



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

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



1-0041966

(51)⁷ A61K 39/00; C07K 16/18; A61K 39/395 (13) B

(21) 1-2020-00381

(22) 26/10/2012

(62) 1-2014-01713

(86) PCT/US2012/062290 26/10/2012

(87) WO2013/063516 02/05/2013

(30) 61/553,131 28/10/2011 US; 61/711,208 08/10/2012 US

(45) 25/12/2024 441

(43) 27/07/2020 388

(73) PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (IE)

77 Sir John Rogerson's Quay, Block C Grand Canal Docklands, Dublin 2, D02
VK60, Ireland

(72) SALDANHA, Jose (GB); NIJJAR, Tarlochan S. (US).

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

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI ALPHA-SYNUCLEIN, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA
KHÁNG THỂ NÀY, VÀ TẾ BÀO VẬT CHỦ CHỨA VECTƠ CHỨA AXIT
NUCLEIC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể chứa chuỗi nặng nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 10 hoặc SEQ ID NO. 8 và chuỗi nhẹ nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5, trong đó kháng thể này gắn kết với alpha-synuclein với ái lực tương đương hoặc lớn hơn ái lực của kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai có số lưu trữ là ATCC PTA-8221, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ của người; axit nucleic mã hóa kháng thể này; và tế bào vật chủ chứa vectơ chứa axit nucleic này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể chứa chuỗi nặng nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 10 hoặc SEQ ID NO. 8 và chuỗi nhẹ nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5, trong đó kháng thể này gắn kết với alpha-synuclein với ái lực tương đương hoặc lớn hơn ái lực của kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai có số lưu trữ là ATCC PTA-8221, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ của người; axit nucleic mã hóa kháng thể này; và tế bào vật chủ chứa vectơ chứa axit nucleic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các bệnh do lắng đọng bất thường synuclein, cũng được gọi là các bệnh do thể Lewy (Lewy body disease - LBD), được đặc trưng bởi quá trình thoái hóa hệ tiết dopamin, làm biến đổi chức năng vận động, suy giảm nhận thức, và tạo ra các thể Lewy (LB) và/hoặc sợi trục Lewy. (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). Các bệnh do lắng đọng bất thường synuclein bao gồm bệnh Parkinson (bao gồm bệnh Parkinson tự phát), bệnh do thể Lewy lan tỏa (Diffuse Lewy Body Disease - DLBD) còn được gọi là bệnh sa sút trí tuệ kèm theo thể Lewy (DLB), các dạng biến đổi của thể Lewy của bệnh Alzheimer (Lewy body variant of Alzheimer's disease - LBV), bệnh Alzheimer và Parkinson kết hợp, rối loạn thần kinh tự động đơn thuần và bệnh teo đa hệ thống (MSA; ví dụ, teo trám cầu tiểu não, thoái hóa thể vân chất đen và hội chứng Shy-Drager). Một vài dấu hiệu và triệu chứng không vận động được cho là dấu hiệu sớm của bệnh do lắng đọng bất thường synuclein ở pha báo trước của các bệnh này (tức là giai đoạn tiền triệu chứng, cận lâm sàng, tiền lâm sàng, hoặc tiền vận động). Các dấu hiệu sớm này bao gồm, ví dụ, rối loạn biểu hiện ngủ REM (REM sleep behavior disorder - RBD), mất khả năng khúu giác và chứng táo bón (Mahowald et al., Neurology (2010) 75:488-489). Bệnh do

thể Lewy còn là nguyên nhân phổ biến của các rối loạn vận động và giảm nhận thức ở người cao tuổi (Galasko et al., Arch. Neurol. (1994) 51:888-95).

Alpha-synuclein là một phần của họ protein lớn bao gồm beta-synuclein và gamma-synuclein và beta-synoretin và gamma-synoretin. Alpha-synuclein được biểu hiện ở trạng thái bình thường liên quan tới các synap và đóng vai trò đảm bảo tính linh hoạt thần kinh, khả năng học hỏi và trí nhớ. Một vài nghiên cứu gợi ý rằng alpha-synuclein có vai trò chủ yếu trong quá trình sinh bệnh PD. Protein này có thể kết tụ để tạo ra các sợi không tan trong điều kiện bệnh lý. Ví dụ, synuclein tích tụ trong các LB (Spillantini et al., Nature (1997) 388:839-40; Takeda et al., J. Pathol. (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. (1997) 239:45-8). Các đột biến ở gen alpha-synuclein gây đồng phân ly các dạng bệnh Parkinson gia đình hiếm gặp (Kruger et al., Nature Gen. (1998) 18:106-8; Polymeropoulos, et al., Science (1997) 276:2045-7). Sự biểu hiện quá mức alpha synuclein ở chuột nhắt chuyển gen (Masliah et al., Science (2000) 287:1265-9) và ruồi giấm *Drosophila* (Feany et al., Nature (2000) 404:394-8) mô phỏng một vài dạng của bệnh do thể Lewy. Ngoài ra, nhận thấy rằng các oligome tan của synuclein có thể là chất gây độc thần kinh (Conway KA, et al., Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:571-576; VollesMJ, Lansbury PT, Jr Biochemistry (2003) 42:7871-7878). Sự tích tụ alpha-synuclein với các biến đổi hình thái và hệ thần kinh tương tự ở các loài và các mô hình động vật khác nhau như người, chuột nhắt, và ruồi đã đưa ra gợi ý rằng phân tử này là nguyên nhân gây ra sự phát triển của bệnh do thể Lewy. WO-A-2008/103472 mô tả chế phẩm và phương pháp điều trị các bệnh liên quan đến bệnh do lắng đọng bất thường synuclein, bao gồm các thể Lewy của alpha-synuclein trong não của đối tượng bị bệnh. Kháng thể đơn dòng 9E4 của chuột nhắt (số lưu trữ là ATCC PTA-8221) đã được bộc lộ. Masliah et al PLoS One 2011 Apr 29;6(4):e19338 mô tả rằng phương pháp gây miễn dịch thụ động bằng kháng thể 9E4 làm giảm các khiếm khuyết về hành vi và bệnh lý thần kinh trong mô hình chuyển gen alpha-synuclein của bệnh do thể Lewy. WOA-2007/011907 mô tả các kháng thể của người đặc hiệu alpha-synuclein, để chẩn đoán, theo dõi hoặc điều trị bệnh như bệnh Parkinson.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến kháng thể gắn kết với alpha synuclein.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến các phương án sau:

1. Kháng thể chứa chuỗi nặng nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 10 hoặc SEQ ID NO. 8 và chuỗi nhẹ nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5, trong đó kháng thể này gắn kết với alpha-synuclein với ái lực tương đương hoặc lớn hơn ái lực của kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai có số lưu trữ là ATCC PTA-8221, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ của người.

2. Kháng thể theo phương án 1, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14 với điều kiện gốc lysin ở đầu tận cùng C có thể được loại bỏ; và vùng hằng định chuỗi nhẹ này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.

3. Kháng thể theo phương án 1, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14 với điều kiện gốc lysin ở đầu tận cùng C có thể được loại bỏ; và vùng hằng định chuỗi nhẹ này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.28.

4. Kháng thể theo phương án 1, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này là vùng hằng định chuỗi nặng của isotyp IgG1 của người

5. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng nhân tạo và chuỗi nhẹ nhân tạo như nêu trong phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

6. Axit nucleic theo phương án 5, trong đó axit nucleic này có trình tự như nêu trong trình tự bất kỳ SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.20.

7. Tế bào vật chủ chứa vector chứa axit nucleic theo phương án 5 hoặc 6.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình vẽ thể hiện sự sắp hàng của các trình tự axit amin của kháng thể đơn dòng gốc hoàn chỉnh (được gọi là m9E4) chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh 9E4

được làm giống như của người. 1791009Hu9E4VHFr (SEQ ID NO.7) là trình tự V_H thể nhận của người. Các vùng CDR được đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat được gạch chân và in đậm.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện sự sắp hàng của các trình tự axit amin của kháng thể đơn dòng gốc hoàn chỉnh (được gọi là m9E4) chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh 9E4 được làm giống như của người. 63102889Hu9E4VLFr (SEQ ID NO.2) là trình tự V_L thể nhận của người. Các vùng CDR được đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat được gạch chân và in đậm.

