thể đơn dòng HFA-PT3 được thử nghiệm liên kết với PHF-tau phân lập từ não bị bệnh Alzheimer. Tất cả tương tác được nghiên cứu ở 25 °C sử dụng PBS với pH 7,4, được bổ sung EDTA 3 mM, và Tween 20 0,005 % làm dung dịch đệm đang chảy hoặc hệ chất đệm. HT7 (Pierce, mã danh mục MN1000), kháng thể kháng tau chuột, được sử dụng làm đối chứng dương.

Tương tác giữa các kháng thể đơn dòng kháng tau với PHF-tau được phân tích bằng ProteOn sử dụng bề mặt bộ cảm biến sinh học được chuẩn bị bằng cách bắt - ghép PHF-tau sử dụng HT7 làm thuốc thử bắt. PHF-tau được điều chế bằng cách ly tâm 2 lần với tốc độ 5000xg ở 5 °C trong 10 phút; lớp bề mặt từ lần ly tâm thứ hai được pha loãng với tỷ lệ 1/40 trong dung dịch đệm đang chảy. Để chuẩn bị chip, HT7 được cố định cộng hóa trị với bề mặt của chip cảm biến GLC (ProteOn) theo hướng dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép đôi amin (~5000 đơn vị đáp ứng (RU)). Dung dịch đệm ghép cặp là natri axetat 10 mM, pH 4,5. Sau khi cố định HT7, PHF-tau được tiêm và được bắt (~300 RU) bởi HT7. Sau khi bắt, PHF-tau được cố định cộng hóa trị với chip cảm biến

bằng cách kích hoạt chip theo hướng dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép đôi amin. Các vị trí phản ứng còn lại bị chặn bằng cách tiêm etanolamin. Sau khi chuẩn bị và ổn định bề mặt được điều hòa PHF-tau và bề mặt tham chiếu (không chứa kháng thể), kháng thể kháng tau được pha loãng trong dung dịch đệm đang chảy và được tiêm trong dung dịch (0,12-75 nM trong dung dịch pha loãng gấp 5 lần). Sự kết hợp được theo dõi trong 3 phút (120 μ L được tiêm với lượng 40 μ L/phút). Sự phân ly được theo dõi trong 15 phút. Sự tái tạo bề mặt cảm biến được thực hiện bằng cách sử dụng Gly 10 mM với pH 2,0. Dữ liệu về kháng thể đơn dòng được làm khớp bằng mô hình liên kết lưỡng trị, trong đó ái lực biểu kiến (K_D) được báo cáo là tỷ lệ $k_{\text{phân ly}}/k_{\text{kết hợp}}$. Mô hình liên kết Langmuir 1:1 được sử dụng để phân tích động học Fab.

Hầu hết kháng thể đơn dòng HFA duy trì liên kết chặt chẽ tương tự với kháng thể đơn dòng PT3 mẹ ở chuột, trong khoảng 27-165 pM (Bảng 13). B252 và B296, hai kháng thể đơn dòng HFA đầu tiên, có ái lực lần lượt là 32 và 27 pM. B235 biểu hiện ái lực kháng thể đơn dòng yếu nhất (165 pM) trong nhóm này. B324 (Fab của B296) và B326 (Fab của B252) được đánh giá về tính liên kết PHF-tau và biểu hiện K_D yếu hơn lần lượt là 2,5 và 3,3 lần so với Fab mẹ PT3 chuột B187. B324 biểu hiện ái lực mạnh hơn gấp 1,3 lần (K_D) và tốc độ phân ly chậm hơn 1,7 lần so với B326. Các ái lực Fab yếu hơn kháng thể đơn dòng tương ứng của chúng, cho thấy ái lực cho kháng thể đơn dòng hướng đến PHF-tau. B352, biến thể IgG4 của B296 với vùng biến đổi như nhau, cũng được thử nghiệm liên kết với PHF-tau và ái lực (43 pM) trong khoảng gấp 2 lần ái lực của B296 (Bảng 11).

Bảng 13: Ái lực SPR ProteOn cho các mAb PT3 HFA và các Fab với PHF-tau

Mẫu	Mô tả	$k_{\text{kết hợp}}(1/\text{Ms})$	$k_{\text{phân ly}}(1/\text{s})$	K_D (pM)
HT7	chuột (+ đối chứng)	(5,69 $\pm$ 0,99) E+05	(1,10 $\pm$ 0,18) E-04	193 $\pm$ 46
B17 (mAb)	PT3 chuột, muG2a	(2,48 $\pm$ 0,20) E+06	(2,68 $\pm$ 0,43) E-05	11 $\pm$ 1,9
B234 (mAb)	PT3 chuột, hIgG1	(2,23 $\pm$ 0,13) E+06	(2,71 $\pm$ 0,17) E-05	12 $\pm$ 1,0
B235 (mAb)	VH91 / VL77	(4,90 $\pm$ 0,34) E+05	(8,06 $\pm$ 0,24) E-05	165 $\pm$ 12
B252 (mAb)	VH93 / VL80	(1,32 $\pm$ 0,09) E+06	(4,28 $\pm$ 0,19) E-05	32 $\pm$ 2,6

B280 (mAb)	VH91 / VL80	(1,02±0,03) E+06	(5,63±0,28) E-05	55±3,3
B282 (mAb)	VH93 / VL77	(6,65±0,09) E+05	(4,08±0,25) E-05	61±3,9
B296 (mAb)	VH92 / VL77	(1,07±0,02) E+06	(2,93±0,19) E-05	27±1,8
B297 (mAb)	VH93 / VL78	(1,44±0,07) E+06	(6,03±0,32) E-05	42±3,0
B187 (Fab)	Fab PT3	(1,67±0,05) E+06	(1,13±0,04) E-05	68±3
B326 (Fab)	B252 Fab	(1,02±0,05) E+06	(2,30±0,04) E-04	224±12
B324 (Fab)	B296 Fab	(8,16±0,45) E+05	(1,36±0,06) E-04	167±12
B352 (mAb IgG4)	B296 như hIgG4	(2,55±0,56) E+05	(1,11±0,54) E-05	43±23

mAb: n=2 với 3 mẫu trùng lặp trong mỗi thí nghiệm

Fab: n=2 với 2 mẫu trùng lặp trong mỗi thí nghiệm

B352: n=2 với 4 mẫu trùng lặp trong mỗi thí nghiệm

Sự tương tác giữa kháng thể đơn dòng kháng tau và Fab với tau đối chứng biểu hiện tái tổ hợp (thể đồng dạng tau người 2N4R 441 aa, thẻ 6xHis đầu N, SỐ ID TRÌNH TỰ: 63) được nghiên cứu với Biacore T200. Bề mặt bộ cảm biến được chuẩn bị bằng cách ghép cặp kháng thể (Ab) đặc hiệu Fc kháng IgG người hoặc kháng thể kháng Fd với bề mặt của chip cảm biến CM5 theo hướng dẫn của nhà sản xuất về hóa học ghép đôi amin (~6500 đơn vị đáp ứng (RU)). Dung dịch đệm ghép cặp là natri axetat 10 mM, pH 4,5. Kháng thể kháng tau được pha loãng trong dung dịch đệm đang chảy và được tiêm để bắt ít nhất 5 RU. Sau khi bắt kháng thể đơn dòng kháng tau hoặc Fab, tiêm tau đối chứng biểu hiện tái tổ hợp trong dung dịch (0,12 đến 75 nM trong dung dịch pha loãng gấp 5 lần). Sự kết hợp được theo dõi trong 3 phút (150 μ L được tiêm với lượng 50 μ L/phút). Sự phân ly được giám sát đến khi giảm ít nhất 5 % tín hiệu quan sát được để xác định tốc độ phân ly hợp lý. Việc tái tạo bề mặt cảm biến được thực hiện với axit phosphoric 0,85 %, tiếp theo là NaOH 50 mM. Dữ liệu cho cả hai kháng thể đơn dòng và Fab được làm khớp bằng cách sử dụng mô hình liên kết 1:1 Langmuir nếu quan sát được sự liên kết.

Cả B324 và B326 đều không biểu hiện sự liên kết đáng kể với tau đối chứng. B296 cũng không biểu hiện sự liên kết với tau đối chứng.

Ví dụ 7 – Cấu trúc tinh thể của phức hợp peptit tau pT212/pT217

Đồng cấu trúc của B324 với peptit tau pT212/pT217 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 62) được xác định bằng tinh thể học tia X, dẫn đến việc xác định epitope tau và paratope B324 (và B296).

Điều chế và kết tinh mẫu. B324, đây là Fab của B296 với VH92 và VL77, được tạo bởi sự biểu hiện tạm thời trong các tế bào HEK 293 và được tinh chế bởi sắc ký ái lực Ni, SEC, và sự trao đổi ion trong dung dịch đệm cuối gồm MES 20 mM với pH 6,0, NaCl 0,2 M, peptit tau pT212/pT217 (SỐ ID TRÌNH TỰ: 62), được mô tả trong Ví dụ 3, được sử dụng để đồng kết tinh. Để điều chế phức hợp Fab B324 + peptit tau pT212/pT217, lượng dư mol gấp 10 lần của peptit được bổ sung.

Sự kết tinh Fab B324 + peptit tau pT212/pT217 được thực hiện với 9-18 mg/mL trong MES 20 mM với pH 6,0, NaCl 0,2 M. Việc sàng lọc tinh thể ban đầu được thực hiện với rôbot làm kết tinh Mosquito bằng phương pháp khuếch tán hơi nước giọt ngồi ở 20 °C sử dụng sự sàng lọc tại chỗ và PEG (Qiagen). Các tinh thể xuất hiện từ natri axetat 0,1 M với pH 4,6, PEG 10K 20 % và các mầm được tạo bằng cách đồng thể hóa cơ học với bộ kit Seed Bead (Hampton Research) để dùng trong sàng lọc tối ưu hóa tiếp theo.

Thu thập dữ liệu và xác định cấu trúc. Tinh thể xuất hiện từ natri axetat 0,1 M với pH 5,5, PEG200 37 %, và được thu và làm mát nhanh trong nitơ lỏng mà không có sự bảo vệ cryo để thu thập dữ liệu nhiễu xạ tia X. Dữ liệu tinh thể học được thu thập tại Advanced Photon Source (Nguồn photon năng cao) (Argonne, IL) trên đường chùm IMCA-CAT 17-ID-B tại 100 K. Cường độ nhiễu xạ được thu thập trên thiết bị dò Pilatus 6 M trên phép quay 180° với thời gian phơi nhiễm là 0,5 giây cho mỗi ảnh nửa độ. Dữ liệu được xử lý với XDS (Kabsch, 2010, *Id.*) đến độ phân giải tối đa là 2,6 Å. Cấu trúc tinh thể tia X của B324 trong phức hợp với peptit tau pT212/pT217 được phân giải bằng cách thay thế phân tử bằng Phaser (McCoy và cộng sự 2007, *Id.*) sử dụng cấu trúc Fab liên quan làm mô hình tìm kiếm và được tinh chế với Refmac (Murshudov và cộng sự, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55, 1997) (Bảng 14). Khoảng cách

tiếp xúc liên phân tử được tính với CONTACT (Collaborative Computational Project (Dự án tính toán phối hợp), 1994, *Id.*) sử dụng ngưỡng khoảng cách là 4,0 Å và được kiểm tra trực quan với Pymol.

Bảng 14: Dữ liệu tia X

Thu thập dữ liệu		
Nội dung	B324 + peptit tau pT212/pT217	
Dung dịch mẹ	0,1 M NaAct 5,5, PEG 200 37 %	
Cryo	không	
Nguồn/Thiết bị dò	APS IMCA-CAT 17ID-B/Pilatus 6M	
Bước sóng (Å)	1,000	
Nhiệt độ (K)	100	
Khoảng cách (mm)	450	
Tổng góc quay (°)	180 **	
Exp(sec)/0,5°	0,5	
Nhóm không gian	I222	
Trục ô đơn vị (Å)	97,60, 104,43, 133,35	
Góc ô đơn vị (°)	90, 90, 90	
Phân tử/đơn vị bất đối xứng	1	
V _m (Å ³ /Da)/dung môi (%)	3,43 / 64	
Độ phân giải (Å)	30-2,6	(2,67-2,60)
Số phản xạ đo được	113,798	(6,597)
Số phản xạ duy nhất	21,019	(1,367)
Tính hoàn chỉnh (%)	98,6	(87,6)
Tính dư thừa	5,4	(4,8)
R-hợp nhất	0,040	(0,417)
<I/σ> (dưới trung bình)	10,8	(1,1)
<I/σ> (trung bình)	24,5	(3,5)
Hệ số B (Wilson) (Å ²)	69,4	
Thống kê về sự tinh chế		
Số nguyên tử	3331	

R _{hoạt động} /R _{tự do}	0,230/0,265
R.m.s.d. từ hình học	
lý tưởng	
Độ dài liên kết (Å)	0,005
Góc liên kết (°)	1,027
Hệ số B trung bình (Å ²)	96,2
Biểu đồ Ramachandran	
Các đơn phân trong vùng	
ưu tiên (%)	95,14 %
Các đơn phân trong vùng	
cho phép (%)	3,94 %
Phần tử ngoại lai (%)	0,93 %
Các giá trị trong ngoặc cho vỏ có độ phân giải cao nhất.	

Phân tích cấu trúc. Cấu trúc chung của sự tương tác B324 + peptit tau pT212/pT217 được minh họa trong HÌNH 11. Peptit tau pT212/pT217 khớp với rãnh được tạo ở giao diện của VL và VH B324. Giao diện giữa B324 và peptit tau pT212/pT217 được tạo từ van der Waals và sự tương tác tĩnh điện, kéo dài từ đơn phân peptit 211 đến 221 (HÌNH 12). Các CDR sau đây có trong liên kết trực tiếp với peptit tau pT212/pT217: CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L3. Cấu trúc của B324 trong phức hợp với peptit tau pT212/pT217 cho thấy epitope bao gồm phosphat của pT212 và pT217. Sơ đồ về sự tương tác giữa các đơn phân Fab B324 và các đơn phân peptit tau pT212/pT217 được trình bày trong HÌNH 13. Một số tương tác chính như sau: mỗi nhóm hydroxyl VH Y32 và nhóm hydroxyl VH T28 tạo liên kết hydro với các oxy phosphat khác nhau của pT212; có các tương tác kỵ nước từ các mạch bên của VH Y32 và VH W99 đến các nhóm methyl của L215 của peptit tau; VH K53 tạo tương tác cầu muối với đơn phân peptit tau pT217; mạch bên của VH W104 tạo tương tác kỵ nước với nhóm methyl pT217 và tương tác xếp chồng CH- π với P218 và tạo một phần giao diện VH/VL; indol amit của VH W104 tạo liên kết hydro với hydroxyl mạch bên của T220; có sự tương tác kỵ nước giữa mạch bên của VL Y32 và P219; có sự tương tác kỵ nước giữa VL L96 và nhóm methyl của T220; có sự tương tác kỵ nước được tạo bởi mạch bên VL F94 và nhóm methyl T220. Các tương tác tĩnh điện với phosphat của pT212 và pT217 là rất quan trọng đối với tính chọn lọc của B324 cho phospho-tau, và các tương tác kỵ nước góp thêm vào ái lực cao của B324 cho peptit tau pT212/pT217 (Ví dụ 5) và PHF-tau (Ví dụ 6). Epitope và paratope

của B324 và PT3 chuột rất giống nhau, cho thấy epitope và paratope đều không thay đổi đáng kể sau khi nhân hóa (HÌNH 9 và 13, Bảng 8 và 15).

Bảng 15: Epitope và paratope của B324+peptit tau pT212/pT217. Các đơn phân từ VL hoặc VH B324 tương tác với các đơn phân peptit tau pT212/pT217 được biểu thị. Các tương tác liên kết hydro được biểu thị với kiểu in đậm.