Fig.3 là biểu đồ thể hiện kết quả của phương pháp điều trị miễn dịch thụ động bằng 9E4 về khả năng ghi nhớ trong bộ phận dò của thử nghiệm mê cung nước Morris.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện kết quả của phương pháp điều trị miễn dịch thụ động bằng 9E4 về tốc độ và sai số trong thử nghiệm chùm D xoay tròn.

Fig.5 là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm miễn dịch kết tủa của các dạng kháng thể 9E4 được làm giống như của người khác nhau kháng kháng nguyên của nó lấy từ mô bệnh. Ch9E4: 9E4 thể khảm; H1L3: Hu9E4VHv1- Hu9E4VLv3; H3L2: Hu9E4VHv3- Hu9E4VLv2; H3L3: Hu9E4VHv3- Hu9E4VLv3; N.S.=không đặc hiệu.

Fig.6 là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm thấm tách Western của synuclein tái tổ hợp của người với kháng thể 9E4 thể khảm, kháng thể 9E4 của chuột nhắt, và kháng thể 9E4 được làm giống như của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

SEQ ID NO.1 là trình tự axit amin của vùng biến đổi m9E4VL.

SEQ ID NO.2 là trình tự axit amin của vùng biến đổi 63102889Hu9E4VLFr.

SEQ ID NO.3 là trình tự axit amin của vùng biến đổi Hu9E4VLv1.

SEQ ID NO.4 là trình tự axit amin của vùng biến đổi Hu9E4VLv2.

SEQ ID NO.5 là trình tự axit amin của vùng biến đổi Hu9E4VLv3.

SEQ ID NO.6 là trình tự axit amin của vùng biến đổi m9E4VH.

SEQ ID NO.7 là trình tự axit amin của vùng biến đổi 1791009Hu9E4VHFr.

SEQ ID NO.8 là trình tự axit amin của vùng biến đổi Hu9E4VHv1.

SEQ ID NO.9 là trình tự axit amin của vùng biến đổi Hu9E4VHv2.

SEQ ID NO.10 là trình tự axit amin của vùng biến đổi Hu9E4VHv3.

SEQ ID NO.11 là trình tự axit amin của vùng biến đổi Hu9E4VHv4.

SEQ ID NO.12 là trình tự axit amin của alpha-synuclein thể dại của người.

SEQ ID NO.13 là trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ 9E4 được làm giống như của người, chứa arginin ở đầu tận cùng N.

SEQ ID NO.14 là trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng 9E4 được làm giống như của người.

SEQ ID NO.15 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi Hu9E4VLv1.

SEQ ID NO.16 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi Hu9E4VLv2.

SEQ ID NO.17 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi Hu9E4VLv3.

SEQ ID NO.18 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi Hu9E4VHv1.

SEQ ID NO.19 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi Hu9E4VHv2.

SEQ ID NO.20 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi Hu9E4VHv3.

SEQ ID NO.21 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi Hu9E4VHv4.

SEQ ID NO.22 là trình tự axit amin của peptit tín hiệu Hu9E4VL.

SEQ ID NO.23 là trình tự nucleotit của peptit tín hiệu Hu9E4VL.

SEQ ID NO.24 là trình tự axit amin của peptit tín hiệu Hu9E4VH.

SEQ ID NO.25 là trình tự nucleotit của peptit tín hiệu Hu9E4VH.

SEQ ID NO.26 là trình tự axit amin tương đồng Hu9E4VL.

SEQ ID NO.27 là trình tự axit amin tương đồng Hu9E4VH.

SEQ ID NO.28 là trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ 9E4 được làm giống như của người, không chứa arginin ở đầu tận cùng N.

SEQ ID NO.29 là trình tự axit amin của phiên bản 3 của chuỗi nhẹ 9E4 được làm giống như của người bao gồm (a) vùng biến đổi và (b) vùng hằng định chứa arginin ở đầu tận cùng N.

SEQ ID NO.30 là trình tự axit amin của phiên bản 3 của chuỗi nhẹ 9E4 được làm giống như của người bao gồm (a) vùng biến đổi và (b) vùng hằng định không chứa arginin ở đầu tận cùng N.

SEQ ID NO.31 là trình tự axit amin của phiên bản 3 của chuỗi nặng 9E4 được làm giống như của người chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi và vùng hằng định.

SEQ ID NO.32 là trình tự axit amin của phiên bản BIP của vùng hằng định alotyp G1m3 của chuỗi nặng 9E4 được làm giống như của người.

Thuật ngữ

Kháng thể đơn dòng thường được tạo ra ở dạng đã tách riêng. Tức là kháng thể thường có độ tinh khiết ít nhất bằng 50% khối lượng/khối lượng của các protein và đại phân tử khác có nguồn gốc từ quá trình sản xuất hoặc tinh chế nó nhưng không loại trừ khả năng kháng thể đơn dòng được kết hợp với lượng dư chất mang được dùng hoặc tá dược khác để thuận tiện cho việc sử dụng nó. Đôi khi kháng thể đơn dòng có độ tinh khiết ít nhất bằng 60%, 70%, 80%, 90%, 95 hoặc 99% khối lượng/khối lượng của các protein và đại phân tử khác từ quá trình sản xuất hoặc tinh chế.

Khả năng gắn kết đặc hiệu của kháng thể đơn dòng với kháng nguyên đích của nó có nghĩa là ái lực ít nhất bằng 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , hoặc 10^{10} M^{-1} . Quá trình gắn kết đặc hiệu có cường độ phát hiện mạnh hơn và có tính phân biệt hơn so với gắn kết không đặc hiệu xảy ra ở ít nhất một đích không liên quan. Quá trình gắn kết đặc hiệu có thể là kết quả của việc tạo ra liên kết giữa các nhóm chức cụ thể hoặc tính thích ứng không gian cụ thể (ví dụ, kiểu chốt và khóa), trong khi đó quá trình gắn kết không đặc hiệu thường là kết

quả của lực van der Waals. Tuy nhiên, quá trình gắn kết đặc hiệu không nhất thiết cho rằng kháng thể đơn dòng gắn kết với một và chỉ một đích.

Đơn vị cấu trúc cơ bản của kháng thể là cấu trúc tứ phân của các cấu trúc siêu phân tử. Mỗi cấu trúc tứ phân bao gồm hai cặp giống nhau là mạch polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi có khoảng từ 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chủ yếu là đáp ứng với quá trình nhận diện kháng nguyên. Vùng biến đổi này được biểu hiện liên kết ban đầu với peptit tín hiệu dễ phân cắt. Vùng biến đổi không có peptit tín hiệu đôi khi được gọi là vùng biến đổi hoàn chỉnh. Do vậy, ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ không có peptit tín hiệu trên chuỗi nhẹ. Đầu tận cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định chủ yếu đáp ứng với chức năng cảm ứng.

Các chuỗi nhẹ được phân loại dưới dạng kappa hoặc lambda. Các chuỗi nặng được phân loại dưới dạng gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể lần lượt là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE. Trong các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, các vùng biến đổi và ổn định được nối với nhau bởi vùng “J” gồm khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, đối với chuỗi nặng cũng bao gồm vùng “D” gồm khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. (Xem tổng thể, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7, được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn).

Các vùng biến đổi hoàn chỉnh của mỗi cặp nhẹ/nặng tạo ra vị trí gắn kết kháng thể. Do vậy, kháng thể nguyên vẹn có hai vị trí liên kết. Ngoại trừ kháng thể chức kép hoặc đặc hiệu kép, hai vị trí liên kết này là giống nhau. Các chuỗi có cùng cấu trúc tổng thể của vùng khung (FR) được bảo thủ tương đối được nối với nhau bởi ba vùng siêu biến đổi, còn được gọi là vùng xác định bổ sung hoặc CDR. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp được sắp hàng bởi các vùng khung, có khả năng gắn kết với epitop đặc hiệu. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, cả chuỗi nhẹ lẫn chuỗi nặng bao gồm các vùng FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Việc chuyển các axit amin tới mỗi vùng là được đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat, trình tự của các protein miễn dịch nhất định (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 và 1991), hoặc Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat cũng đưa ra quy ước đánh số được sử dụng rộng rãi (theo hệ thống đánh số

thứ tự Kabat) trong đó các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được quy ước là có cùng một số (ví dụ, H83 có nghĩa là vị trí 83 bằng cách đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat trong vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh; tương tự, vị trí L36 có nghĩa là vị trí 36 bằng cách đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh).

Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các kháng thể nguyên vẹn và mảnh gắn kết của chúng. Thông thường, các mảnh này cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn mà chúng có nguồn gốc từ các mảnh để gắn kết đặc hiệu với đích bao gồm chuỗi nặng, chuỗi nhẹ tách riêng Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, kháng thể kép, kháng thể chứa hai mảnh globulin miễn dịch, kháng thể có kích cỡ nano, và Fv. Các mảnh có thể được sản sinh bởi phương pháp ADN tái tổ hợp, hoặc bằng enzym hoặc tách hóa học globulin miễn dịch nguyên vẹn. Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể được làm giống như của người. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc chức kép là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau (ví dụ, xem, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-53 (1992)). Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau bao gồm cặp chuỗi/chuỗi nhẹ 9E4 được làm giống như của người nặng pair và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ đặc hiệu với epitop khác trên alpha synuclein so với epitop đã gắn kết bởi 9E4. Các kháng thể được làm giống như của người thường được thảo luận trong Phần IV B dưới đây.

Thuật ngữ “epitop” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà kháng thể gắn kết. Epitop có thể được tạo ra từ các axit amin kế tiếp hoặc axit amin không kế tiếp nằm liền kề nhau bằng cách gấp ba lần một hoặc nhiều protein. Các epitop đã tạo ra từ các axit amin kế tiếp thường được giữ lại để làm các dung môi biến tính, nhưng trái lại các epitop đã tạo ra bằng cách gấp ba lần thường bị mất đi trong quá trình xử lý bằng các dung môi biến tính. Epitop thường bao gồm ít nhất 3 axit amin, và tốt hơn là, ít nhất 5 hoặc 8-10 axit amin trong cấu dạng không gian duy nhất. Các phương pháp xác định cấu dạng không gian của epitop bao gồm, ví dụ, tinh thể tia X và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. Ví dụ, xem, Epitope Mapping Protocol, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Các kháng thể nhận diện cùng loại epitop hoặc các epitop chồng lên nhau có thể xác định trong thử nghiệm miễn dịch đơn giản để chứng tỏ khả năng cạnh tranh của một kháng thể với khả năng gắn kết của kháng thể khác với kháng nguyên đích. Epitop của kháng thể cũng có thể được xác định bằng tinh thể tia X của kháng thể đã gắn kết với kháng nguyên của nó để xác định các gốc tiếp xúc. Theo cách khác, hai kháng thể có cùng epitop nếu tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên bị yếu đi hoặc mất khả năng gắn kết của một kháng thể thì nó sẽ bị yếu đi hoặc mất khả năng gắn kết của kháng thể khác. Hai kháng thể có các epitop chồng lên nhau nếu một số đột biến axit amin bị yếu đi hoặc mất khả năng gắn kết của một kháng thể thì sẽ bị yếu đi hoặc mất khả năng gắn kết của kháng thể khác.

Quá trình cạnh tranh giữa các kháng thể được xác định theo thử nghiệm trong đó kháng thể trong thử nghiệm ức chế khả năng gắn kết đặc hiệu của kháng thể so sánh với kháng nguyên thông thường (ví dụ, xem, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Kháng thể thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể so sánh nếu lượng dư kháng thể thử nghiệm (ví dụ, ít nhất gấp 2, 5, 10, 20 hoặc 100 lần) ức chế khả năng gắn kết của kháng thể so sánh ít nhất 50%, nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc 99% như được xác định trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Các kháng thể đã xác định bởi thử nghiệm cạnh tranh (kháng thể cạnh tranh) bao gồm các kháng thể gắn kết với cùng epitop làm kháng thể so sánh và các kháng thể gắn kết với epitop liền kề ở đầu đủ gần để epitop gắn kết bởi kháng thể so sánh để làm cản trở không gian.

Thuật ngữ “đối tượng bị bệnh” bao gồm người hoặc động vật có vú khác cần điều trị hoặc phòng ngừa.

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

Tỷ lệ tương đồng trình tự được xác định bằng trình tự kháng thể được sắp hàng tối đa theo quy ước của hệ thống đánh số thứ tự Kabat. Sau khi sắp hàng, nếu vùng kháng thể của đối tượng (ví dụ, toàn bộ vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) cần so sánh với cùng một vùng của kháng thể so sánh, thì tỷ lệ tương đồng trình tự giữa vùng kháng thể của đối tượng và vùng kháng thể so sánh là số vị trí bị chiếm giữ bởi cùng loại axit amin ở cả vùng kháng thể của đối tượng và kháng thể so sánh chia cho tổng số vị trí đã sắp hàng của hai vùng này, với các khe không được đếm, nhân với 100 để chuyển sang tỷ lệ phần trăm.

Chế phẩm hoặc phương pháp “bao gồm” một hoặc nhiều nguyên tố đã nêu có thể bao gồm các nguyên tố khác không được nêu cụ thể. Ví dụ, chế phẩm bao gồm kháng thể có thể chứa kháng thể riêng rẽ hoặc kết hợp với các thành phần khác.

Việc xác định khoảng giá trị bao gồm toàn bộ các số nguyên nằm trong hoặc xác định khoảng này, và toàn bộ các khoảng phụ đã được xác định theo các số nguyên nằm trong khoảng này.

Trừ khi có chỉ dẫn khác rõ ràng so với ngữ cảnh, thuật ngữ “khoảng” bao hàm các giá trị nằm trong SEM của giá trị đã nêu.

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

Thuật ngữ “triệu chứng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bằng chứng chủ quan của bệnh, như đáng đi thay đổi, như được cảm thấy bởi đối tượng bị bệnh. Thuật ngữ “dấu hiệu” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bằng chứng chủ quan của bệnh như được quan sát bởi thầy thuốc.

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

Thuật ngữ “chức năng nhận thức” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ các quá trình về trí tuệ như quá trình bất kỳ hoặc toàn bộ về sự tập trung, trí nhớ, ngôn ngữ phát

triển và hiểu biết, giải quyết vấn đề, và có mối quan tâm tới mọi người xung quanh và khả năng tự chăm sóc bản thân.

Thuật ngữ “chức năng nhận thức được tăng cường” hoặc “chức năng nhận thức được cải thiện” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự cải thiện so với mức nền, ví dụ, chẩn đoán hoặc bắt đầu điều trị. “Suy giảm chức năng nhận thức” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ sự giảm sút về chức năng so với mức nền này.

Trong hệ thống mô hình động vật như chuột hoặc chuột nhắt, chức năng nhận thức có thể được xác định bằng các phương pháp sử dụng mê cung trong đó các đối tượng sử dụng thông tin về không gian (ví dụ, thử nghiệm mê cung nước Morris, mê cung tròn Barnes, mê cung nhánh tăng dần, mê cung T và các thử nghiệm khác), tình trạng sợ hãi, mất hoạt động, trường mở đã chiếu sáng, dụng cụ đo hoạt động trong bóng tối, mê cung tăng dần, thử nghiệm thăm dò hai ngăn hoặc thử nghiệm bơi bắt buộc.

Ở người, chức năng nhận thức có thể được xác định bằng một hoặc nhiều thử nghiệm tiêu chuẩn. Ví dụ về thử nghiệm hoặc thực nghiệm chức năng nhận thức đã được mô tả (Ruoppila, I. và Suutama, T. Scand. J. Soc. Med. Suppl. 53,44-65, 1997) và bao gồm các thử nghiệm thần kinh tiêu chuẩn (ví dụ, thang điểm về trí nhớ Wechsler, thang điểm về hiểu biết ở người lớn Wechsler, Ma trận về mức độ tiến bộ tiêu chuẩn Raven, Thử nghiệm về khả năng trí tuệ ở người lớn Schaie-Thurstone), thử nghiệm tâm lý thần kinh (ví dụ, Luria-Nebraska), tự đánh giá về trí tuệ-nhận thức (ví dụ, Bảng câu hỏi về trí tuệ-trí nhớ), thử nghiệm sàng lọc khả năng nhìn (ví dụ, các hình vẽ Poppelreuter, nhận thức Clock, hình vẽ và từ bỏ Honeycomb), thử nghiệm sàng lọc nhận thức (ví dụ, thử nghiệm trạng thái trí tuệ mini Folstein) và thử nghiệm thời gian phản ứng. Các thử nghiệm tiêu chuẩn khác về tính năng nhận thức bao gồm thang điểm phụ về nhận thức của thang điểm đánh giá bệnh Alzheimer (ADAS-cog); thang điểm thay đổi biểu hiện toàn thể lâm sàng (thang điểm kết hợp CIBIC); thang điểm về hoạt động nghiên cứu hợp tác của lối sống hàng ngày của bệnh Alzheimer (ADCS-ADL); thử nghiệm tình trạng trí tuệ mini (MMSE); Bảng tóm tắt thần kinh trí tuệ (NPI); thang điểm đánh giá bệnh sa sút trí tuệ lâm sàng (CDR); pin tự động thử nghiệm tâm lý thần kinh Cambridge (CANTAB) hoặc đánh giá lâm sàng Sandoz-lão khoa (SCAG), thử nghiệm Stroop, tạo dấu vết, chiều dài Wechsler Digit, và thử nghiệm nhận thức CogState được điện toán. Ngoài ra, chức năng nhận thức có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật chụp ảnh như chụp X

quang phát pozitron (Positron Emission Tomography - PET), chụp cộng hưởng từ hạt nhân chức năng (functional magnetic resonance imaging - fMRI), chụp X quang phát photon đơn lẻ được tính toán (Single Photon Emission Computed Tomography - SPECT), hoặc kỹ thuật chụp ảnh bất kỳ khác cho phép xác định chức năng não.

I. Tổng quan

Sáng chế đề cập đến kháng thể 9E4 được làm giống như của người. Các kháng thể là hữu ích để điều trị và chẩn đoán bệnh do thể Lewy.

II. Phân tử đích

Alpha-synuclein thể đại của người là peptit có 140 axit amin có trình tự axit amin dưới đây:

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV GSKTKEGVVH
GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL
GKNEEGAPQE GILEDMPVDP DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA (SEQ ID NO.12)

(Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:11282-6).; Số truy nhập ngân hàng gen: P37840). Protein này có 3 vùng nhận biết, vùng lặp lại KTKE bao gồm các axit amin 1-61, vùng NAC (thành phần không chứa tinh bột) nằm trong khoảng từ axit amin 60 đến 95, và vùng axit có đầu tận cùng C nằm trong khoảng từ axit amin 98 đến 140.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, khi đề cập đến alpha-synuclein hoặc các mảnh của nó tức là bao gồm các trình tự axit amin thể đại của người nêu trên, và các biến thể alotyp của người của chúng, cụ thể là các dạng liên quan tới bệnh do thể Lewy (ví dụ, E46K, A30P và A53T, với chữ cái đầu tiên dùng để chỉ axit amin trong SEQ ID NO.12, chữ số là vị trí codon trong SEQ ID NO.12, và chữ cái thứ hai là axit amin trong biến thể alotyp). Các biến thể này có thể tùy ý có mặt riêng rẽ hoặc ở dạng kết hợp trong khía cạnh bất kỳ của sáng chế được mô tả dưới đây. Các đột biến được cảm ứng E83Q, A90V, A76T, làm gia tăng quá trình kết tụ alpha synuclein, cũng có thể có mặt riêng lẻ hoặc kết hợp với nhau và/hoặc các biến thể alotyp E46K, A30P và A53T người.

III. Bệnh do thể Lewy

Bệnh do thể Lewy (LBD) được đặc trưng bởi quá trình thoái biến hệ dopaminergic, biến đổi chức năng vận động, suy giảm nhận thức, và quá trình tạo ra các thể Lewy (LB). (McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24). Các thể Lewy là các mảng lắng đọng protein hình cầu tìm thấy được ở các tế bào thần kinh. Sự có mặt của chúng trong não làm phá vỡ chức năng bình thường của não, làm gián đoạn tác động của chất truyền thông tin hóa học bao gồm axetylcholin và dopamin. Bệnh do thể Lewy bao gồm bệnh Parkinson (bao gồm bệnh Parkinson tự phát), bệnh do thể Lewy lan tỏa (DLBD) còn được gọi là bệnh sa sút trí tuệ kèm theo thể Lewy (DLB), các dạng biến đổi của thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBV), bệnh Alzheimer và Parkinson kết hợp và bệnh teo đa hệ thống (MSA; ví dụ, teo trám cầu tiểu não, thoái hóa thể vân chất đen và hội chứng Shy-Drager). DLBD có cùng các triệu chứng của bệnh Alzheimer và bệnh Parkinson. DLBD khác với bệnh Parkinson chủ yếu ở vị trí của các thể Lewy. Trong các thể Lewy của DLBD chủ yếu tạo ra ở vỏ não. Ở bệnh Parkinson, chúng chủ yếu tạo ra ở vùng chất xám. Bệnh do thể Lewy khác bao gồm rối loạn thần kinh tự động đơn thuần, chứng nuốt khó thể Lewy, LBD ngẫu nhiên, và LBD có kế thừa (ví dụ, thoái biến gen alpha-synuclein, PARK3 và PARK4).

IV. Kháng thể theo sáng chế

A. Độ đặc hiệu gắn kết và hoạt tính

Các kháng thể được làm giống như của người theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với alpha synuclein của người. Ái lực của một số kháng thể được làm giống như của người (tức là K_a) tốt hơn là nằm trong hệ số 5 hoặc 2 so với ái lực của kháng thể 9E4 của chuột nhắt. Một số kháng thể được làm giống như của người có ái lực tương đương (trong khoảng sai số thử nghiệm) hoặc lớn hơn ái lực của kháng thể 9E4 của chuột nhắt. Tốt hơn là, các kháng thể được làm giống như của người gắn kết với cùng epitop và/hoặc cạnh tranh với kháng thể 9E4 của chuột nhắt để gắn kết với alpha synuclein của người.

Trong một số kháng thể, 9E4 được làm giống như của người tạo ra một nhánh của kháng thể đặc hiệu kép, nhánh còn lại của nó là kháng thể gắn kết với thụ thể được biểu hiện trên hàng rào máu não, như thụ thể insulin, thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự

insulin (an insulin-like growth factor - IGF), thụ thể leptin, hoặc thụ thể lipoprotein, hoặc tốt hơn là thụ thể transferrin (Friden et al., PNAS 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993). Kháng thể đặc hiệu kép có thể được chuyển qua hàng rào máu não bởi quá trình xuyên bào qua thụ thể. Khả năng hấp thu ở não của kháng thể đặc hiệu kép có thể còn được tăng lên bằng cách tạo ra kháng thể đặc hiệu kép để làm giảm ái lực của nó với thụ thể ở hàng rào máu não. Ái lực giảm đối với thụ thể làm mức phân bố ở não rộng hơn (ví dụ, xem, Atwal. et al. *Sci. Trans. Med.* **3**, 84ra43, 2011; Yu et al. *Sci. Trans. Med.* **3**, 84ra44, 2011).

Ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể là (1) kháng thể vùng biến đổi kép (dual-variable-domain antibody - DVD-Ig), trong đó mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng lần lượt chứa hai vùng biến đổi thông qua liên kết peptit ngắn (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, là thể dung hợp của hai kháng thể kép chuỗi đơn tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hóa trị bốn có hai vị trí liên kết đối với mỗi kháng nguyên đích; (3) kháng thể phức hợp, là dạng kết hợp của scFvs với kháng thể kép dẫn đến phân tử đa hóa trị; (4) phân tử được gọi là phân tử “cập bến và khóa”, dựa trên “vùng dime hóa và cặp bến” trong Protein kinase A, which, when được áp dụng to Fabs, can hiệu suất a trivalent đặc hiệu kép protein liên kết consisting hai identical Fab mảnhs được liên kết với a khác nhau Fab mảnh; (5) a cái gọi là Scorpion phân tử, bao gồm, ví dụ hai scFvs ngưng tụ với both termini of a người Fc-region. Ví dụ of platforms useful để điều chế kháng thể đặc hiệu kép bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab và Mab2 (F-star) , Fc-được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền IgG1 (Xencor) hoặc DuoBody (dựa trên trao đổi sợi Fab, Genmab).