VH	Peptit	VL
G26, T28	R211	
F27, T28 , S31, Y32	pT212	
S31	P213	
S31	S214	
S31 , Y32, K53 , W99	L215	
K53, W99, G100	P216	
S52, K53 , W104	pT217	
G100, W104	P218	
G100, D101	P219	Y32
W104	T220	Y91 , D92, E93, F94, L96
	R221	D92 , E93, F94

Ví dụ 18 – Thử nghiệm chức năng trong xét nghiệm tế bào

PT3 được thử nghiệm về việc ức chế sự gieo mầm tau trong hai loại xét nghiệm tế bào: xét nghiệm đồng nuôi cấy và xét nghiệm làm mất. Cả hai loại xét nghiệm đều sử dụng các tế bào HEK biểu hiện hai mảnh tau K18 được gắn nhãn nhóm mang màu tạo tín hiệu khi ở gần nhau, ví dụ, do sự kết tụ. Khi các tế bào được xử lý bằng các mảnh của tau đầy đủ chiều dài được phosphoryl hóa và kết tụ dẫn xuất từ các nguồn khác nhau, khối kết tụ K18 được cảm ứng có thể được định lượng theo sự thay đổi về tỷ lệ truyền năng lượng cộng hưởng phát quang sinh học (BRET) (tức là xét nghiệm BRET) hoặc bằng cách đếm số tế bào dương truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET) bằng cách phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS) (tức là xét nghiệm FRET; HÌNH 14) (Holmes và cộng sự, 2014, PNAS 111(41):E4376-85).

Xét nghiệm đồng nuôi cấy chất đồng chất tế bào HEK (xét nghiệm BRET)

Chất đồng chất chứa các mầm tau để đồng nuôi cấy được tạo từ dòng tế bào HEK biểu hiện quá mức GFP-tauP301L ổn định chứa tau đầy đủ chiều dài được gắn nhãn GFP được kết tụ cảm ứng K18. Các tế bào nhận là các tế bào HEK biểu hiện ổn định K18/P301L-NanoLuc và K18/P301L-HaloTag. Các mầm tau được đồng nuôi cấy với kháng thể thử nghiệm và các tế bào nhận HEK chứa K18 nhóm mang màu trong 72 giờ. Sự hình thành kết tụ K18 được đo bởi sự thay đổi về tỷ lệ BRET (590 nm/450 nm). Sự cảm ứng kết tụ bị chặn PT3 bởi 46,97 % ở 300 nM, 18,02 % ở 30 nM, và 12,57 % ở 3 nM (HÌNH 15).

Xét nghiệm đồng nuôi cấy tùy sống (xét nghiệm FRET)

Chất đồng chất chứa các mầm tau để đồng nuôi cấy được tạo từ tùy sống từ các con vật biến đổi gen P301S từ 22 đến 23 tuần tuổi chứa tau người biến đổi gen được kết tụ. Để tăng độ nhạy, các tế bào nhận được sử dụng trong xét nghiệm là các tế bào HEK biểu hiện ổn định K18/P301S-YFP và K18/P301S-CFP. Các mầm tau được đồng nuôi cấy với kháng thể thử nghiệm và các tế bào nhận HEK chứa K18 nhóm mang màu trong 72 giờ. Sự hình thành kết tụ K18 được đo bằng cách đếm tế bào dương tính với FRET bằng FACS. Sự cảm ứng kết tụ bị chặn PT3 bởi 34,03 % ở 300 nM, 37,02 % ở 30 nM, và 30,68 % ở 3 nM (HÌNH 16).

Xét nghiệm tế bào loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp (immunodepletion)

Để kiểm tra giá trị ức chế theo phần trăm tối đa có liên quan đến mật độ epitope trên các mầm hoặc có liên quan đến số lượng mầm chứa epitope PT3 hay không, các xét nghiệm loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp (immunodepletion) được thực hiện. Trong các xét nghiệm loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp, các mầm tau được ủ với kháng thể thử nghiệm và bị loại khỏi dung dịch với các hạt protein G. Lớp bề mặt bị làm mất được thử nghiệm về khả năng gieo mầm còn lại trong các tế bào HEK chứa K18 nhóm mang màu và được phân tích bởi FACS như đã mô tả trước đây (Holmes và cộng sự, *Proc Natl Acad Sci U S A*. (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 111(41):E4376-85, 2014).

Chất đồng chất chứa các mầm tau cho sự miễn dịch loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp được tạo từ tùy sống từ các con vật biến đổi gen P301S từ 22 đến 23 tuần tuổi (HÌNH 17) hoặc từ mô não AD người được bảo quản cryo (HÌNH 18). Trong xét nghiệm miễn dịch loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp não AD người, lớp bề mặt sau khi làm mất được thử nghiệm khi có thuốc thử chuyên nhiễm Lipofectamine2000 để thu cửa sổ xét

nghiệm chấp nhận được. Sự gieo mầm tau có thể bị làm mất gần như hoàn toàn (>90 %) với PT3 ở cả hỗn hợp tách chiết tủy sống và tổng chất đồng chất từ não AD người (HÌNH 17 và 18).

Kết quả

PT3 ức chế các mầm tau dẫn xuất từ dịch thủy phân tế bào HEK và dịch thủy phân tủy sống TgP301S. Sự ức chế tối đa đạt được trong các xét nghiệm thay đổi đối với kháng thể kháng phospho-tau và đối với các mầm khác nhau (Bảng 16). Các giá trị ức chế quan sát được cho PT3 ở 300 nM là $46,97 \pm 5,87$ % đối với các mầm tế bào HEK, và $34,03 \pm 2,05$ % đối với hỗn hợp tách chiết tủy sống TgP301S. Các giá trị ức chế tối đa khác nhau cho các kháng thể phospho-tau trong các xét nghiệm tế bào khác nhau có thể chỉ ra sự khác nhau về tình trạng phosphoryl hóa của các mầm tau được sử dụng. Các mầm tau được tạo trong tủy sống TgP301S có nguồn gốc thần kinh và dự kiến có nhiều điểm tương tự với PHF-tau hơn so với các mầm tau từ gốc tế bào HEK, và điều này có thể giải thích về hiệu quả chung cao hơn quan sát được với kháng thể phospho-tau kháng hỗn hợp tách chiết tủy sống so với dịch thủy phân tế bào HEK.

Sự gieo mầm tau có thể bị làm mất gần như hoàn toàn với PT3 trong cả hỗn hợp tách chiết tủy sống và tổng chất đồng chất từ não AD người, và kết quả này cho thấy việc thiếu sự ức chế hoàn toàn trong thí nghiệm đồng nuôi cấy với vật liệu gieo mầm tủy sống không phải do sự có mặt của các mầm không có epitope PT3 mà do mật độ epitope giới hạn trên các mầm.

Bảng 16: Tóm tắt kết quả từ thử nghiệm chức năng trong các xét nghiệm tế bào

MAb	Xét nghiệm BRET/đồng nuôi cấy GFP-tauP301L	Xét nghiệm FRET/đồng nuôi cấy tủy sống P301S	Xét nghiệm FRET/miễn dịch loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp tủy sống P301S	Xét nghiệm FRET/miễn dịch loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp chất đồng chất từ não AD người
PT3	$46,97 \pm 5,87$	$34,03 \pm 2,05$	$96,24 \pm 0,43$	$92,24 \pm 2,30$
AT8	$10,52 \pm 9,48$	$26,4 \pm 1,74$	$96,71 \pm 0,42$	$80,69 \pm 5,79$
HT7	$65,44 \pm 1,08^a$	$73,51 \pm 1,78^b$	$99,16 \pm 0,21$	$82,99 \pm 0,68$

Đơn vị là % đối chứng dương, trung bình các thí nghiệm khác nhau; nồng độ kháng thể trong tất cả xét nghiệm là 300 nM ngoại trừ ^a ức chế ở 166,67 nM và ^b ức chế ở 89,99 nM.

Cơ chế tác dụng cho liệu pháp điều trị bằng kháng thể tau vẫn là vấn đề tranh luận và nhiều cơ chế đã được đề xuất. Sự thanh thải qua trung gian kháng thể của các mầm ngoại bào bằng tế bào thần kinh đệm đã được đề xuất gần đây như một cơ cấu tác dụng có ưu thế hơn (Funk và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 290(35):21652-62, 2015 và McEwan và cộng sự, 2017, PNAS 114:574-9). Trong ngữ cảnh này, sự miễn dịch loại bỏ một phân tử đích ra khỏi hỗn hợp của vật liệu gieo mầm dẫn xuất từ não người có thể được xem là kết quả tế bào dịch mã tốt nhất, và hiệu quả cao của kháng thể mẹ PT3 từ chuột trong loại xét nghiệm tế bào này cho thấy các phiên bản HFA của PT3 sẽ là thuốc điều trị hiệu quả.

Ví dụ 9 – Hiệu quả *trong cơ thể sống* của PT3 chuột trong mô hình tiêm ePHF

Để đánh giá hiệu quả kháng thể tau *trong cơ thể sống*, chuột biểu hiện bệnh lý tau não là hệ thống mô hình thiết yếu (Julien và cộng sự, *Methods Mol Biol.* (Phương pháp sinh học phân tử) 849:473-91, 2012). Một số mô hình này đã được mô tả, và chúng có thể được phân chia trong ba nhóm: 1) chuột biến đổi gen tau biểu hiện quá mức WT hoặc tau đột biến (ví dụ, P301L hoặc P301S) với các đột biến biểu hiện bệnh lý nghiêm trọng sau 5-9 tháng, phụ thuộc vào chủng (Allen và cộng sự, *J Neurosci.* (Tập chí Khoa học thần kinh) 22(21):9340-51, 2002; Scattoni và cộng sự, *Behav Brain Res.* (Nghiên cứu não và hành vi) 208(1):250-7, 2010; Terwel và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 280(5):3963-73, 2005; Yoshiyama và cộng sự, *Neuron.* (Thần kinh) 53(3):337-51, 2007); 2) chuột có biểu hiện tau đột biến được điều hòa không gian thời gian (ví dụ, P301L) (Liu và cộng sự, *Brain Imaging Behav.* (Hình ảnh và ứng xử của não bộ) 6(4):610-20, 2012) hoặc mảnh tiền kết tụ (ví dụ, K18) (Mocanu và cộng sự, *J Neurosci.* (Tập chí Khoa học thần kinh) 28(3):737-48, 2008); và 3) chuột có biểu hiện tau đột biến và ADP biểu hiện bệnh lý tau và mảng (Oddo và cộng sự, *J Neurochem.* (Tập chí Hóa học thần kinh) 102(4):1053-63, 2007).

Khi chuột biểu hiện tau đột biến phát triển bệnh lý mạnh, hoặc việc khởi phát bệnh lý có thể thay đổi giữa các con vật, gây ra sự biến đổi trong các nghiên cứu, và sự đóng góp tương đối của việc lan truyền và kết tụ tau tế bào tự trị cho tín hiệu kết tụ tau tổng thể không rõ ràng. Vì vậy, có thể sử dụng các mô hình để nghiên cứu hiệu quả sự lan truyền và gieo mầm tau (ví dụ, de Calignon và cộng sự, 2012, *Neuron.* (Thần kinh) 73(4):685-97, 2012; Liu và cộng sự, *Id.*) có giá trị cao. Giá trị dịch mã của các mô hình này được tăng thêm bằng cách phát hiện ra rằng việc tiêm cho chuột ALZ17 (chủng biểu

hiện tau người bình thường) chất đồng chất não dẫn xuất từ các bệnh lý do tau khác nhau gây nên sự hình thành thể vùi tau với hình thái giống với bệnh lý do tau trong não người. Ví dụ, việc tiêm cho chuột chất từ các mẫu bệnh hạt nhuộm độc bạc dẫn đến sự kết tủa với đặc tính cấu trúc như dấu phẩy hoặc hình cầu của chính bệnh đó, và bệnh lý tau như AD quan sát được ở chuột được tiêm chất AD (Clavaguera và cộng sự, 2013, PNAS 110(23):9535-40).

Vì vậy, mô hình tiêm cho chuột P301L biến đổi gen đã được thiết lập, trong đó mảnh tiền kết tụ của tau, như sợi K18 (Li và Lee, *Biochemistry*. (Hóa sinh) 45(51):15692-701, 2006) hoặc các mầm PFH-tau dẫn xuất từ não AD người, được tiêm trong các vùng vỏ não hoặc hồi hải mã của mô hình chuột biến đổi gen P301L ở tuổi mà sự kết tụ tế bào tự trị chưa bắt đầu. Mô hình tiêm nhằm mục đích mô phỏng thành phần gieo mầm ngoại bào chủ chốt của sự lan truyền tau. Mầm PHF-tau hoặc K18 được tiêm cảm ứng bệnh lý do tau tại vị trí tiêm và đến mức độ thấp hơn, tại vùng đối bên liên kết (Peeraer và cộng sự, *Neurobiol Dis*. (Bệnh sinh học thần kinh) 73:83-95, 2015). Mô hình để thử nghiệm tiềm năng của kháng thể kháng gieo mầm, như kháng thể kháng tau của sáng chế, khi được tiêm mầm PHF-tau dẫn xuất từ não AD hoặc sợi K18 (Iba và cộng sự, 2015, *J Neurosci*. (Tạp chí Khoa học thần kinh) 33(3):1024-37, 2013; Iba và cộng sự, *Acta Neuropathol*. (Tạp chí bệnh học thần kinh Acta) 130(3):349-62).

Sơ đồ mô hình tiêm chuột P301L biến đổi gen được minh họa trong HÌNH 19. Tóm lại, việc tiêm vào vỏ não phần cắt sarcosyl không tan của não AD sau khi chết đã làm chậm sự tăng kết tụ tau. Trong bán cầu não được tiêm, các tín hiệu thứ nhất được đo 1 tháng sau khi tiêm và tiến triển thêm 3 tháng sau khi tiêm. 5 tháng sau khi tiêm, một số con vật bắt đầu hình thành đám rối do đột biến P301L (Terwel và cộng sự, 2005, *Id.*). Các mức nhuộm AT8 tăng trong khoảng 1 đến 3 tháng (HÌNH 19C-D và 19E-F), vì vậy các thí nghiệm về hiệu quả kháng thể được phân tích 2 tháng sau khi tiêm. Ngoài ra, việc tiêm vào vùng hồi hải mã phần cắt sarcosyl không tan của não AD sau khi chết đã làm tăng sự kết tụ tau tiến triển phụ thuộc liều được đo bằng cách phân tích theo MesoScale Discoveries (MSD) các phần cắt sarcosyl không tan từ bán cầu não bị tiêm (HÌNH 19G).

Điều trị con vật và tiêm vào hộp sọ

Đối với các nghiên cứu về việc tiêm, chuột tau-P301L biến đổi gen, biểu hiện thể đồng dạng tau người dài nhất với đột biến P301L (tau-4R/2N-P301L) (Terwel và cộng sự, 2005, *Id.*) được sử dụng trong phẫu thuật lúc 3 tháng tuổi. Tất cả thí nghiệm được thực hiện để tuân thủ quy trình được ủy ban đạo đức địa phương phê duyệt. Đối với phẫu thuật tiếp xúc, chuột được tiêm một bên (bán cầu não phải) trong vỏ não (AP +2,0, ML +2,0 từ thóp, DV, 2,7 mm từ màng cứng) hoặc vùng hồi hải mã (AP -2,0, ML +2,0 (từ màng cứng), DV 1,8 mm (từ thóp)) 3 μ l (tốc độ 0,25 μ l/phút) với chế phẩm sarcosyl không tan từ mô AD sau khi chết (các sợi xoắn ốc bắt cặp được làm giàu, ePHF) khi có hoặc không có kháng thể đơn dòng. Trong trường hợp tiêm trong màng bụng (IP) với kháng thể hoặc dung dịch muối, việc điều trị (20 mg/kg, 2x/tuần) được bắt đầu 1 tuần trước khi tiêm vào hộp sọ và được tiếp tục đến khi chuột tử vong để giải phẫu (2 tháng sau khi tiêm vào hộp sọ).