B. Kháng thể được làm giống như của người

Kháng thể được làm giống như của người là kháng thể đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền trong đó các CDR từ kháng thể “cho” không phải người được ghép vào trình tự kháng thể “nhận” của người (ví dụ, xem, Queen et al., US5,530,101 và 5,585,089; Winter et al., US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557). Trình tự kháng thể nhận có thể là, ví dụ, trình tự vùng biến đổi kháng thể hoàn chỉnh của người, hỗn hợp của các trình tự này, trình tự liên ứng

củ trình tự kháng thể người (ví dụ, trình tự liên ứng vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của Kabat, 1991, nêu trên), hoặc vùng biến đổi trình tự dòng mầm phôi. Tốt hơn là, trình tự thể nhận đối với chuỗi nặng là vùng biến đổi hoàn chỉnh chuỗi nặng của người với mã truy nhập NCBI AAC50998 (GI: 1791009) hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh khác có nguồn gốc từ dòng mầm phôi IGHV3-7'01 hoặc IGHV3-7'02 (tên các dòng là V3-7 hoặc VH3-11) (Glas et al., Clin Exp Immunol. 107:372-80, 1997) hoặc trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh liên hợp với một trong số các trình tự dòng mầm phôi này. Đối với chuỗi nhẹ, tốt hơn nếu trình tự thể nhận là vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có mã truy nhập NCBI AAY33350 (GI:63102889) hoặc trình tự chuỗi nhẹ hoàn chỉnh khác có nguồn gốc từ dòng mầm phôi IGKV1D-39 hoặc IGKV1-39 (tên dòng O2 hoặc O12) (Kramer et al., Eur J Immunol. 35:2131-45, 2005) hoặc trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh liên hợp với một trong số các trình tự dòng mầm phôi này. Do vậy, kháng thể được làm giống như của người theo sáng chế là kháng thể có 3 chuỗi nhẹ và 3 chuỗi nặng CDR như được xác định theo Kabat từ kháng thể cho 9E4 và trình tự khung của vùng biến đổi hoàn chỉnh và vùng hằng định, nếu có mặt, toàn bộ hoặc về cơ bản là từ trình tự kháng thể người. Tương tự, chuỗi nặng được làm giống như của người là chuỗi nặng có 3 chuỗi nặng CDR như được xác định theo Kabat từ chuỗi nặng của kháng thể 9E4, và trình tự biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh và trình tự vùng hằng định chuỗi nặng, nếu có mặt, toàn bộ hoặc về cơ bản là từ trình tự chuỗi nặng kháng thể người. Tương tự, chuỗi nhẹ được làm giống như của người là chuỗi nhẹ có 3 chuỗi nhẹ CDR như được xác định theo Kabat từ chuỗi nhẹ của kháng thể 9E4, và trình tự biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh và trình tự vùng hằng định chuỗi nhẹ, nếu có mặt, toàn bộ hoặc về cơ bản là từ trình tự chuỗi nhẹ kháng thể người. Trình tự khung của vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuỗi kháng thể hoặc trình tự vùng hằng định của chuỗi kháng thể về cơ bản là lần lượt từ trình tự khung của miền biến đổi hoàn chỉnh của người hoặc trình tự vùng hằng định của người khi ít nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% gốc tương ứng đã được xác định theo Kabat là tương đồng.

Một số axit amin từ các gốc vùng khung vùng biến đổi hoàn chỉnh của người có thể được chọn để thay thế dựa trên ảnh hưởng của chúng trên cấu dạng CDR và/hoặc gắn kết với kháng nguyên. Nghiên cứu về các ảnh hưởng này được thể hiện trên mô hình, thử nghiệm các đặc tính của axit amin ở các vị trí cụ thể, hoặc quan sát theo kinh nghiệm về hiệu quả của việc thay thế hoặc tạo đột biến của các axit amin cụ thể.

Ví dụ, khi axit amin khác nhau giữa gốc vùng khung vùng biến đổi hoàn chỉnh của chuột và gốc vùng khung vùng biến đổi hoàn chỉnh đã chọn của người, thì axit amin khung của người có thể được thế bởi axit amin khung tương đương từ kháng thể chuột nhất khi mong muốn axit amin là: (1) gắn kết không cộng hoá trị với kháng nguyên trực tiếp, (2) liên kết với vùng CDR, (3) theo cách khác, tương tác với vùng CDR (ví dụ, trong khoảng 6 Å của vùng CDR), và (4) điều hòa tương tác giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Sáng chế đề cập đến dạng được làm giống như của người của kháng thể 9E4 của chuột nhất bao gồm 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được làm giống như của người (Hu9E4VLv1-v3; SEQ ID NOs:3-5) và 4 vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh được làm giống như của người (Hu9E4VHv1-v4; SEQ ID NOs:8-11). SEQ ID NO.4 chứa ba CDR Kabat của chuỗi nhẹ 9E4 của chuột nhất và khung vùng biến đổi hoàn chỉnh của AAY33350. SEQ ID NOS. 3 và 5 bao gồm các đột biến ngược như được thể hiện trong bảng 2. SEQ ID NO.11 chứa ba CDR Kabat của 9E4 chuột nhất và khung vùng biến đổi hoàn chỉnh của AAC50998. SEQ ID NO.8-10 bao gồm các đột biến ngược như được thể hiện trong bảng 3.

Sáng chế đề cập đến biến thể của kháng thể 9E4 được làm giống như của người trong đó vùng biến đổi hoàn chỉnh chuỗi nặng hoàn chỉnh được làm giống như của người có mức tương đồng trình tự ít nhất bằng 90%, 95% hoặc 99% so với SEQ ID NOs:8-11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được làm giống như của người có mức tương đồng ít nhất bằng 90, 95 hoặc 99% so với SEQ ID NOs:3-5, nhưng trong đó các biến thể bất kỳ từ SEQ ID NO.đã nêu xảy ra trong khung vùng biến đổi hoàn chỉnh chứ không phải là vùng CDR Kabat. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 được chiếm giữ bởi Y hoặc F, và/hoặc vị trí L83 được chiếm giữ bởi F hoặc L, và/hoặc vị trí H73 được chiếm giữ bởi N hoặc D và/hoặc vị trí H93 được chiếm giữ bởi A hoặc S (tất cả các vị trí ở đây, cũng như ở nơi khác, trong đơn này bằng cách đánh số thứ tự theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat). Trong một số kháng thể này, một số hoặc toàn bộ đột biến ngược trong Hu9E4VLv1-v3 và Hu9E4VHv1-v4 được giữ lại. Mặt khác, một hoặc cả hai vị trí H73 và H93 của chuỗi nặng lần lượt được chiếm giữ bởi D và A. Tương tự, trong một số kháng thể, một hoặc cả hai vị trí L36 và L83 của chuỗi nhẹ lần lượt được chiếm giữ bởi F và L. Trong một số kháng thể, 1, 2, 3 hoặc toàn bộ 4 vị trí H73, H93, L36 và L83 lần lượt được chiếm giữ bởi D, A, F và L. Trong một số kháng thể, 0, 1, hoặc 2 vị trí được biến

đổi trong khung vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh so với SEQ ID NO.11, và 0, 1, hoặc 2 vị trí được biến đổi trong khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh so với SEQ ID NO.4.

Một số kháng thể bao gồm chuỗi nặng được làm giống như của người chứa ba CDR Kabat có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và chuỗi nhẹ được làm giống như của người chứa ba CDR Kabat có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4 với điều kiện vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F hoặc Y và/hoặc vị trí L83 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi L hoặc F và/hoặc vị trí H73 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi D hoặc N, và/hoặc vị trí H93 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi S hoặc A. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F và vị trí L83 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi L. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F và vị trí H73 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi D. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F và vị trí H93 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi S. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F và vị trí H93 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi A. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F, vị trí L83 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi L, và vị trí H73 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi D. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F, vị trí L83 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi L, và vị trí H93 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi S. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F, vị trí L83 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi L, và vị trí H93 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi A. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F, vị trí H73 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi D, và vị trí H93 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi S. Trong một số kháng thể này, vị trí L36 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat) được chiếm giữ bởi F, vị trí L83 được chiếm giữ bởi F, vị trí H73 (theo

[illegible]

Y, vị trí L83 được chiếm giữ bởi F, vị trí H73 được chiếm giữ bởi N và vị trí H93 được chiếm giữ bởi S. Một số kháng thể đại diện có các gốc mong muốn ở các vị trí L36, L83, H73, và H93 và dạng kết hợp của chúng được đưa ra trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: Các kháng thể theo sáng chế có các gốc mong muốn ở các vị trí L36, L83, H73, và H93 (theo hệ thống đánh số thứ tự Kabat).

Kháng thể	L36	L83	H73	H93
1	F	F	N	A
2	F	L	N	A
3	F	F	D	A
4	F	F	N	S
5 (phiên bản 3)	F	L	D	A
6	F	L	N	S
7 (phiên bản 1)	F	F	D	S
8	F	L	D	S
9	Y	L	N	A
10	Y	L	D	A
11	Y	L	N	S
12	Y	L	D	S
13	Y	F	D	A
14	Y	F	D	S
15 (phiên bản 2)	Y	F	N	S

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.3. Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.3. Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5.