Quy trình tách chiết

Mô chuột từ bán cầu não bị tiêm được cân và đồng nhất hóa trong 6 thể tích dung dịch đệm đồng nhất hóa (Tris HCl 10 mM (pH7,6). Chất đồng chất được ly tâm với tốc độ 27 000 x g trong 20 phút, và sau khi nhận phân ước từ lớp bề mặt thu được (tổng chất đồng chất), N-lauroylsarcosyl 1 % được bổ sung. Sau 90 phút (900 vòng/phút, 37 °C), các dung dịch được ly tâm lần nữa với tốc độ 184 000 x g trong 1 giờ. Các lớp bề mặt được giữ làm phần cất sarcosyl không tan, trong khi viên chứa chất sarcosyl không tan được tái huyền phù trong dung dịch đệm đồng nhất hóa.

Phân tích hóa sinh

Kháng thể bao phủ (kháng thể kháng AT8 hoặc kháng thể tổng tau) được pha loãng trong PBS (1 μ g/ml) và được phân chia vào các đĩa MSD (30 μ L cho mỗi lỗ) (L15XA, Mesoscale Discoveries), được ủ qua đêm ở 4 °C. Sau khi rửa với 5 x 200 μ l PBS/Tween-20 0,5 %, các đĩa được phủ casein 0,1 % trong PBS và được rửa lại với 5 x 200 μ l PBS/Tween-20 0,5 %. Sau khi thêm các mẫu và mẫu chuẩn (cả hai đều được pha loãng trong casein 0,1 % trong PBS), các đĩa được ủ qua đêm ở 4 °C. Sau đó, các đĩa được rửa với 5 x 200 μ l PBS/Tween-20 0,5 %, và kháng thể phát hiện được tiếp hợp SULFO-TAG™ trong casein 0,1 % trong PBS được bổ sung và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng khi lắc với tốc độ 600 vòng/phút. Sau khi rửa lần cuối (5 x 200 μ l PBS/Tween-20 0,5 %), 150 μ l 2 X dung dịch đệm T được bổ sung, và các đĩa được đọc với thiết bị tạo ảnh MSD. Các tín hiệu thô được chuẩn hóa so với đường cong tiêu chuẩn gồm 16 dung dịch pha loãng chế phẩm

sarcosyl không tan từ não AD sau khi chết (ePHF) và được biểu hiện là ePHF thuộc đơn vị tùy ý (AU). Phân tích thống kê (ANOVA với hậu kiểm định Bonferroni) được thực hiện với phần mềm GraphPad prism.

Kết quả

Hoạt tính của PT3 chuột theo mô hình tiêm vỏ não (HÌNH 19) được xác nhận trong 4 nghiên cứu độc lập. Chuột được cho liều bên ngoài theo Bảng 17 và các kết quả được trình bày trong HÌNH 20. Việc tiếp tục cải thiện mô hình (HÌNH 19D) cho phép giảm liều ePHF-tau và liều kháng thể được tiêm như đã trình bày trong Bảng 18 với kết quả được minh họa trong HÌNH 21. Khi sử dụng liều ePHF-tau thấp hơn, PT3 cũng được phát hiện là có tác dụng đáng kể trong việc giảm tau kết tụ khi cho sử dụng bằng đường ngoại vi ($P < 0,0001$; HÌNH 21).

Bảng 17: Cho liều bằng đường ngoại vi

Nhóm	Lượng ePHF pmol	Lượng tiêm cùng lúc Ab pmol	IP kháng thể	n
IgG	0,2	5	20 mg/kg (2x/w)	12
PT3	0,2	-	20 mg/kg (2x/w)	13
PT3	0,2	5		5

Bảng 18: Liều tiêm cùng lúc

Nhóm	Lượng ePHF pmol	Lượng tiêm cùng lúc Ab pmol	n
IgG	0,2	5	14
PT3	0,2	5	15
PT3	0,2	0,5	15
PT3	0,2	0,05	15

Việc tiêm cùng lúc lớp kháng thể ePHF và PT3, bao gồm biến thể IgG2a PT3-HFA (chứa các vùng biến đổi VH92 (SỐ ID TRÌNH TỰ:27) và VL77 (SỐ ID TRÌNH TỰ:31) trên các vùng hằng định mIgG2a/kappa) theo bố cục trong HÌNH 19A, đã làm giảm sự kết tụ tau cảm ứng ePHF ở chuột P301L (HÌNH 22). Thực hiện tiêm trong vỏ não. (không phải vùng hồi hải mã). Tác dụng quan sát được trong bán cầu não được tiêm (dữ liệu hóa sinh, HÌNH 22B) và trong bán cầu não chưa được tiêm (nhuộm IHCAT100, HÌNH 22C). Cả hai lớp kháng thể IgG2a và IgG1 đều giảm đáng kể sự

cảm ứng bệnh lý do tau khi được tiêm cùng lúc PHF-tau dẫn xuất từ não AD ($p < 0,0001$). Các kết quả được xác nhận trong IHC trong bán cầu não đối bên.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết, và theo các phương án cụ thể của sáng chế, người có trình độ bình thường trong ngành cũng hiểu rõ là sẽ có thể có các thay đổi và cải biến khác nhau được thực hiện mà không tách rời ý tưởng và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 10 - So sánh tau PSP và tau AD

Liệt trên nhân tiến triển (PSP) là chứng rối loạn thoái hóa thần kinh hiếm và gây tử vong được đặc trưng bởi hội chứng Parkinson, sự mất ổn định tư thế và té ngã, liệt giả hành não và sa sút trí tuệ (Steele và cộng sự, 1964, Archives of Neurology (Lưu trữ về thần kinh học) 10:333-359). Về mặt bệnh lý, có sự tích tụ tau lặp 4 (4R) ưu tiên trong thân não và hạch nền cũng như các vùng khác của não (Dickson DW. Handbook of Clinical Neurology (Cẩm nang thần kinh học lâm sàng) 2008;89:487-491; Williams & Lees, 2009, The Lancet Neurology (Tạp chí y khoa Lancet Neurology) 8:270-279). Trong điều kiện có các bệnh lý học khác như dạng bột, PSP được xem là bệnh lý do tau chính, và dữ liệu mẫu động vật cho thấy tau PSP có thể gặp sự gieo mầm tương tự với sự gieo mầm được cho là xảy ra trong AD (Clavaguera và cộng sự 2013, PNAS 110:9535-9540; Sanders và cộng sự, 2014, Neuron (Thần kinh) 82:1271-1288). Như vậy, PSP có thể được xử lý với kháng thể của sáng chế. Hàng loạt thí nghiệm được thực hiện để đặc trưng hóa các điểm tương tự của tau PSP và tau PHF AD.

Phương pháp

Mô não người: Mô được bảo quản cryo từ hai vùng não tiêu biểu bị ảnh hưởng nặng nề của các bệnh nhân PSP (n=5) được chẩn đoán lâm sàng (nhân đuôi = CAU và nhân vỏ hén = PUT) và vùng não ít bị ảnh hưởng (hồi trán trên = GFS) và các vùng não tương tự cho hai bệnh nhân đối chứng (= không có bệnh lý do tau) thu được từ Netherland Brain Bank (Ngân hàng não Hà Lan). Mô được sử dụng để phân tích với cả xét nghiệm về sự kết tụ và nhuộm hóa mô miễn dịch được mô tả bên dưới. Mô được bảo quản cryo từ 9 bệnh nhân AD rải rác thu được từ trường Đại học Pennsylvania và được sử dụng để phân tích với xét nghiệm về sự kết tụ. Mô được bảo quản cryo từ 1 bệnh nhân AD thu được từ trường Đại học Newcastle và được sử dụng để nhuộm hóa mô miễn dịch.

Đồng nhất hóa mô não: Mô được bảo quản cryo được đồng nhất trong Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, đầu lọc: 0,22 μ m + chất ức chế proteaza không chứa EDTA mini hoàn chỉnh (Roche, cat# 11 836 170 001) với thiết bị đồng nhất hóa dounce ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 10 chu kỳ để đạt chất đồng nhất 10 % khối lượng/thể tích. Chất đồng nhất được ly tâm với tốc độ 27,000xg, trong 10 phút ở 4 °C và lớp bề mặt được lưu trữ trong các phân ước ở -80 °C đến khi sử dụng.

Xét nghiệm về sự kết tụ: Xét nghiệm miễn dịch MSD tăng kẹp đặc hiệu kết tụ được thực hiện, trong đó kháng thể phospho-tau AT8 và PT3 được sử dụng làm kháng thể bắt và kháng thể phát hiện. Kháng thể bao phủ được pha loãng trong PBS (1 μ g/ml) và được phân chia vào các đĩa MSD (30 μ L cho mỗi lỗ) (L15XA, Mesoscale Discoveries) được ủ ở 4 °C. Sau khi rửa với 5 x 200 μ L PBS/Tween-20 0,5 %, các đĩa được phủ casein 0,1 % trong PBS và được rửa lại với 5 x 200 μ L PBS/Tween-20 0,5 %. Sau khi thêm các mẫu và mẫu chuẩn (cả hai đều được pha loãng trong casein 0,1 % trong PBS), các đĩa được ủ ở 4 °C. Sau đó, các đĩa được rửa với 5 x 200 μ L PBS/Tween-20 0,5 % và kháng thể phát hiện được tiếp hợp SULFO-TAGTM trong casein 0,1 % trong PBS được bổ sung và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng khi lắc với tốc độ 600 vòng/phút. Sau khi rửa lần cuối (5 x 200 μ L PBS/Tween-20 0,5 %), 150 μ L 2 X dung dịch đệm T được bổ sung và các đĩa được đọc với thiết bị tạo ảnh MSD. Các tín hiệu thô được chuẩn hóa so với đường cong tiêu chuẩn gồm 7 dung dịch pha loãng của một tổng chất đồng nhất từ não AD và được biểu hiện như giá trị nội suy dưới dạng phần trăm theo tiêu chuẩn này.

Hóa mô miễn dịch: Mô não người được bảo quản cryo được cắt lát với máy ổn nhiệt cryo (độ dày 20 μ m) và được lưu trữ ở -80 °C trước khi sử dụng. Các phần được làm khô, sau đó là cố định bằng formalin, ức chế peroxydaza nội sinh bằng hydro peroxit 3 % (DAKO, Glostrup, Denmark, S2023) và thẩm thấu trong PBS1x + Triton X-100 0,3 % trong 1 giờ. Các kháng thể sơ cấp (PT3 0,4 μ g/ml; AT8 0,4 μ g/ml) được pha loãng trong chất pha loãng kháng thể với các thành phần giảm nền (DAKO, S3022) và được dùng cho các phần trong 1 giờ. Sau khi rửa thêm, các tiêu bản được ủ với kháng thể kháng kháng thể thứ cấp chuột tiếp hợp HRP (Envision, DAKO, K4000), sau đó gắn nhãn DAB sinh màu (DAKO, K4368). Các tiêu bản được nhuộm tương phản với hematoxylin, được khử nước và được gắn môi trường gắn hữu cơ (Vectamount, Vector labs, Burlingame, CA, USA, H-5000). Việc tạo ảnh được thực

hiện với Hamamatsu NanoZoomer 2.0 rs (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Nhật Bản).

Kết quả

Xét nghiệm về sự kết tụ: Xét nghiệm về sự kết tụ được tiến hành để đặc trưng hóa mức độ phosphoryl hóa tau PSP. Các khối kết tụ phản ứng PT3 xuất hiện trong não PSP, mặc dù các mức kết tụ thấp hơn trong não AD (HÌNH 23). Các kết quả thu được với kháng thể tham chiếu AT8 tương tự với kết quả quan sát được với PT3. Các kết quả này cho thấy tất cả vị trí phosphoryl hóa được đánh giá bằng cách sử dụng các kháng thể phospho-tau khác nhau hiện diện trên tau PSP mặc dù có ít khối kết tụ tau hơn trong PSP so với AD.

Hóa mô miễn dịch: Việc nhuộm với kháng thể PT3 trên phần đông lạnh từ não AD hoặc PSP cho thấy được nhuộm trong các vùng giải phẫu (tức là nhân đuôi và nhân vỏ hén) bị ảnh hưởng trong PSP (HÌNH 24). Dấu hiệu bệnh lý học thần kinh của PSP, bao gồm các tế bào thần kinh tau+ và tế bào hình sao kết chùm, được phát hiện bởi kháng thể phospho-tau PT3. Các kết quả thu được với AT8 tương tự với kết quả quan sát được với PT3.

Kết luận

Dữ liệu có sẵn cho thấy PT3 liên kết với tau của PSP.

Ví dụ 11 - Sự trưởng thành ái lực của PT3-HFA

Sự đặc trưng hóa liên kết SPR của các kháng thể trưởng thành ái lực với PHF-tau.

Các kháng thể đơn dòng trưởng thành ái lực được thử nghiệm liên kết với PHF-tau phân lập từ não bị bệnh Alzheimer. Động học liên kết và các nghiên cứu ái lực được thực hiện bằng hệ thống ProteOn XPR36 (Bio Rad, Hercules, CA) ở 25 °C với PBS có pH 7,4, được bổ sung EDTA 3 mM, và Tween 20 0,005 % làm dung dịch đệm đang chảy hoặc hệ chất đệm.

Chip cảm biến GLC được cố định cộng hóa trị với kháng thể kháng tau chuột, HT7 (ThermoFisher, mã danh mục MN1000) sử dụng quy trình theo đề xuất của nhà cung cấp về hóa học ghép đôi amin (~5000 đơn vị đáp ứng (RU)). Dung dịch đệm ghép cặp là natri axetat 10 mM, pH 4,5. PHF-tau được điều chế bằng cách ly tâm 2 lần với tốc độ 5000xg ở 5 °C trong 10 phút. Lớp bề mặt từ lần ly tâm thứ hai được pha loãng trong dung dịch đệm đang chảy (1/125) và được bắt - ghép cặp với bề mặt cố định HT7 (~300 RU). Sau khi bắt - ghép cặp, bề mặt được hoạt hóa và bất hoạt để tạo bề mặt PHF-tau đồng nhất cho các nghiên cứu liên kết kháng thể. Các kháng thể kháng tau và các

Fab của chúng (được điều chế trong dung dịch đệm đang chảy, 0,024-75 nM trong dung dịch pha loãng gấp 5 lần) được tiêm với lượng 50 μ L/phút trên bề mặt PHF-tau để đo sự liên kết. Các mức kết hợp và phân ly được giám sát lần lượt trong 4 phút và 2 giờ. Sau khi phân ly, chip cảm biến được tái tạo bằng cách tiêm nhiều lần Glyxin 10 mM với pH 2.0 và dung dịch đệm đang chảy. Bề mặt tham chiếu (không có PHF-tau) được dùng để giám sát liên kết không đặc hiệu của các mAb hoặc Fab được tiêm. Kháng thể HT7 được sử dụng làm đối chứng dương. Sensorgram (đồ thị về các đáp ứng theo thời gian trong nghiên cứu cộng hưởng plasmon bề mặt) liên kết cho các mAb được làm khớp bằng mô hình liên kết lưỡng trị, trong đó ái lực biểu kiến hoặc liên kết do ái lực (K_D) được báo cáo là tỷ lệ giữa tốc độ phân ly và tốc độ kết hợp (k_{off}/k_{on}). Mô hình liên kết 1:1 Langmuir được sử dụng để phân tích động học Fab.

Kháng thể mẹ từ người (B296) biểu hiện liên kết chặt chẽ với PHF-tau ($K_D = 6,2$ pM) và bị chi phối bởi tốc độ phân ly quá chậm, trong đó quan sát được không quá 5 % sự phân ly của mAb trong 2 giờ (Bảng 19, HÌNH 25). Kháng thể trưởng thành ái lực biểu hiện sự cải thiện về liên kết với PHF-tau với các ái lực trong khoảng 1,8 - 2,5 pM. B711 và B809 biểu hiện sự cải thiện gấp 3 lần về tốc độ liên kết so với kháng thể mẹ, tuy nhiên, hầu như không thể phân biệt tốc độ phân ly giữa các kháng thể (HÌNH 25). Các Fab tổng thể biểu hiện mức liên kết với PHF-tau yếu hơn so với mAb tương ứng của chúng, cho thấy sự liên kết do ái lực của mAb với PHF-tau. B324 (Fab của mAb mẹ, B296), liên kết với PHF-tau với ái lực nội sinh là 63,2 pM. Các Fab của mAb trưởng thành ái lực biểu hiện sự cải thiện tương tự về ái lực với các giá trị trong khoảng 15,6 - 31 pM. Hai Fab, B330 (Fab của B711) và B332 (Fab của 809), còn biểu hiện sự cải thiện gấp 3-4 lần về tốc độ kết hợp tương tự với các mAb tương ứng của chúng.