Việc thế axit amin khác có thể được thực hiện trong khung vùng biến đổi hoàn chỉnh, ví dụ, trong các gốc không tiếp xúc với các CDR. Thông thường, việc thay thế này được thực hiện trong trình tự biến đổi được làm giống như của người được bảo thủ đối với các axit amin đã thế. Trong một số kháng thể, việc thay thế so với Hu9E4VLv1-v3 và Hu9E4VHv1-v4 (chứa hoặc không được bảo thủ) không làm ảnh hưởng đáng kể tới ái lực gắn kết hoặc khả năng gắn kết của kháng thể thu được so với Hu9E4VLv1-v3 và Hu9E4VHv1-v4, tức là khả năng của nó để gắn kết với alpha synuclein của người.

Các biến thể thông thường khác nhau so với trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn chỉnh của Hu9E4VLv1-v3 và Hu9E4VHv1-v4 bởi một lượng nhỏ (ví dụ, thường không quá 1, 2, 3, 5 hoặc 10 biến thể trong khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc khung vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh, hoặc cả hai khung) các đoạn thể, xóa hoặc đoạn cài xen.

C. Chọn lọc vùng hằng định

Vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể được làm giống như của người có thể được liên kết với ít nhất một phần vùng hằng định của người. Việc chọn lọc vùng hằng định phụ thuộc, một phần, xem liệu độc tính tế bào phụ thuộc kháng thể, thực bào phụ thuộc kháng thể và/hoặc độc tính tế bào bổ sung có xảy ra hay không. Ví dụ, các chất đồng vị IgG1 và IgG3 của người có độc tính tế bào phụ thuộc bổ sung và các isotyp IgG2 và IgG4 của người không có độc tính này. IgG1 và IgG3 của người cũng gây cảm ứng chức năng cảm ứng qua trung gian tế bào mạnh hơn so với IgG2 và IgG4 của người. Vùng hằng định chuỗi nhẹ có thể là lambda hoặc kappa. Vùng hằng định kappa chuỗi nhẹ của người đại diện có trình tự axit amin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13. Một số vùng hằng định kappa chuỗi nhẹ này có thể được mã hóa bởi trình tự axit nucleic. Arginin có đầu tận cùng N có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13 có thể bị khuyết, trong trường hợp vùng hằng định kappa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.28. Một số vùng hằng định kappa chuỗi nhẹ này có thể được mã hóa bởi trình tự axit nucleic. Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người đại diện có trình tự axit amin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14 (chứa hoặc không chứa lysin ở đầu tận cùng C). Một số vùng hằng định chuỗi nặng này có thể được mã hóa bởi trình tự axit nucleic. Các kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng cấu trúc tứ phân chứa hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, là các chuỗi nặng, chuỗi nhẹ riêng biệt, như Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, hoặc dưới dạng kháng thể chuỗi đơn trong đó các vùng biến đổi hoàn chỉnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết qua vùng đệm.

Các vùng hằng định của người có biến thể allotyp và biến thể isotyp giữa các cá thể khác nhau, tức là các vùng hằng định này có thể khác nhau trong các cá thể khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí đa hình. Các isotyp khác nhau về các allotyp ở chỗ huyết thanh nhận biết isotyp sẽ gắn kết với vùng không đa hình của một hoặc nhiều isotyp khác. Do vậy, ví dụ, vùng hằng định chuỗi nặng khác là IgG1 G1m3 allotyp và có trình tự axit

amin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32. Vùng hằng định chuỗi nặng khác nữa có trình tự axit amin có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.32 chỉ khác là vùng này không chứa lysin ở đầu tận cùng C.

Một hoặc một vài axit amin ở đầu amino hoặc carboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng, như lysin ở đầu tận cùng C của chuỗi nặng, có thể bị thiếu hoặc có nguồn gốc từ một phần hoặc toàn bộ phân tử. Việc thế có thể được tiến hành trong vùng hằng định để làm giảm hoặc làm tăng chức năng cảm ứng như độc tính tế bào bổ sung hoặc ADCC (ví dụ, xem, Winter et al., Patent Mỹ số 5,624,821; Tso et al., Patent Mỹ số 5,834,597; và Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài thời gian bán thải ở người (ví dụ, xem, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Việc thế đại diện bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (việc đánh số EU được sử dụng trong đoạn này đối với vùng hằng định) để làm tăng thời gian bán thải của kháng thể. Việc thế ở vị trí bất kỳ hoặc toàn bộ các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 làm giảm ái lực đối với các thụ thể Fc γ , cụ thể là thụ thể Fc γ RI (ví dụ, xem, US 6,624,821). Một số kháng thể có alanin được thế ở các vị trí 234, 235 và 237 của IgG1 người để làm giảm chức năng cảm ứng. Tùy ý, các vị trí 234, 236 và/hoặc 237 trong IgG2 người được thế bằng alanin và vị trí 235 được thế bằng glutamin (ví dụ, xem, US 5,624,821).

D. Biểu hiện kháng thể tái tổ hợp

Các kháng thể có thể được sản sinh bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Axit nucleic mã hóa các kháng thể này có thể được tối ưu bộ ba mã hóa để biểu hiện trong loại tế bào mong muốn (ví dụ, CHO hoặc Sp2/0). Cấu trúc axit nucleic tái tổ hợp thường bao gồm trình tự đối chứng biểu hiện được liên kết điều khiển với trình tự mã hóa của chuỗi kháng thể, bao gồm vùng khởi đầu tự nhiên hoặc khác loại. Trình tự đối chứng biểu hiện có thể là vùng khởi đầu tận cùng của tế bào có nhân điển hình trong vector có khả năng biến nạp hoặc gây nhiễm tế bào đích có nhân điển hình. Ngay khi vector được đưa vào vật chủ thích hợp, vật chủ này được giữ trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện trình tự nucleotit ở nồng độ cao, và thu thập và tinh chế các kháng thể phản ứng chéo. Vector hoặc vector mã hóa chuỗi kháng thể có thể còn chứa gen dễ chọn lọc, như dihydrofolat reductaza, để khuếch đại nhiều bản sao của axit nucleic mã hóa các chuỗi kháng thể này.

E. coli là vật chủ nhân sơ, cụ thể được sử dụng để biểu hiện các kháng thể, cụ thể là các mảnh kháng thể. Vi khuẩn, như nấm men cũng thích hợp để biểu hiện. *Saccharomyces*, là vật chủ nấm men được ưu tiên, với vector thích hợp có trình tự đối chứng biểu hiện, điểm khởi đầu tái bản, trình tự kết thúc và các đặc tính tương tự nếu muốn. Vùng khởi đầu thường bao gồm 3-phosphoglyxerat kinaza và các enzym glycolytic khác. Vùng khởi đầu cảm ứng của nấm men bao gồm, trong số các gen khác, vùng khởi đầu từ dehydroaza rượu, isoxytochrom C, và enzyme đáp ứng với quá trình tiêu thụ maltoza và galactoza.

Các tế bào động vật có vú có thể được sử dụng để biểu hiện các đoạn nucleotit mã hóa globulin miễn dịch hoặc các mảnh của nó. Xem Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Nhiều dòng tế bào vật chủ thích hợp có khả năng tiết protein nguyên vẹn khác loại đã được phát triển trong lĩnh vực này, và bao gồm dòng tế bào CHO, các dòng tế bào COS khác nhau, tế bào HeLa, tế bào HEK293, tế bào L, và u tủy không sản sinh ra kháng thể bao gồm Sp2/0 và NS0. Có thể có lợi để sử dụng tế bào không phải là người. Các vector biểu hiện đối với các tế bào này có thể bao gồm trình tự đối chứng biểu hiện, như điểm khởi đầu tái bản, vùng khởi đầu, vùng tăng cường (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), và vị trí thông tin xử lý cần thiết, như vị trí liên kết ribosom, vị trí phân cắt ARN, vị trí polyadenyl hóa, và trình tự kết thúc phiên mã. Các trình tự đối chứng biểu hiện thích hợp là gen khởi đầu tận cùng có nguồn gốc từ gen nội sinh, xytomegalovirut, SV40, adenovirut, papilomvirut của bò, và các gen tương tự. Xem Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Khi đã chuyển vector mã hóa kháng thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ vào môi trường tế bào, thì các vốn tế bào có thể được sàng lọc để tái tạo quá trình phát triển và chất lượng sản phẩm trong môi trường không có huyết thanh. Các vốn tế bào tạo ra ở đầu sau đó có thể được tạo dòng tế bào đơn chứa FACS để tạo ra các đơn dòng. Tốt hơn nếu hiệu suất đặc hiệu là trên 50 pg hoặc 100 pg/tế bào/ngày, tương ứng với nồng độ sản phẩm lớn hơn 7,5 g/L môi trường. Các kháng thể được sản sinh bởi các dòng tế bào đơn cũng có thể được thử nghiệm về độ đục, đặc tính lọc, PAGE, IEF, quét UV, HP-SEC, sắp xếp carboyđrat-oligosacarit, quang phổ khối, và thử nghiệm gắn kết, như ELISA hoặc Biacore. Dòng đã chọn tiếp đó có thể được bổ sung vào nhiều lọ nhỏ và bảo quản đông lạnh để sử dụng tiếp theo.