Bảng 19: Ái lực và động học liên kết SPR ProteOn cho các mAb trưởng thành ái lực và các Fab của chúng với PHF-tau

Mẫu	Mô tả	$k_{\text{kết hợp}} (\times 10^6 \text{ 1/Ms})$	$k_{\text{phân ly}} (\times 10^{-5} \text{ 1/s})$	K_D (pM)
B296 (mAb)	mAb mẹ được nhân hóa	$1,89 \pm 0,09$	$1,17 \pm 0,09$	$6,2 \pm 0,5$
B711 (mAb)	B296 trưởng thành ái lực	6,17 (5,72 - 6,61)	1,13 (1,08 - 1,17)	1,8 (1,6 - 2,1)
B809 (mAb)	B296 trưởng thành ái lực	$6,45 \pm 1,18$	$1,27 \pm 0,15$	$2,0 \pm 0,5$
B333 (mAb)	B296 trưởng thành ái lực	$2,68 \pm 0,23$	$0,68 \pm 0,08$	$2,5 \pm 0,4$
B324 (Fab)	Fab của B296	$1,43 \pm 0,06$	$9,03 \pm 0,08$	$63,2 \pm 2,8$
B330 (Fab)	Fab của B711	4,60 (4,53 - 4,66)	7,15 (6,94 - 7,36)	15,6 (15,3 - 15,8)

B332 (Fab)	Fab của B809	$4,64 \pm 0,29$	$12,0 \pm 0,12$	$25,8 \pm 1,7$
B331 (Fab)	Fab của B333	$1,72 \pm 0,07$	$5,31 \pm 0,10$	$31,0 \pm 1,5$

N = 2-3 mẫu trùng lặp trong một thí nghiệm. Các giá trị được báo cáo là $\pm$ SD trung bình (hoặc khoảng)

Liên kết với phosphopeptit bằng ELISA

Liên kết với phospho-peptit tau được phân tích bằng ELISA, trong đó peptit (10 ng/mL) được phủ trực tiếp lên đĩa qua đêm. Sau khi rửa đĩa và phủ casein 0,1 % trong PBS, các đĩa được ủ với các nồng độ khác nhau của HFA-PT3 (B296) và các biến thể trưởng thành ái lực của mAb HFA-PT3 (B809, B333 và B711) (HÌNH 26A). Sau khi ủ với kháng thể, các đĩa được rửa và 50 μ L cho mỗi lỗ chứa kháng thể kháng Fab được gắn nhãn HRPO (Jackson ImmunoResearch laboratories) (pha loãng với tỷ lệ 1:10000 trong dung dịch đệm ức chế). Sau bước rửa khác, thực hiện việc phát hiện với TMB (Thermo Scientific) “Một bước” theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đĩa được phân tích trong thiết bị đọc EnVision® 2102 Multilabel Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Các đường cong liên kết được tạo bằng phần mềm GraphPad Prism7.0. Từ đường cong liên kết trong HÌNH 26A, có thể thấy rằng B296 biểu hiện ái lực thấp nhất trong khi B711 biểu hiện liên kết hiệu lực nhất khi so sánh với B296, B333 và B809. Điều này cho thấy B711 là kháng thể PT3 nhân hóa với ái lực mạnh nhất cho peptit pT217. Thí nghiệm tương tự với Fab (HÌNH 26B) cho thấy M333 (Fab của B711) có liên kết peptit tương tự khi so sánh với B187, Fab của phân tử PT3 mẹ. Một lần nữa, M324 (Fab của B296, HFA-PT3) biểu hiện liên kết yếu hơn so với Fab mẹ và các biến thể trưởng thành ái lực của PT3-HFA.

Bảng 20: Tóm tắt kết quả từ liên kết pT217 với ELISA

	EC ₅₀ (pM)	
Fab	Trung bình	SD
B187	109,82	73,70037
M324	340,8333	121,6609
M330	106,5133	62,22259
Kháng thể đơn dòng	Trung bình	SD
B296	433,425	139,2647

B809	91,6675	59,01867
B333	164,345	92,99161
B711	70,745	48,86815

N = 2 mẫu trùng lặp trong ít nhất 2 thí nghiệm. Các giá trị được báo cáo là $\pm$ SD trung bình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abhinandan và Martin, *Mol Immunol.* (Miễn dịch học phân tử) 45:3832-9, 2008
- Adams và cộng sự, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):213-21, 2010
- Allen và cộng sự, *J Neurosci.* (Tập chí Khoa học thần kinh) 22(21):9340-51, 2002
- Almagro, *Mol Recognit.* (Tập chí nhận diện phân tử) 17:132-43, 2004
- Asuni và cộng sự, *J Neurochem.* (Tập chí Khoa học thần kinh) 27:9115-29, 2007
- Boutajangout và cộng sự, *J Neurochem.* (Tập chí Hóa học thần kinh) 118:658-67, 2011
- Boutajangout và cộng sự, *J Neurochem.* (Tập chí Khoa học thần kinh) 30:16559-66, 2010
- Brunden và cộng sự, *Nat Rev Drug Discov.* (Tập chí Khám phá thuốc Nature) 8:783-93, 2009
- Butner và Kirschner, *J Cell Biol.* (Tập chí Sinh học tế bào) 115(3):717-30, 1991
- Chai và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 286:34457-67, 2011
- Chothia và Lesk, *J Mol Biol.* (Tập chí sinh học phân tử) 196:901-17, 1987
- Clavaguera và cộng sự, *Nat Cell Biol.* (Sinh học tế bào Nature). 11:909-13, 2009
- Clavaguera và cộng sự, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 110(23):9535-40, 2013
- Clavaguera và cộng sự, *Proc Natl Acad Sci USA.* (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 110(23):9535-40, 2013
- Collaborative Computational Project (Dự án tính toán phối hợp), Số 4, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50(Pt 5):760-3, 1994
- Collin và cộng sự, *Brain.* (Não) 137(Pt 10):2834-46, 2014
- de Calignon và cộng sự, *Neuron.* (Thần kinh) 73(4):685-97, 2012
- Adams và cộng sự, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1):2126-32, 2004

- Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (Giao thức ánh xạ epitope trong các phương pháp trong sinh học phân tử), Tập 66, G. E. Morris, Ed. (1996)
- Fishwild và cộng sự, *Nat Biotechnol.* (Công nghệ sinh học tự nhiên) 14:845-51, 1996
- Fransson và cộng sự, *J Mol Biol.* (Tập chí sinh học phân tử) 398(2):214-31, 2010
- Frost và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 284:12845-52, 2009
- Funk và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 290(35):21652-62, 2015
- Goedert và cộng sự, *Biochemical J.* (Tập chí Sinh hóa học) 301(Pt3):871-877
- Hanger và cộng sự, *Trends Mol Med.* (Xu hướng trong Dược phân tử) 15:112-9, 2009
- Hoffmann và cộng sự, *Biochemistry.* (Hóa sinh) 36(26):8114-24, 1997
- Holmes và cộng sự, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 111(41):E4376-85, 2014
- Iba và cộng sự, *Acta Neuropathol.* (Tập chí bệnh học thần kinh Acta) 130(3):349-62, 2015
- Iba và cộng sự, *J Neurosci.* (Tập chí Khoa học thần kinh) 33(3):1024-37, 2013
- Julien và cộng sự, *Methods Mol Biol.* (Phương pháp sinh học phân tử) 849:473-91, 2012
- Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66(Pt 2):125-32, 2010
- Knappik và cộng sự, *J Mol Biol.* (Tập chí sinh học phân tử) 296:57-86, 2000
- Knight và cộng sự, *Platelets.* (Tiểu cầu) 15:409-18, 2004
- Kohler và Milstein, *Nature.* 256:495-7, 1975
- Krebs và cộng sự, *J Immunol Methods.* (Tập chí Phương pháp miễn dịch học) 254:67-84, 2001
- Lee và cộng sự, *Cell Rep.* (Báo cáo tế bào) 16(6):1690-700, 2016
- Lefranc và cộng sự, *Dev Comp Immunol.* (Tập chí Miễn dịch học so sánh và thực nghiệm) 27:55-77, 2003
- Leong và cộng sự, *Cytokine.* 16:106-19, 2001
- Li và Lee, *Biochemistry.* (Hóa sinh) 45(51):15692-701, 2006
- Liu và cộng sự, *Brain Imaging Behav.* (Hình ảnh và ứng xử của não bộ) 6(4):610-20, 2012
- Lonberg và cộng sự, *Nature.* 368:856-9, 1994

- Malia và cộng sự, *Proteins*. 84:427-434, 2016
- Martin và Thornton, *J Mol Biol.* (Tập chí sinh học phân tử) 263(5):800-15, 1996
- Matsuo và cộng sự, *Neuron*. (Thần kinh) 13(4):989-1002, 1994
- McCoy và cộng sự, *J Appl Crystallogr.* (Tập chí tinh thể học ứng dụng) 40(Pt 4):658-674, 2007
- McEwan và cộng sự, 2017, PNAS 114(3):574-9
- Mendez và cộng sự, *Nat Genet.* (Di truyền học tự nhiên) 15:146-56, 1997
- Mercken và cộng sự, *Acta Neuropathol.* (Tập chí bệnh học thần kinh Acta) 84(3):265-72, 1992
- Mercken, Giáo Sư Thesis: Đại học Antwerp, Wilrijk-Antwerp, 1991
- Mocanu và cộng sự, *J Neurosci.* (Tập chí Khoa học thần kinh) 28(3):737-48, 2008
- Morris và cộng sự, *Nat Neurosci.* Khoa học thần kinh tự nhiên) 18(8):1183-9, 2015
- Morris và cộng sự, *Neuron (Thần kinh)* 70:410-26, 2011
- Murshudov và cộng sự, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 53(Pt 3):240-55, 1997
- Oddo và cộng sự, *J Neurochem.* (Tập chí Hóa học thần kinh) 102(4):1053-63, 2007
- Otvos và cộng sự, *J Neurosci Res.* (Tập chí nghiên cứu khoa học thần kinh) 39(6):669-73, 1994
- Padlan và cộng sự, *Mol. Immunol.* (Miễn dịch học phân tử) 28:489-98, 1991
- Peeraer và cộng sự, *Neurobiol Dis.* (Bệnh sinh học thần kinh) 73:83-95, 2015
- Queen và cộng sự, *Proc Natl Acad Sci USA.* (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 86:10029-33, 1989
- Scattoni và cộng sự, *Behav Brain Res.* (Nghiên cứu não và hành vi) 208(1):250-7, 2010
- Schroeder và cộng sự, *J Neuroimmune Pharmacol.* (Tập chí Khoa dược lý Hệ miễn dịch thần kinh) 11(1):9-25, 2016
- Seubert và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 270(32):18917-22, 1995
- Shi và cộng sự, *J Mol Biol.* (Tập chí sinh học phân tử) 397:385-96, 2010

- Strohl, *Curr Opin Biotechnol.* (Quan điểm hiện nay về công nghệ sinh học) 20:685-91, 2009
- Terwel và cộng sự, *J Biol Chem.* (Tập chí Sinh hóa học) 280(5):3963-73, 2005
- Wischnik và cộng sự, *Proc Natl Acad Sci USA.* (Kỷ yếu Viện Hàn lâm Khoa học Quốc gia Hoa Kỳ) 85:4884-8, 1988
- Wu và Kabat, *J Exp Med.* (Tập chí Y học thực nghiệm) 132:211-50, 1970
- Yang và cộng sự, *Protein Eng.* (Kiến tạo protein) 16:761-70, 2003
- Yoshiyama và cộng sự, *Neuron.* (Thần kinh) 53(3):337-51, 2007
- Zhao và cộng sự, *Protein Expr Purif.* (Tập chí Tinh chế và Biểu hiện protein) 67(2):182-9, 2009

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó mà liên kết với PHF-tau bao gồm:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 7,

b) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 8,

c) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 9,

d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 19,

e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 20, và

f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 21.

2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm 1 bao gồm:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 7,

b) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 8,

c) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 9,

d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 19,

e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 20,

và

f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 21.

3. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 2 bao gồm vùng hằng định IgG1 của chuỗi nặng từ người và vùng hằng định kappa của chuỗi nhẹ từ người.

4. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 2.

5. Vector bao gồm axit nucleic được phân lập theo điểm 4.
6. Tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo điểm 5.
7. Dược phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 2 và chất mang dược dụng.
8. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 2 bao gồm nuôi cấy tế bào bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên dưới các điều kiện để sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, và thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào.
9. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó mà liên kết với PHF-tau bao gồm:
 - a) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 80,
 - b) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 81,
 - c) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 9,
 - d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 70,
 - e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 20, và
 - f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 21.
10. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm 9 bao gồm:
 - a) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 80,
 - b) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 81,
 - c) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 9,

d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 70,
 e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 20,
 và

f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 21.

11. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó mà liên kết với PHF-tau bao gồm:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 71,

b) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 72,

c) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 73,

d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 70,

e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 20, và

f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 bao gồm trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 21.

12. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó theo điểm 11 bao gồm:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 71,

b) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 72,

c) vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 73,

d) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 70,

e) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 20, và

f) vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin có SỐ ID TRÌNH TỰ 21.

13. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit gồm các axit amin 1-188 của SỐ ID TRÌNH TỰ 74, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit gồm các axit amin 1-107 của SỐ ID TRÌNH TỰ 75.

14. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit gồm các axit amin 1-118 của SỐ ID TRÌNH TỰ 76, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit gồm các axit amin 1-107 của SỐ ID TRÌNH TỰ 77.

15. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên của nó bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ 27, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự polypeptit có SỐ ID TRÌNH TỰ 31.

16. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 15.

17. Vector bao gồm axit nucleic được phân lập theo điểm 16.

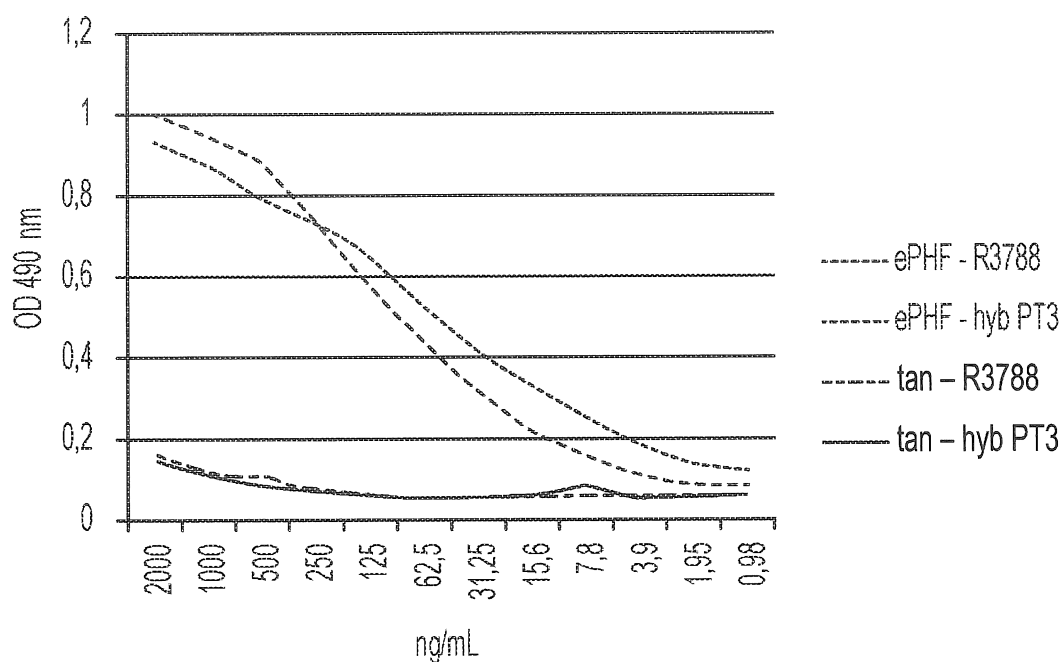
18. Tế bào chủ bao gồm axit nucleic theo điểm 17.

19. Dược phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 15 và chất mang dược dụng.

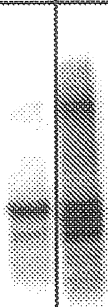
20. Phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng hoặc mảnh gắn kháng nguyên theo điểm 15 bao gồm nuôi cấy tế bào bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên dưới các điều kiện để sản xuất kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên, và thu hồi kháng thể hoặc mảnh gắn kháng nguyên từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào.

HÌNH 1

**So sánh PT3 tái tổ hợp với PT3 được
dẫn xuất từ tế bào lai, được tinh chế:
sự liên kết giữa ePHF và Tau tan**

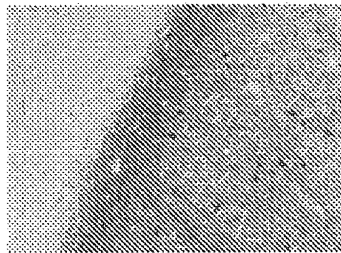


HÌNH 2

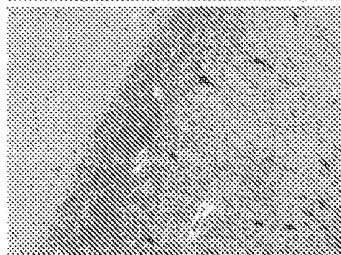
AT8		AT100		HT7		BT2		PT3	
NT	PT	NT	PT	NT	PT	NT	PT	NT	PT
									

HÌNH 3

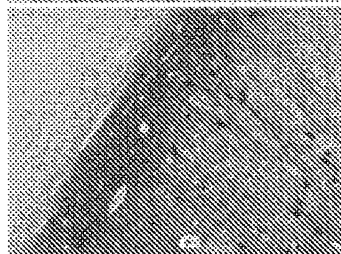
HÌNH 3A



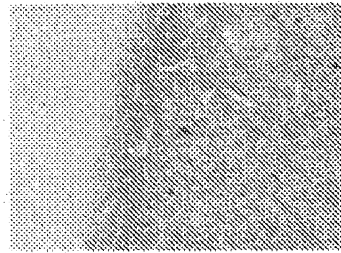
HÌNH 3B



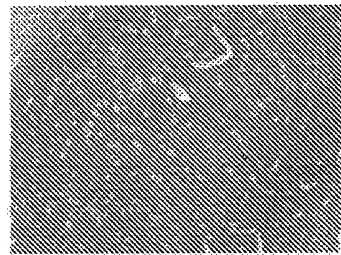
HÌNH 3C



HÌNH 3D

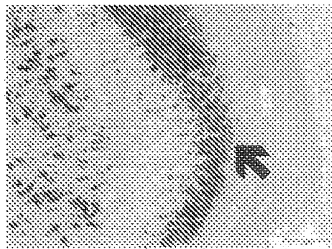


HÌNH 3E

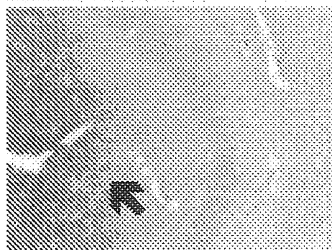


HÌNH 4

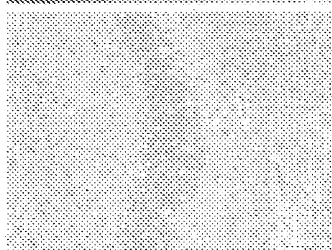
HÌNH 4A



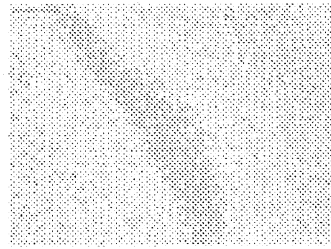
HÌNH 4B



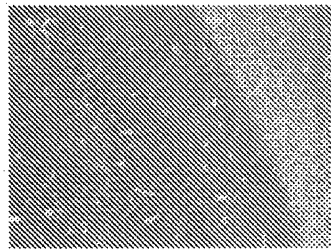
HÌNH 4C



HÌNH 4D

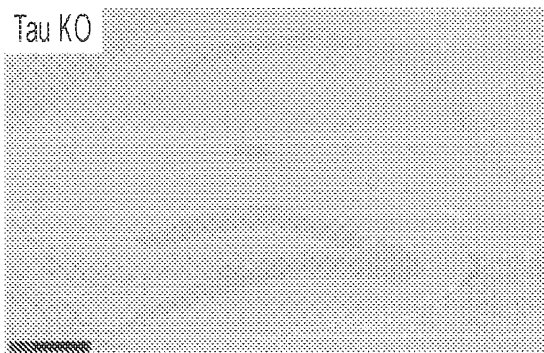


HÌNH 4E



HÌNH 5

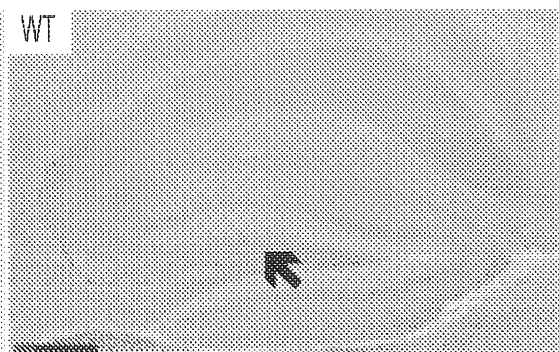
HÌNH 5A



HÌNH 5B

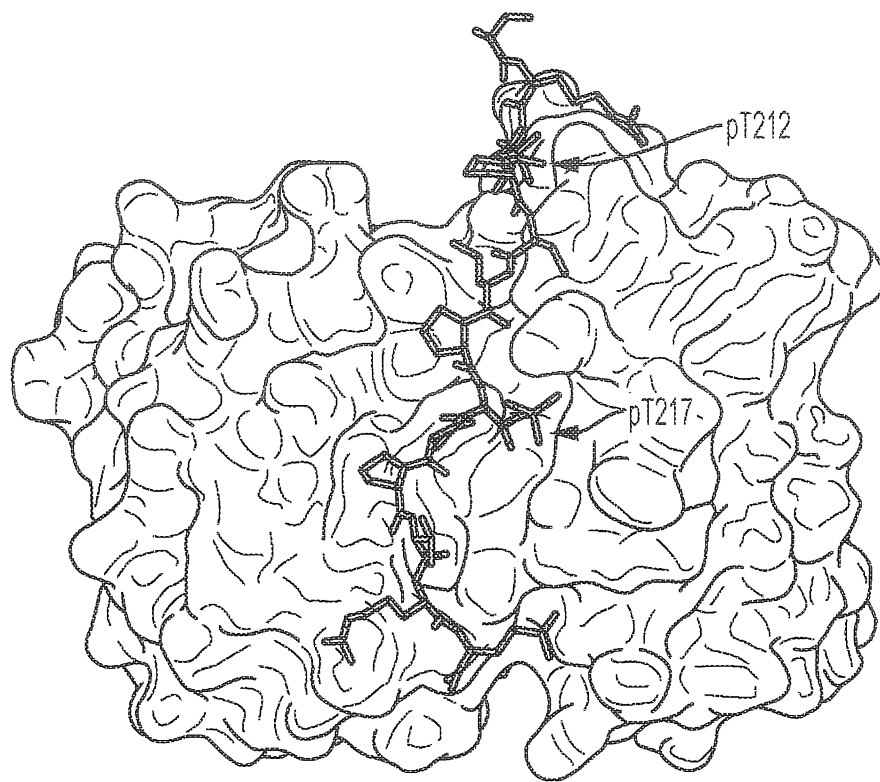


6/27

HÌNH 6**HÌNH 6A****HÌNH 6B**

7/27

HÌNH 7



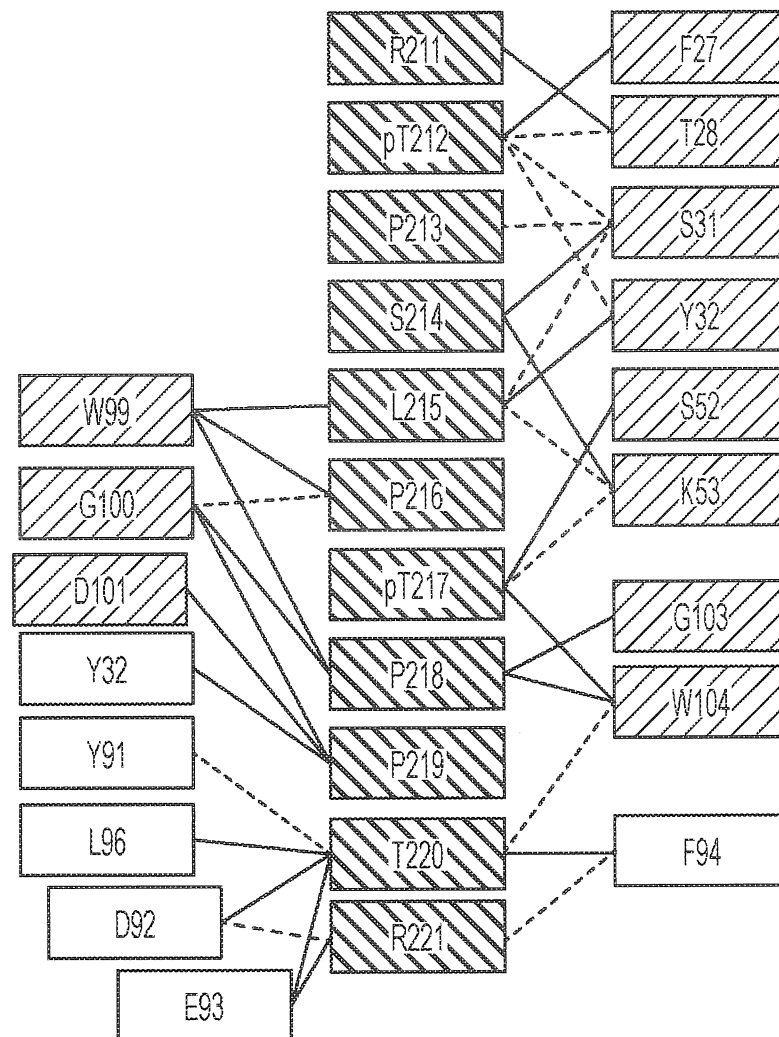
8/27

HÌNH 8



9/27

HÌNH 9



HÌNH 10

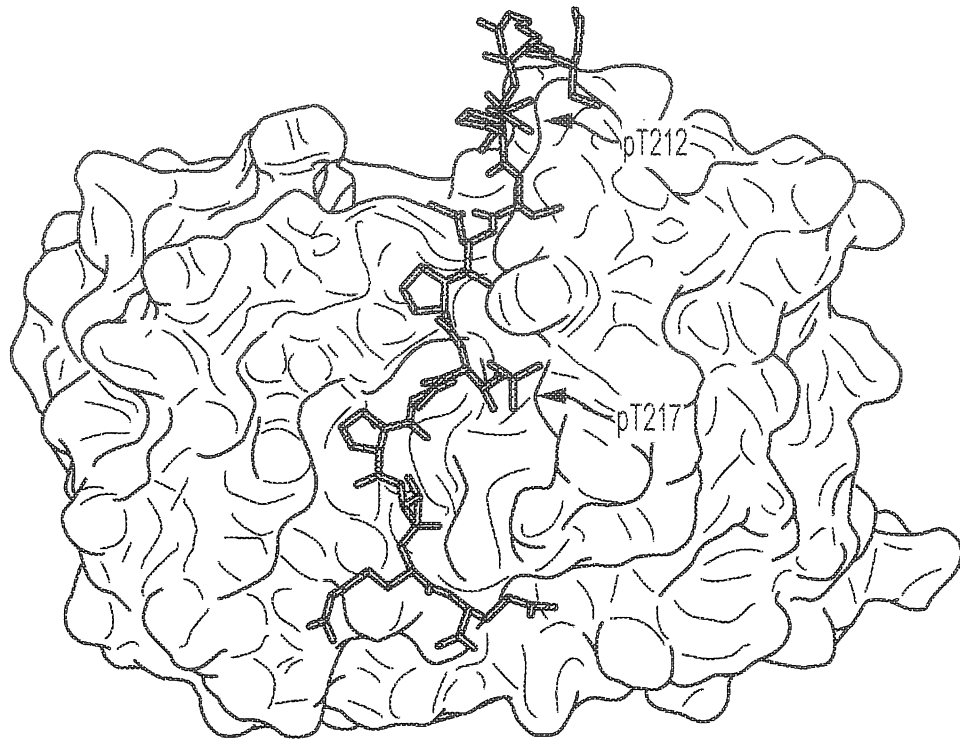
VH	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110																																																																																																			
	.		.		.		.		.		.																																																																																																			
VH10	EVKL	VE	SG	DL	VK	PG	SL	KL	SC	AA	SG	ET	F	SS	Y	A	M	S	W	R	Q	N	P	E	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	K	G	N	T	Y	P	N	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	R	N	I	L	Y	L	Q	M	S	S	I	R	S	E	D	T	A	L	Y	C	A	R	G	W	G	D	Y	G	N	F	A	Y	W	G	O	V	T	L	V	T	V	S	A													
VH91	EVQ	L	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	R	Q	N	P	E	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	K	G	N	T	Y	P	N	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	I	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	W	G	D	Y	G	N	F	A	Y	W	G	O	V	T	L	V	T	V	S		
VH92	Q	V	L	V	E	S	G	G	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	R	Q	N	P	E	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	K	G	N	T	Y	P	N	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	I	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	W	G	D	Y	G	N	F	A	Y	W	G	O	V	T	L	V	T	V	S	
VH93	Q	V	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	R	Q	N	P	E	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	K	G	N	T	Y	P	N	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	I	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	W	G	D	Y	G	N	F	A	Y	W	G	O	V	T	L	V	T	V	S
VH94	Q	V	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	C	A	S	V	K	V	S	C	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	R	Q	N	P	E	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	K	G	N	T	Y	P	N	S	V	K	G	R	F	T	I	T	R	D	T	S	A	T	A	M	E	L	S	S	I	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G	W	G	D	Y	G	N	F	A	Y	W	G	O	V	T	L	V	T	V	S	

VL

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																																																																																											
	.		.		.		.		.																																																																																												
VL7	DI	K	M	T	Q	S	P	S	S	M	Y	A	S	L	G	E	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	R	Y	L	N	W	F	Q	K	P	G	K	S	P	K	T	L	I	Y	R	A	N	R	L	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	Q	D	Y	S	L	T	I	S	S	L	D	Y	E	D	M	G	I	Y	C	L	O	Y	D	E	F	F	P	L	F	E	G	D	G	T	K	L	E	K
VL77	DI	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	R	Y	L	N	W	F	Q	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y	R	A	N	R	L	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	C	L	O	Y	D	E	F	F	P	L	F	E	G	Q	T	K	L	E	K	
VL78	DI	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	R	Y	L	N	W	F	Q	K	P	G	K	A	P	K	S	L	I	Y	R	A	N	R	L	I	S	C	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	C	L	O	Y	D	E	F	F	P	L	F	E	G	Q	T	K	L	E	K
VL79	DI	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	I	N	R	Y	L	N	W	F	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	I	Y	R	A	N	R	L	D	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	C	L	O	Y	D	E	F	F	P	L	F	E	G	Q	T	K	L	E	K		
VL80	DI	V	M	T	Q	T	P	L	S	S	I	T	G	P	A	S	I	C	K	A	S	Q	D	I	N	R	Y	L	N	W	L	Q	R	P	G	G	P	P	R	L	I	Y	R	A	N	R	L	D	G	V	P	D	R	F	S	G	S	A	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	I	C	L	O	Y	D	E	F	F	P	L	F	E	G	Q	T	K	L	E	K					