Ngay khi được biểu hiện, các kháng thể có thể được tinh chế theo các phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực này, bao gồm bắt giữ protein A, cột sắc ký (ví dụ, tương tác kỵ nước hoặc trao đổi ion), giảm pH để bất hoạt virus và các phương pháp tương tự (xem tổng quan, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Phương pháp sản xuất các kháng thể trên thị trường bao gồm tối ưu hóa bộ ba mã hóa, chọn lọc vùng khởi đầu, đoạn phiên mã, và vùng kết thúc, tạo dòng tế bào đơn không chứa huyết thanh, thu gom tế bào, sử dụng chất đánh dấu chọn lọc để khuếch đại bản sao, vùng kết thúc CHO, tạo dòng tế bào đơn không chứa huyết thanh, cải thiện nồng độ protein (ví dụ, xem US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142, WO2005/019442, WO2008/107388, và WO2009/027471, và US 5,888,809).

V. Axit nucleic

Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ bất kỳ nêu trên. Thông thường, các axit nucleic cũng mã hóa peptit tín hiệu đã ngưng tụ với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn chỉnh (ví dụ, peptit tín hiệu có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22 và SEQ ID NO.24 có thể được mã hóa bởi axit nucleic có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.23 và SEQ ID NO.25). Các trình tự mã hóa trên axit nucleic có thể nằm trên liên kết điều khiển chứa trình tự điều hòa để đảm bảo việc biểu hiện trình tự mã hóa, như vùng khởi đầu, vùng tăng cường, vị trí gắn kết ribosom, tín hiệu kết thúc phiên mã và các yếu tố tương tự. Các axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể có mặt ở dạng riêng biệt hoặc có thể đã tạo dòng vào một hoặc nhiều vector. Các axit nucleic có thể được tổng hợp bằng cách, ví dụ, tổng hợp trạng thái rắn hoặc PCR oligonucleotit chồng lợp. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được nối với nhau dưới dạng một axit nucleic kế tiếp, ví dụ, nằm trong vector biểu hiện, hoặc có thể được tách riêng, ví dụ, mỗi axit nucleic đã tạo dòng vào chính vector biểu hiện của nó.

VI. Ứng dụng điều trị

Sáng chế mô tả một số phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa hiệu quả bệnh do thể Lewy ở đối tượng bị bệnh hoặc có nguy cơ mắc bệnh này. Đối tượng bị bệnh cần được điều trị bao gồm các cá thể có nguy cơ bị bệnh LBD nhưng không biểu hiện các

triệu chứng, cũng như đối tượng bị bệnh đã có các triệu chứng hoặc các dấu hiệu cảnh báo sớm của bệnh do lắng đọng bất thường synuclein, ví dụ, làm chậm EEG, các biểu hiện của bệnh thần kinh tâm thần (bệnh trầm cảm, bệnh sa sút trí tuệ, ảo giác, lo âu, lãnh đạm, mất khoái cảm), thay đổi tự phát (giảm huyết áp thể đứng, rối loạn bàng quang, chứng táo bón, đại tiện không tự chủ, tăng tiết nước bọt, chứng nuốt khó, rối loạn chức năng sinh dục, thay đổi khả năng lưu thông máu não), thay đổi cảm giác (khứu giác, đau, cảm nhận bất thường về khả năng phân biệt màu), rối loạn giấc ngủ (rối loạn biểu hiện ngủ REM (RBD), hội chứng chân không ngừng/rối loạn vận động các chi theo chu kỳ, chứng ngủ lịm, chứng mất ngủ) và các dấu hiệu kết hợp khác và các triệu chứng (mệt mỏi, chứng nhìn đôi, nhìn nhòe, tiết nhiều bã nhờn, giảm/tăng trọng lượng). Do đó, các phương pháp theo sáng chế có thể được dùng để phòng ngừa cho cá thể có yếu tố di truyền của bệnh LBD. Các cá thể này bao gồm những người đã từng mắc bệnh này, và những người có nguy cơ đã được xác định bằng cách phân tích chất đánh dấu di truyền hoặc sinh hóa. Các chất đánh dấu di truyền hướng tới PD bao gồm các đột biến ở gen alpha-synuclein hoặc Parkin, UCHLI, và CYP2D6; cụ thể là đột biến ở vị trí 30 và 53 của gen alpha-synuclein. Cá thể bị bệnh Parkinson có thể được nhận biết từ biểu hiện lâm sàng của nó bao gồm giảm tình trạng run, cơ cứng, chậm vận động và mất ổn định tư thế.

Ở đối tượng bị bệnh không có triệu chứng, việc điều trị có thể bắt đầu ở độ tuổi bất kỳ (ví dụ, 10, 20, 30). Thông thường, tuy nhiên, không cần thiết để bắt đầu việc điều trị cho đến khi đối tượng bị bệnh đạt độ tuổi 40, 50, 60 hoặc 70. Việc điều trị thường đòi hỏi dùng đa liệu trong một khoảng thời gian. Việc điều trị có thể được kiểm tra bằng cách thử nghiệm kháng thể, hoặc tế bào T hoặc tế bào B đã hoạt hóa đáp ứng với chất điều trị (ví dụ, dạng alpha-synuclein peptit đã cắt) theo thời gian. Nếu đáp ứng không đạt được, liều lượng tăng lên được chỉ định.

Các kháng thể có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa hiệu quả bệnh do thể Lewy ở đối tượng bị bệnh bằng cách dùng trong các điều kiện tạo ra đáp ứng điều trị thích hợp ở đối tượng bị bệnh (ví dụ, giảm mảng kết tụ viêm dây thần kinh và/hoặc alpha synuclein trên sợi trục, thuyên giảm chứng loạn dưỡng viêm dây thần kinh, cải thiện chức năng nhận thức, và/hoặc thay đổi, điều trị hoặc ngăn ngừa sự suy giảm nhận thức) ở đối tượng bị bệnh. Theo một số phương pháp, vùng bị chứng loạn dưỡng viêm dây thần kinh ở mạng lưới thần kinh của vỏ não mới và/hoặc hạch đáy não có thể được giảm trung bình

ít nhất 10%, 20%, 30%, hoặc 40% ở đối tượng bị bệnh được điều trị so sánh với nhóm đối chứng.

Khả năng suy giảm nhận thức, suy giảm tiến triển ở chức năng nhận thức, thay đổi hình thái não, và thay đổi chức năng mạch máu não thường quan sát được ở đối tượng bị bệnh mắc hoặc có nguy cơ bị bệnh do thể Lewy. Việc dùng các kháng thể theo sáng chế có thể ức chế hoặc làm chậm sự suy giảm chức năng nhận thức ở đối tượng bị bệnh này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp thay đổi hoặc làm tăng mật độ synap thần kinh và/hoặc mật độ tế bào hình cây. Chỉ số thay đổi mật độ synap thần kinh hoặc mật độ tế bào hình cây có thể được xác định bằng chất đánh dấu quá trình tạo ra synap (synaptophysin) và/hoặc các tế bào hình cây (MAP2). Theo một số phương pháp, mật độ synap thần kinh hoặc mật độ tế bào hình cây có thể được phục hồi tới mức của mật độ synap thần kinh hoặc tế bào hình cây giống ở người khỏe mạnh. Theo một số phương pháp, mức trung bình của mật độ synap thần kinh hoặc mật độ tế bào hình cây ở đối tượng bị bệnh được điều trị có thể tăng lên 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% hoặc cao hơn so với nhóm đối tượng bị bệnh đối chứng không được điều trị.