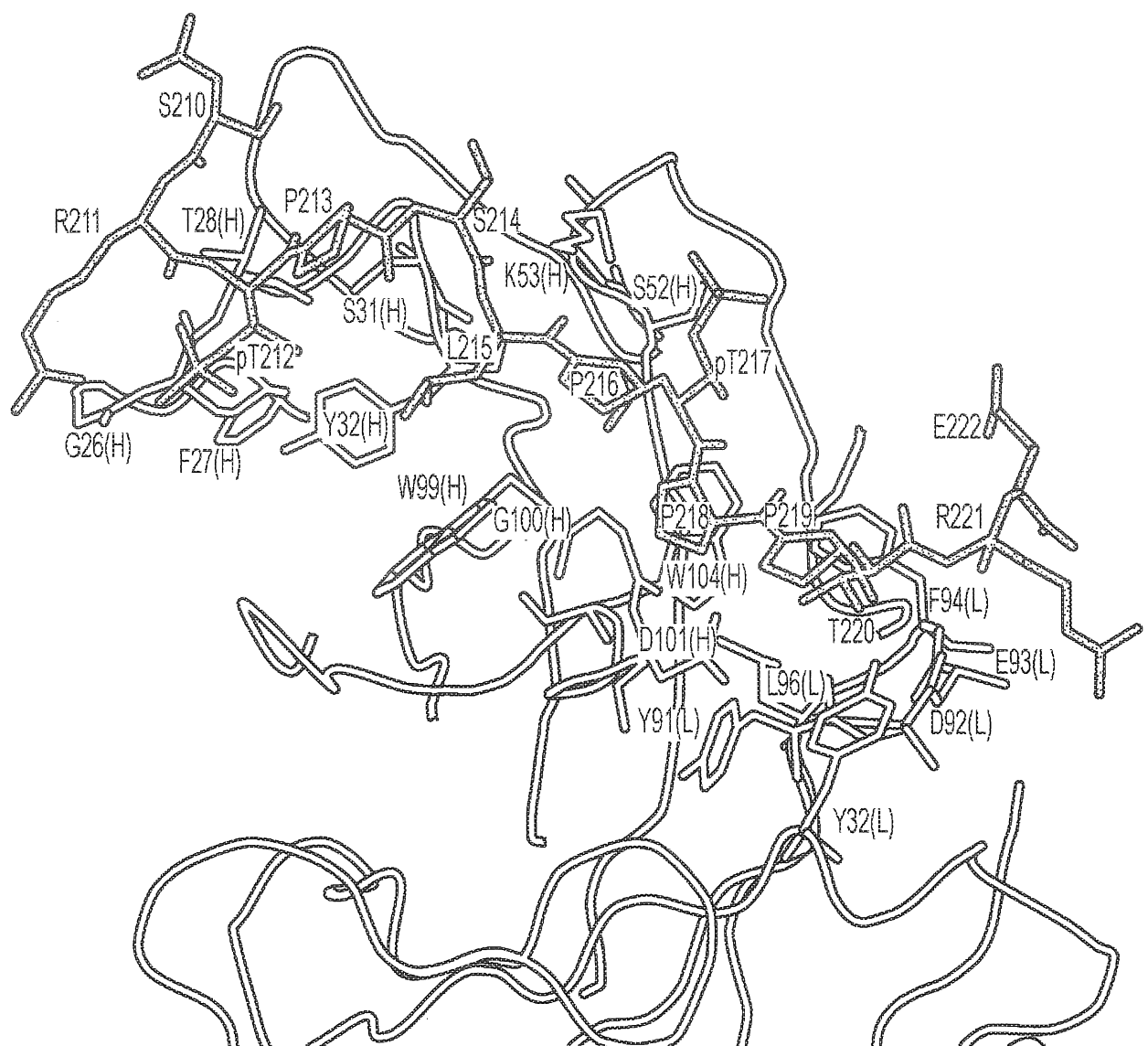
11/27

HÌNH 11

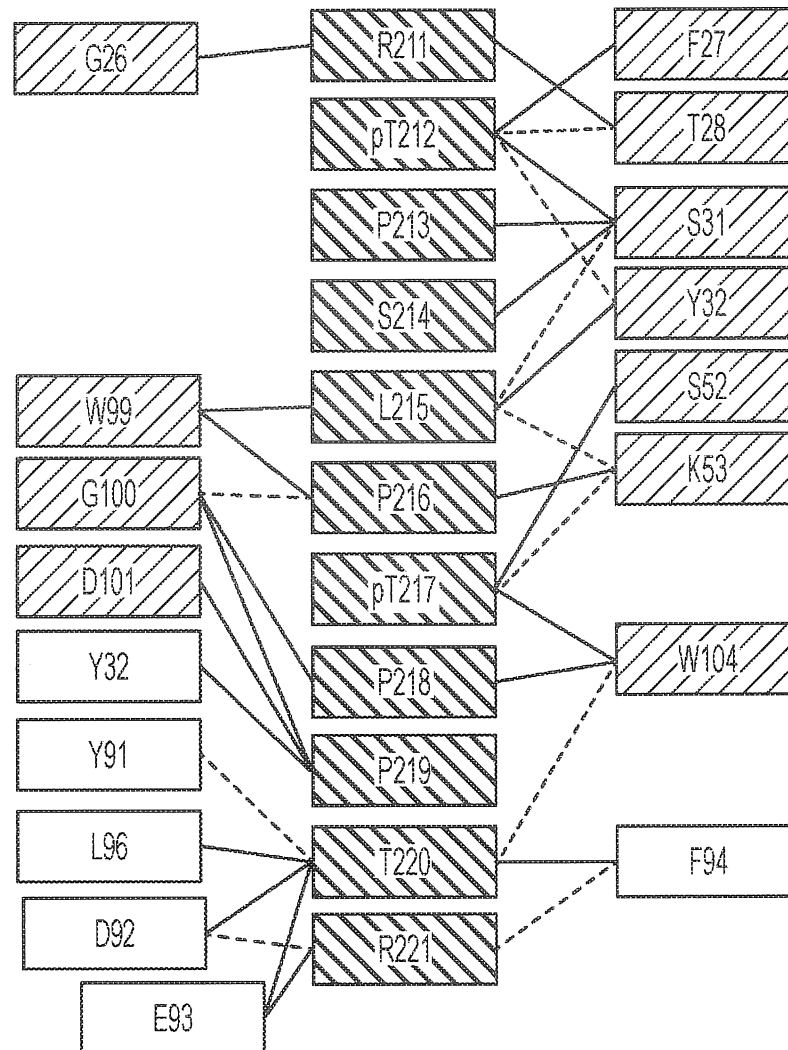


12/27

HÌNH 12

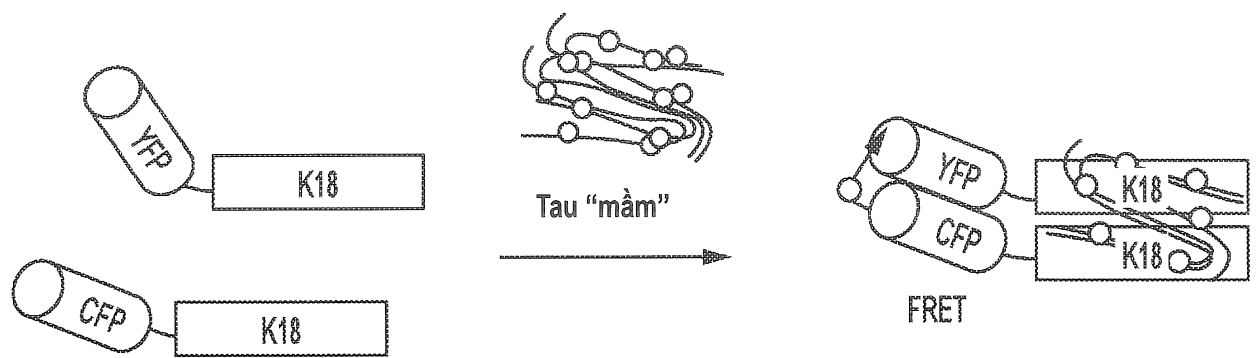


HÌNH 13

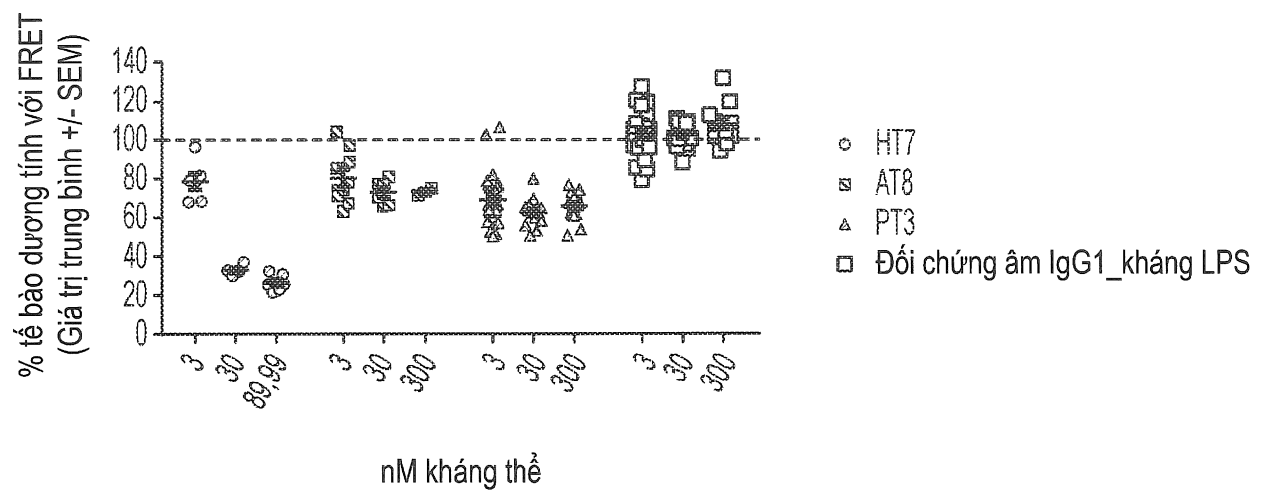


14/27

HÌNH 14

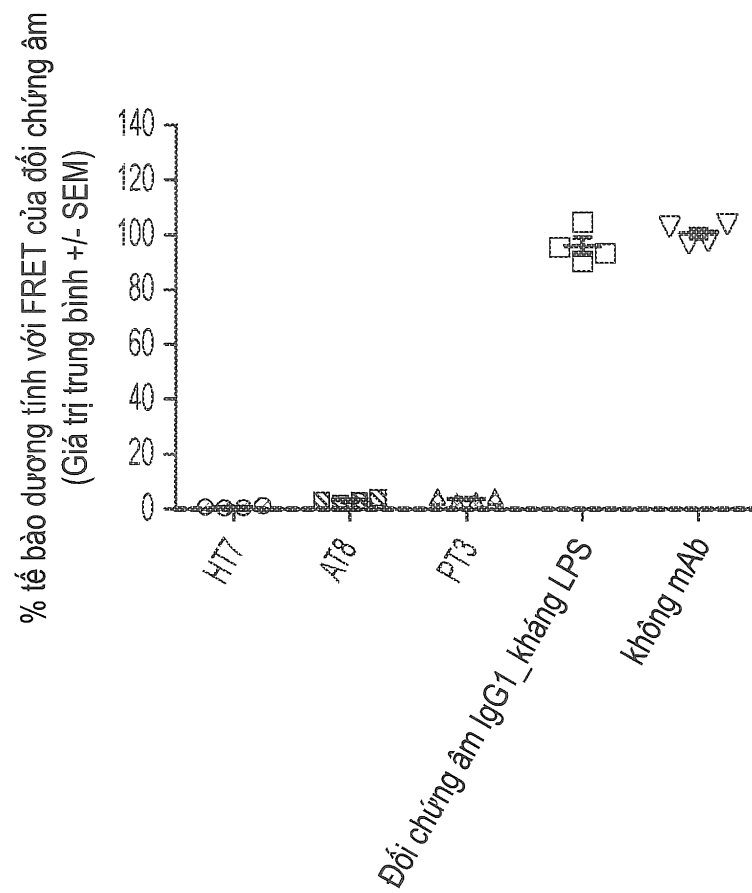


HÌNH 16



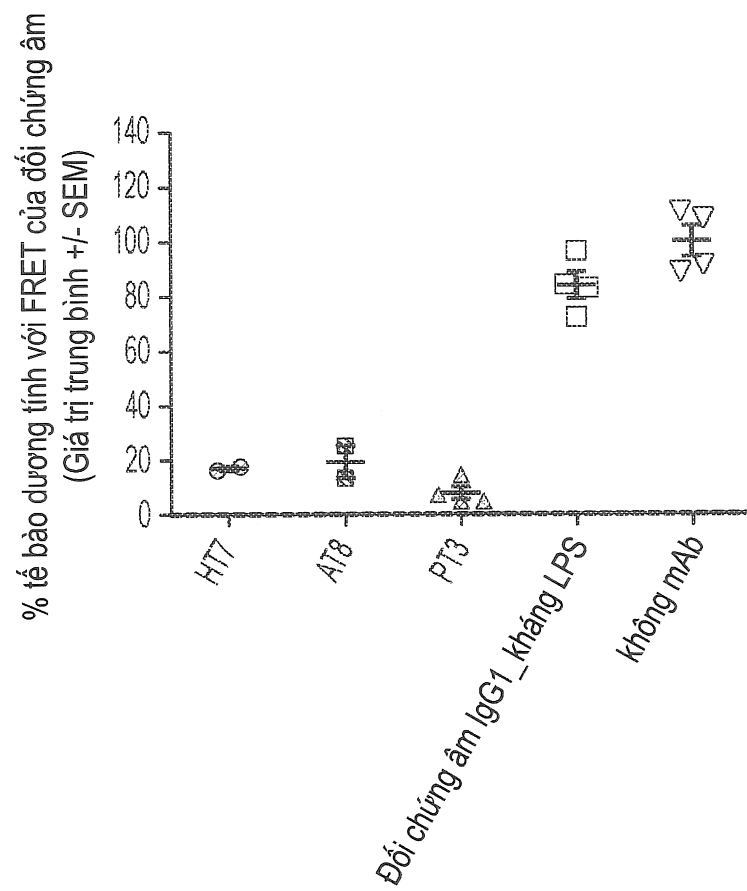
17/27

HÌNH 17



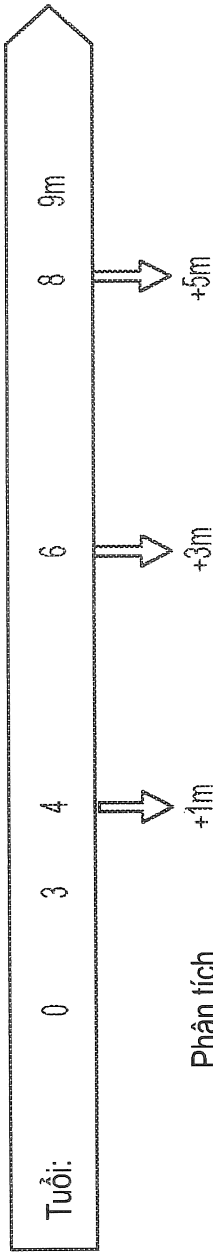
18/27

HÌNH 18



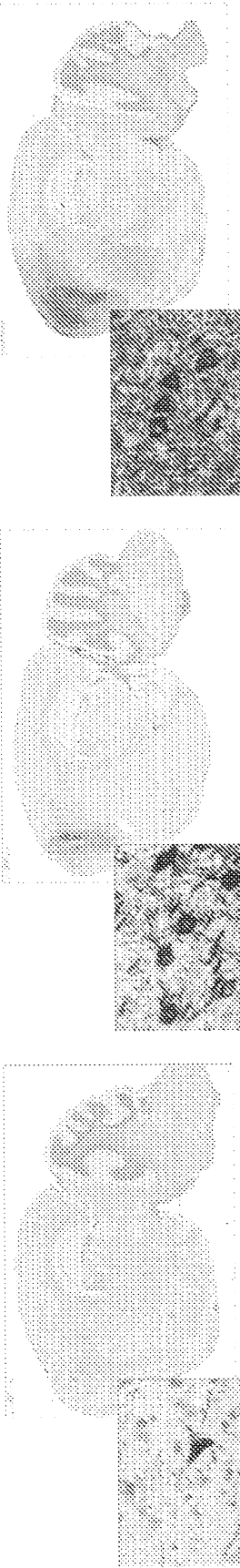
HÌNH 19

Tiêm ePHF theo phương pháp Stereotactic
(lập thể định vị)



ePHF 3m

ePHF 1m



HÌNH 19F

HÌNH 19E

HÌNH 19D

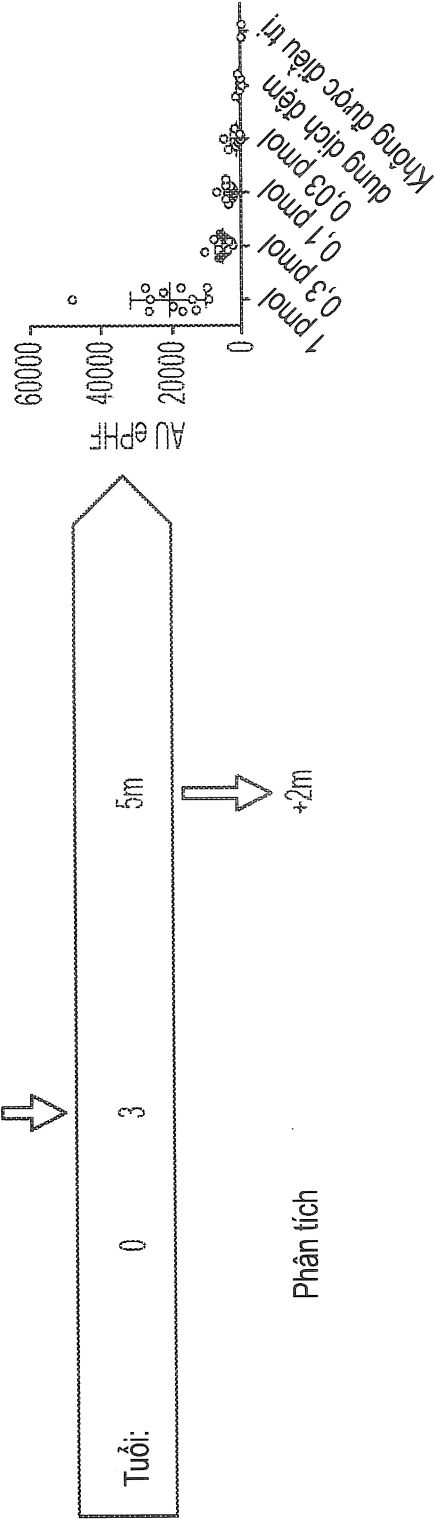
HÌNH 19C

HÌNH 19B

HÌNH 19A

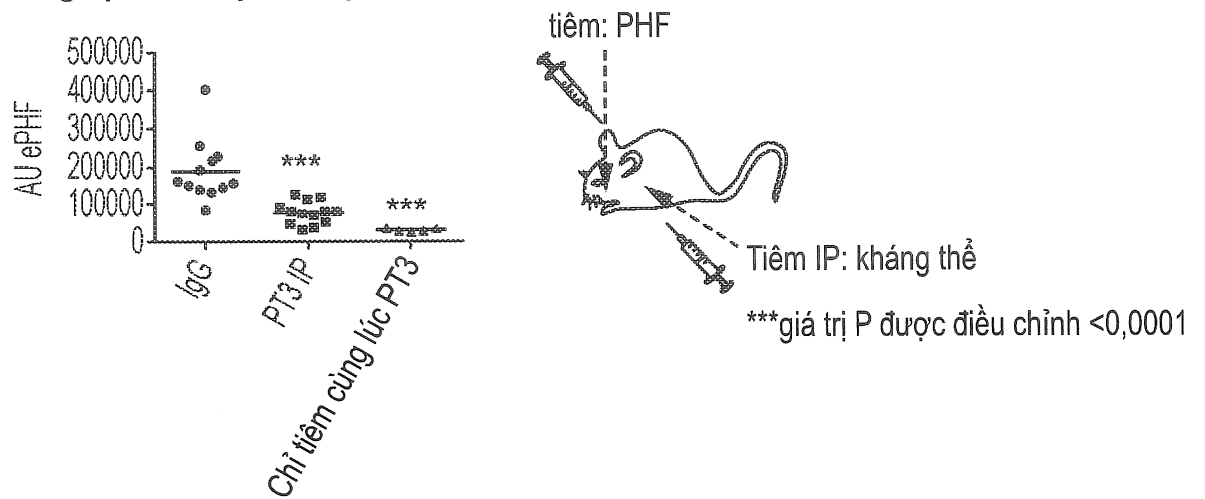
HÌNH 19G

Tiêm ePHF (các liều khác nhau) theo phương pháp Stereotactic
(lập thể định vị)



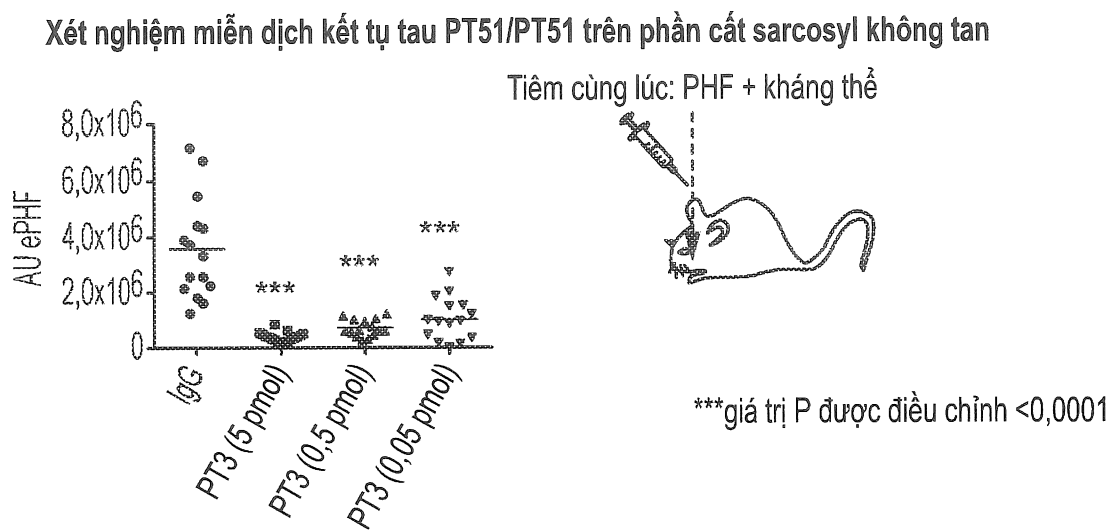
HÌNH 20

Xét nghiệm miễn dịch kết tụ tau PT51/PT51 trên phần cắt sarcosyl không tan



Giảm đáng kể khi điều trị bằng PT3 (IP)

HÌNH 21

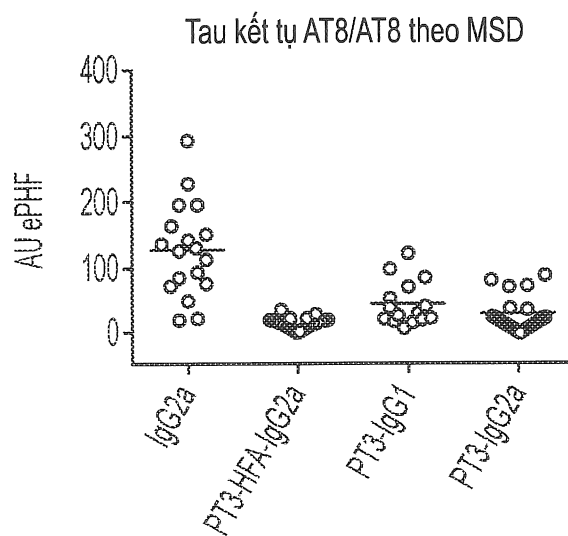


HÌNH 22

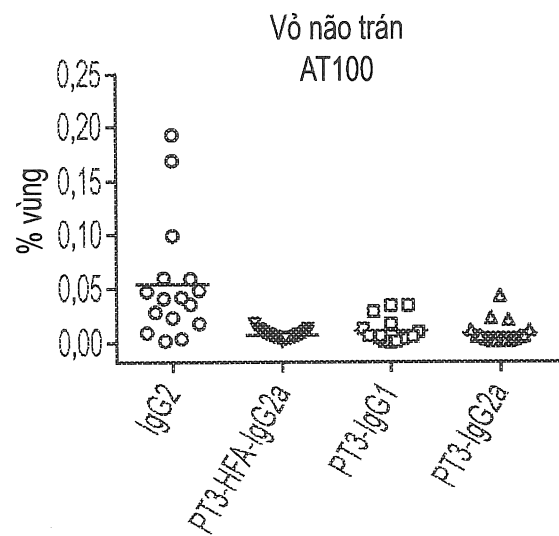
HÌNH 22A

Nhóm	Tiêm cùng lúc	IP (20 mg/kg, 2x/tuần)	n
1	IgG1	IgG1	19
2	PT3(G1)	PT3(G1)	16
3	PT3(G2a)	PT3(G2a)	18
4	PT3(G2a-HFA)	PT3(G2a-HFA)	15

Tiêm	Lượng	Tổng thể tích (μL)	Nồng độ (μM)
2,5 μL ePHF	Tau 1 pmol	5	0,2
2,5 mL kháng thể	ab 25 pmol	5	5

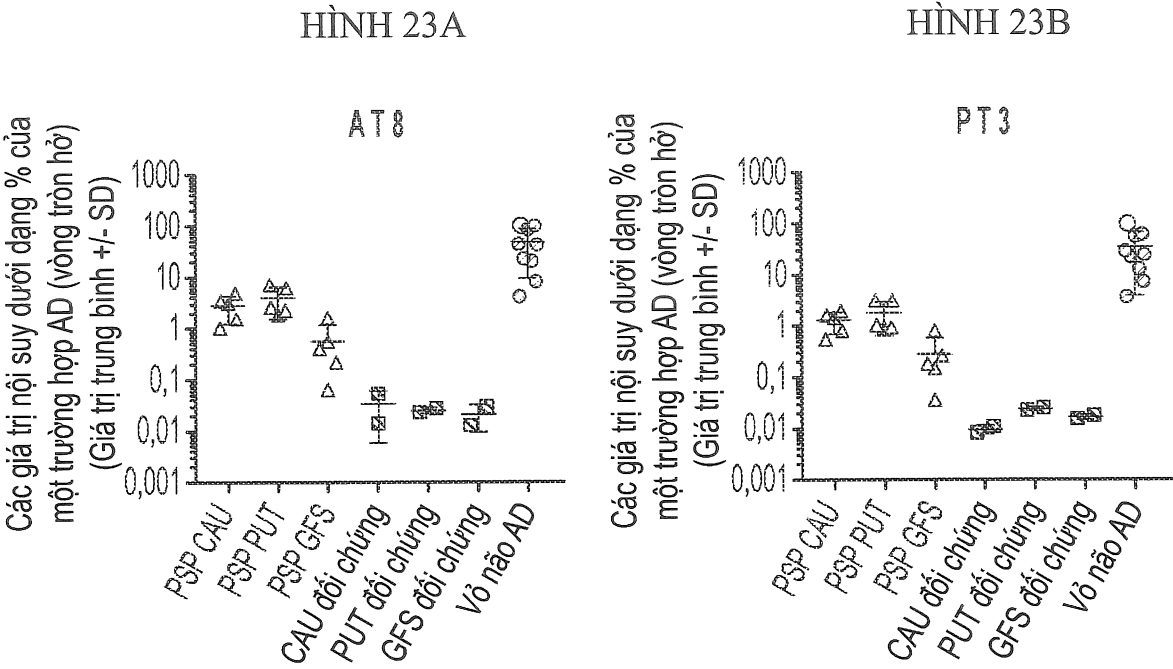


HÌNH 22B

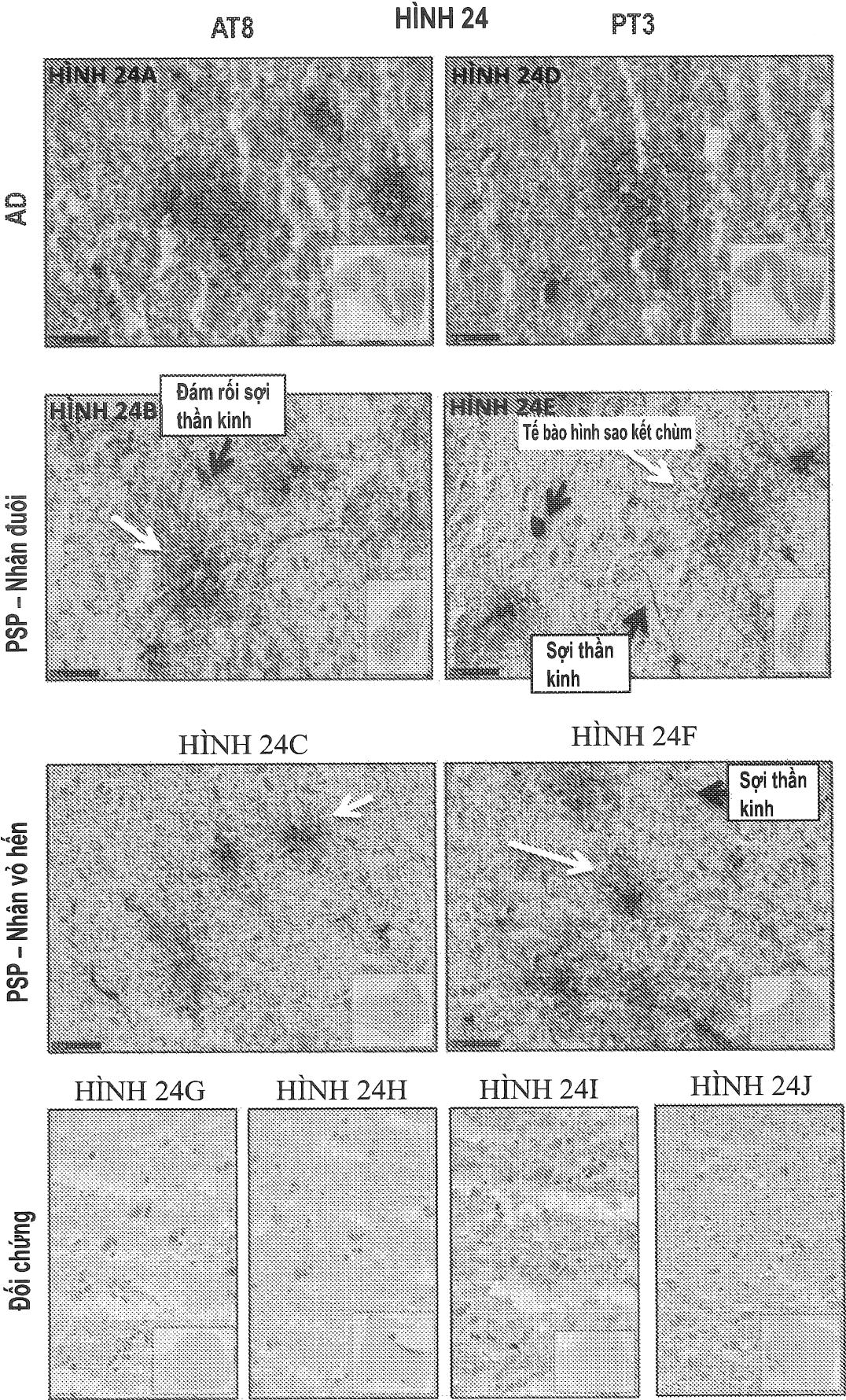


HÌNH 22C

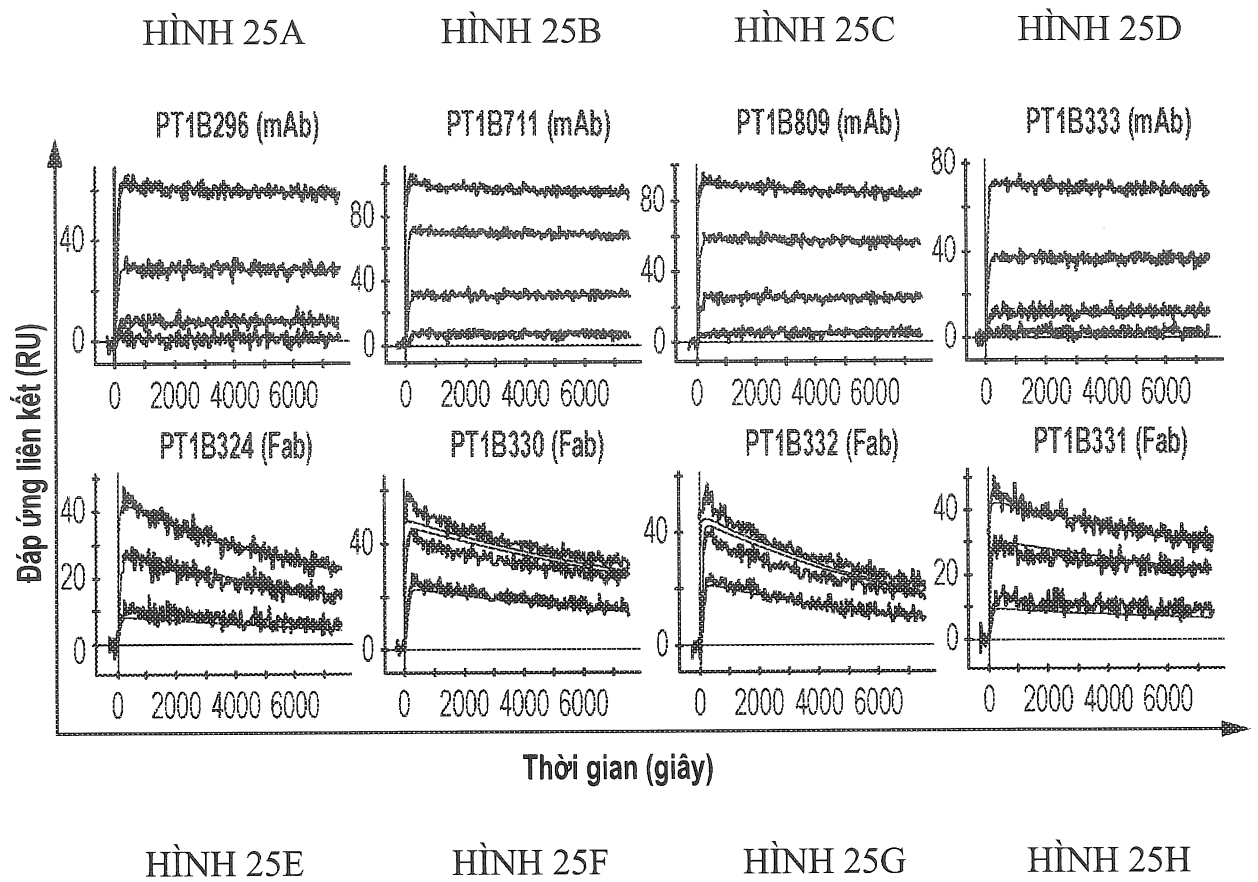
HÌNH 23



25/27



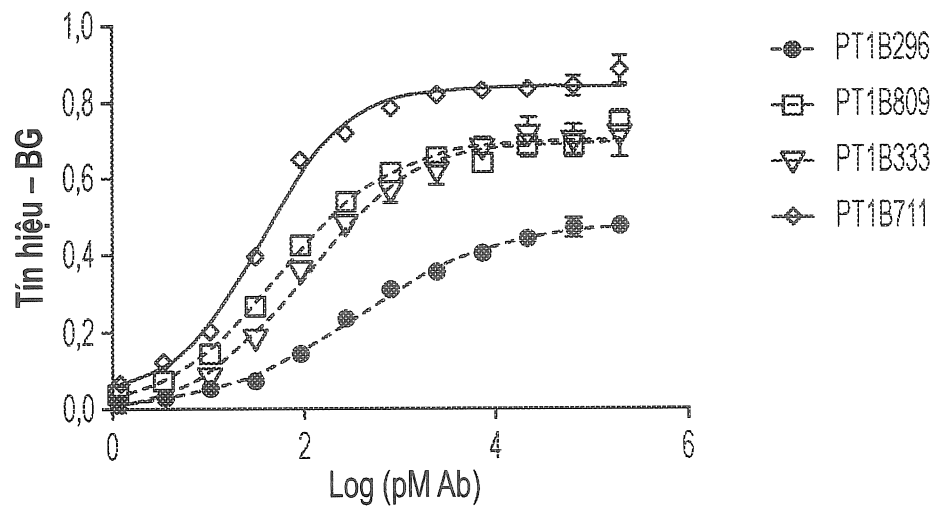
HÌNH 25



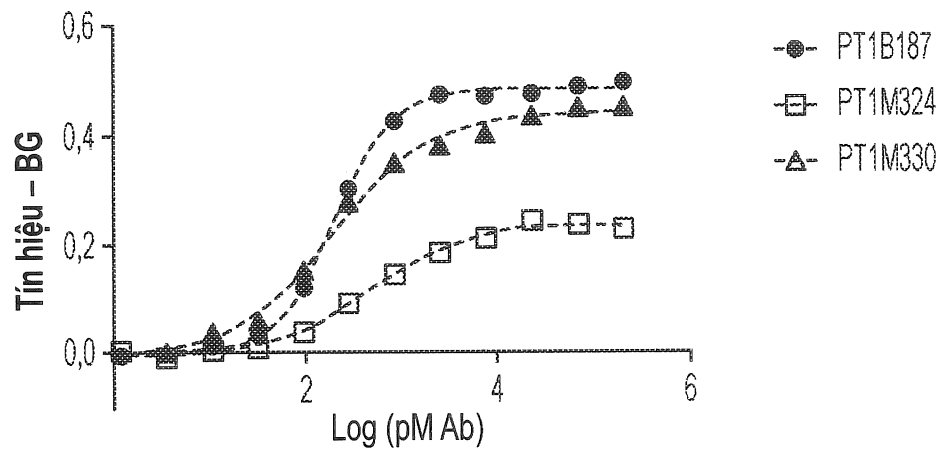
27/27

HÌNH 26

HÌNH 26A



HÌNH 26B



DANH SÁCH LIỆT KÊ TRÌNH TỰ

<110> Janssen Biotech, Inc.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG PHF-TAU, AXIT NUCLEIC ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA KHÁNG THỂ, ĐƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

<130> 688097.0127

<150> 62/472214

<151> 2017-03-16

<160> 81

<170> Phiên bản sáng chế 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus (chuột)

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus (chuột)

<400> 2

Ser Lys Gly Gly Asn
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus (chuột)

<400> 3

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus (chuột)

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 5

Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 6

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 7

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 9

Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 11

Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 12

Ala Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 13

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 14

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 15

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 16

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 17

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 18

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 19

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 20

Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp
 1 5

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 21

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 22

Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
1 5

<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 23

Arg Ala Asn
1

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 24

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 25

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr															
			100					105					110		

Leu Val Thr Val Ser Ala					
		115			

<210> 26
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự VH91

<400> 26

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 Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys															
50						55					60				

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

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

Lys Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr															
			100					105					110		

Leu Val Thr Val Ser Ser					
		115			

```
<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>

<223> Trình tự VH92

<400> 27

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

Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự VH93

<400> 28

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

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

50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự VH94
 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Gln Lys Phe Gln
 50 55 60
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 30

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

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

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự VL77

<400> 31

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

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

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

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

39290

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự VL78

<400> 32

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

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

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

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự VL79

<400> 33

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

```

1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
                20                25                30

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

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
        65                70                75                80

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

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

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự VL80

<400> 34

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr
                20                25                30

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
                35                40                45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
                50                55                60

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
                85                90                95

```

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

<210> 35
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 35
 gaagtgaagc tgggtggaatc tggcggcgac ctctgaagc ctggcggctc tctgaagctg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccagaac 120
 cccgagaagc ggctggaatg ggtggccagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacccc 180
 aacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaacg cccggaacat cctgtacctg 240
 cagatgagca gcctgcggag cgaggacacc gccctgtact attgtgccag aggctggggc 300
 gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc cgct 354

<210> 36
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự VH91

<400> 36
 gaagtgcagc tgctggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaaag gcctggaatg ggtgtccagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacgcc 180
 gacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 240
 cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccctgtact attgtgccaa gggctggggc 300
 gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 37
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự VH92

<400> 37
 caggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga gtggtgcagc ctggcagaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaaag gcctggaatg ggtggccagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacgcc 180
 gacagcgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 240

cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag aggctggggc 300
gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 38
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự VH93

<400> 38
caggtgcagc tgggtggagtc cggaggaggc ctggtgaaac ctggcggctc cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctggat caggcaggcc 120
cctggcaagg gactggagtg ggtgagcagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacgcc 180
gacagcgtga agggcaggtt cacaatcagc agggacaacg ccaagaacag cctgtacctg 240
cagatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgctag gggctggggc 300
gattacggct ggttcgccta ctggggccag gtgaccctgg tgaccgtgag cagc 354

<210> 39
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự VH94

<400> 39
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac caggcgccag cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg ccagcggctt caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gcgccaggct 120
cctggccaga gactggaatg gatgggcagc atcagcaagg gcggcaacac ctactacagc 180
cagaaattcc agggcagagt gaccatcacc cgggacacct ctgccagcac cgcctacatg 240
gaactgagca gcctgcggag cgaggacacc gccgtgtact attgtgccag aggctggggc 300
gactacggat ggttcgccta ttggggccaa gtgaccctcg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 40
<211> 321
<212> ADN
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 40
gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aggtatttaa actggttcca gcagaaacca 120
gggaaatctc ctaagacct gatctatcgt gcaaacagat tgctagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tactctctca ccatcagcag cctggattat 240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgat 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 41
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự VL77

<400> 41
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgtctgccg gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actggttcca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagagcct gatctacaga gccaacagac tgctggacgg cgtgcccagc 180
agatcttctg gcagcggctc cggcaccgac ttaccctga caatcagctc cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 42
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự VL78

<400> 42
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgtctgccg gcgtgggcga cagagtgacc 60
atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actggttcca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagagcct gatctacaga gccaacagac tgctgagcgg cgtgcccagc 180
agatcttctg gcagcggctc cggcaccgac ttaccctga caatcagctc cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 43
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự VL79

<400> 43

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgtctgcca gcgtagggcga cagagtgacc 60
 atcacatgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actgggtatca gcagaagccc 120
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaga gccaacagac tgctggacgg cgtgcccagc 180
 agattttctg gcagcggctc cggcaccgac ttcaccctga caatcagctc cctgcagccc 240
 gaggacttcg ccacctaata ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac ctttggccag 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 44
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự VL80

<400> 44
 gacatcgtga tgacccagac ccccctgagc agccctgtga ccctgggaca gcctgccagc 60
 atcagctgca aggccagcca ggacatcaac agatacctga actggctgca gcagagaccc 120
 ggccagcctc ctaggctgct gatctacagg gccaacagac tgctggacgg cgtgcccagc 180
 agattctccg gcagcggagc tggcaccgac ttcaccctga agatcagcag ggtggaggcc 240
 gaggacgtgg gcggtgacta ctgcctgcag tacgacgagt tccccctgac cttcggccag 300
 ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 45
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự chuỗi nặng của HFA PT3

<400> 45

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

Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			
<210>	46														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	trình tự chuỗi nhẹ của HFA PT3														
<400>	46														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Arg	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55				60				

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 47
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit phospho tau

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 47

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
 20

<210> 48
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit phospho tau

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 48

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
 20

<210> 49
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit phospho tau

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 49

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
 20

<210> 50

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit phospho tau

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 50

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
 20

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit phospho tau

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 51

Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro
1				5					10					15	

Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys
			20		

<210> 52

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit phospho tau

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 52

Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro
1				5					10					15	

Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys
			20		

<210> 53

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit phospho tau

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)..(14)

<223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 53

Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro
1				5					10					15	

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20

<210> 54
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit phospho tau

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 54

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20

<210> 55
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit phospho tau

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 55

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
20

<210> 56
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> peptit phospho tau

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 56

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
 20

<210> 57
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit phospho tau

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 57

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
 1 5 10 15

Pro Pro Thr

<210> 58
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit phospho tau

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 58

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
 20

<210> 59
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit phospho tau

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 59

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys
 20

<210> 60
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit tau đối chứng

<400> 60

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
 1 5 10 15

Thr Arg Glu Pro Lys Lys

20

<210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit tau pT212/ps214/pT217

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 61

Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr
 1 5 10

<210> 62
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit tau pT212/pT217

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> PHOSPHORYL HÓA

<400> 62

Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
 1 5 10

<210> 63
 <211> 450
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tau đối chứng (thể đồng dạng tau người 2N4R 441 aa, thể 6xHis đầu N)

<400> 63

Met His His His His His His Gly Ser Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu
1 5 10 15

Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg
20 25 30

Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr
35 40 45

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

Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr
65 70 75 80

Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys
85 90 95

Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala
100 105 110

Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala
115 120 125

Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr
130 135 140

Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile
145 150 155 160

Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn
165 170 175

Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro
180 185 190

Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser
195 200 205

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu

210		215		220
Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr				
225		230		235 240
Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro				
	245		250	255
Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr				
	260		265	270
Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn				
	275		280	285
Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp				
	290		295	300
Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys				
305		310		315 320
Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn				
	325		330	335
Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys				
	340		345	350
Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn				
	355		360	365
Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys				
	370		375	380
Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu				
385		390		395 400
Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His				
	405		410	415
Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro				
	420		425	430
Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln				
	435		440	445
Gly Leu				
450				

<210> 64
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 64

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

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

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

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
 115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
 130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
 195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

<210> 65
<211> 381
<212> PRT
<213> Người thông minh

<400> 65

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

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

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

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

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
 85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
 100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
 245 250 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
 260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
 275 280 285

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
 290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
 305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
 325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
 340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
 355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380

<210> 66

<211> 410

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 66

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

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

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

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

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro

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

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405 410

<210> 67
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Người thông minh

<400> 67

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

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

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

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
 115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
 130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
 195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
 210 215 220

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
 225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
 245 250 255

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
 260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
 275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
 290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
 340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
 355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380

<210> 68

<211> 441

<212> PRT

<213> Người thông minh

<400> 68

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

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

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 69
<211> 441
<212> PRT
<213> Người thông minh

<400> 69

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

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

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu

35	40	45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser		
50	55	60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val		
65	70	75
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu		
	85	90
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro		
	100	105
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val		
	115	120
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly		
	130	135
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro		
145	150	155
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro		
	165	170
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly		
	180	185
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser		
	195	200
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys		
	210	215
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys		
225	230	235
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val		
	245	250
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly		
	260	265
Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln		
	275	280
		285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 70

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp Leu Asn
 1 5 10

<210> 71
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 71

Thr Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 72

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

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus (chuột)

<400> 73

Gly Trp Gly Ile Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 74
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự chuỗi nặng

<400> 74

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

Ala Ser Ile Ser Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Trp Gly Asp Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Val Thr
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 75

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự chuỗi nhẹ

<400> 75

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 76

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự chuỗi nặng

<400> 76

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

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

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

Ala Ser Ile Thr Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 77

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự chuỗi nhẹ

<400> 77

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Trp
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu

85

90

95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 78

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự chuỗi nặng

<400> 78

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

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

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

Ala Ser Ile Thr Lys Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65					70					75					80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Trp	Gly	Ile	Tyr	Gly	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Val	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115					120					125			
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130					135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210					215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr

305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			
<210>	79														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	trình tự chuỗi nhẹ														
<400>	79														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Arg	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Arg	Ala	Asn	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 80

Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 81
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus (chuột)

<400> 81

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