VII. Dược phẩm và phương pháp điều trị

Trong các ứng dụng phòng bệnh, kháng thể hoặc các chất cảm ứng kháng thể hoặc dược phẩm chứa nó được dùng cho đối tượng bị bệnh mắc cảm với, hoặc theo cách khác nguy cơ bị bệnh trong phác đồ (liều dùng, số lần dùng và đường dùng) hiệu quả để làm giảm nguy cơ, thuyên giảm mức độ trầm trọng, hoặc làm chậm sự khởi phát của ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh. Trong một số ứng dụng phòng bệnh, phác đồ dùng là hữu hiệu để ức chế hoặc làm chậm sự tích tụ của alpha synuclein và các mảnh đã cắt trong não, và/hoặc ức chế hoặc làm chậm tác dụng gây độc của nó và/hoặc ức chế/hoặc làm chậm quá trình phát triển của thiếu hụt hành vi. In các ứng dụng điều trị, kháng thể hoặc chất để cảm ứng kháng thể được dùng cho đối tượng bị bệnh nghi có, hoặc đã bị bệnh do thể Lewy trong phác đồ (liều dùng, số lần dùng đường dùng) hiệu quả để cải thiện hoặc ít nhất còn ức chế sự phá hủy của ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng bệnh. Trong một số ứng dụng điều trị, phác đồ dùng là hữu hiệu để làm giảm hoặc

ít nhất còn ức chế sự gia tăng nồng độ alpha synuclein và các mảnh đã cắt, các độc tố liên quan và/hoặc thiếu hụt hành vi.

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

Liều hữu hiệu thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm cách dùng, vị trí đích, tình trạng sinh lý của đối tượng bị bệnh bao gồm loại bệnh do thể Lewy, xem liệu đối tượng bị bệnh có phải là người mang ApoE, đối tượng bị bệnh là người hoặc động vật, thuốc khác được dùng, và xem việc điều trị là có tác dụng phòng ngừa hoặc điều trị hay không.

Khoảng liều đại diện đối với các kháng thể nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5 mg/kg, và thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3 mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 0,15 đến 2 mg/kg hoặc nằm trong khoảng từ 0,15 đến 1,5 mg/kg thể trọng của đối tượng bị bệnh. Kháng thể có thể được dùng các liều này hằng ngày, vào ngày khác, hàng tuần, hai tuần một lần, hàng tháng, hàng quý, hoặc theo liệu trình khác bất kỳ được xác định bằng cách phân tích theo kinh nghiệm. Việc điều trị đại diện cần dùng đa liều trong khoảng thời gian dài, ví dụ, ít nhất 6 tháng. Phác đồ điều trị bổ sung đại diện cần dùng một lần trong hai tuần hoặc một lần trong một tháng hoặc một lần trong 3 đến 6 tháng.

Các kháng thể có thể được dùng theo đường dùng ngoài (tức là đường dùng trong đó kháng thể đã dùng hoặc cảm ứng đi qua hàng rào máu não để tới vị trí xác định ở não. Các đường dùng bao gồm tại chỗ, tĩnh mạch, đường uống, dưới da, trong động mạch, trong sọ, trong vỏ, trong màng bụng (IP), qua mũi hoặc trong cơ. Một số đường dùng kháng thể là theo đường tĩnh mạch và dưới da. Vị trí tiêm hầu hết thường được thực hiện ở cơ tay hoặc cơ chân. Theo một số phương pháp, các chất được tiêm trực tiếp vào mô cụ thể trong đó các mảng lắng phủ đã được tích lũy, ví dụ, tiêm trong sọ.

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

Phác đồ theo sáng chế có thể được dùng kết hợp với chất khác có tác dụng trong điều trị hoặc phòng ngừa bệnh cần được điều trị. Ví dụ, trong trường hợp bệnh Parkinson, trị liệu miễn dịch đối với alpha synuclein WO/2008/103472, levodopa, chất chủ vận dopamin, chất ức chế COMT, chất ức chế MAO-B, amantadine, hoặc chất kháng cholinergic có thể được sử dụng kết hợp với phác đồ theo sáng chế.

VIII. Các ứng dụng khác

Các kháng thể nêu trên có thể được sử dụng để phát hiện alpha-synuclein trong chẩn đoán hoặc điều trị lâm sàng hoặc trong nghiên cứu. Các kháng thể cũng có thể được bán dưới dạng chất phản ứng nghiên cứu đối với nghiên cứu trong phòng thí nghiệm trong việc phát hiện các tế bào mang alpha-synuclein và đáp ứng của chúng với các kích thích khác nhau. Trong các ứng dụng này, kháng thể đơn dòng có thể được dán nhãn bằng phân tử phát huỳnh quang, phân tử dán nhãn quay, enzym hoặc isotyp phóng xạ, và có thể được tạo ra dưới dạng bộ kit chứa toàn bộ các chất phản ứng cần thiết để tiến hành thử nghiệm đối với alpha-synuclein. Các kháng thể cũng có thể được sử dụng để tinh chế alpha-synuclein, ví dụ, bằng cách sắc ký ái lực.

Các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện LB ở đối tượng bị bệnh. Các phương pháp này là hữu ích để chẩn đoán hoặc xác nhận việc chẩn đoán bệnh PD, hoặc các bệnh khác đi kèm với sự có mặt của LB trong não, hoặc độ nhạy của chúng. Ví dụ, các phương pháp có thể được sử dụng ở đối tượng bị bệnh có các triệu chứng của bệnh sa

sút trí tuệ. Nếu đối tượng bị bệnh mắc LB, thì đối tượng bị bệnh cũng mắc bệnh do thể Lewy, như bệnh Parkinson. Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng ở đối tượng bị bệnh không có triệu chứng. Sự có mặt của các thể Lewy hoặc mảng lắng phủ bất thường khác của alpha-synuclein chứng tỏ độ nhạy với bệnh có triệu chứng sau này. Các phương pháp cũng có tác dụng kiểm soát quá trình tiến triển bệnh và/hoặc đáp ứng với việc điều trị ở đối tượng bị bệnh đã được chẩn đoán mắc bệnh do thể Lewy trước đó.

Các phương pháp có thể được tiến hành bằng cách dùng kháng thể và sau đó phát hiện kháng thể sau khi nó đã gắn kết. Nếu mong muốn, đáp ứng loại bỏ có thể tránh được bằng cách sử dụng mảnh kháng thể không có vùng hằng định có chiều dài đầy đủ, như Fab. Theo một số phương pháp, kháng thể tương tự có thể dùng làm both chất phản ứng điều trị lẫn chẩn đoán.

Để chẩn đoán (ví dụ, chụp ảnh *in vivo*), các kháng thể có thể được dùng bằng cách tiêm tĩnh mạch vào cơ thể đối tượng bị bệnh, hoặc tiêm trực tiếp vào não bằng cách tiêm trong sọ hoặc bằng cách khoan lỗ trong sọ. Liều lượng của chất phản ứng cần nằm trong khoảng tương tự như đối với các phương pháp điều trị. Thông thường, kháng thể được dán nhãn, mặc dù theo một số phương pháp, kháng thể không được dán nhãn và chất dán nhãn thứ cấp được sử dụng để gắn kết với kháng thể. Việc chọn lọc nhãn tùy thuộc vào cách phát hiện. Ví dụ, nhãn phát huỳnh quang là thích hợp để phát hiện quang học. Việc sử dụng các nhãn thuận từ là thích hợp để phát hiện cắt lớp mà không cần can thiệp bằng phẫu thuật. Nhãn phóng xạ cũng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng PET hoặc SPECT.

Việc chẩn đoán được thực hiện bằng cách so sánh số lượng, kích cỡ và/hoặc cường độ khu vực đã dán nhãn so với các giá trị đường nền tương ứng. Các giá trị đường nền có thể là nồng độ trung bình của nhóm cá thể không mắc bệnh. Các giá trị đường nền cũng có thể là nồng độ đã xác định trước trên cùng đối tượng bị bệnh. Ví dụ, các giá trị đường nền có thể được xác định ở đối tượng bị bệnh trước khi bắt đầu điều trị, và các giá trị đã xác định sau đó được so sánh với các giá trị đường nền. Mức giảm của các giá trị so với đường nền chứng tỏ có đáp ứng tích cực với việc điều trị.

Các kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng idiotyp. (ví dụ, xem, Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5) :437-444, 1989; và Nissinoff, J. Immunol. 147:2429-

2438, 1991). Các kháng thể kháng idiotyp này có thể được sử dụng trong các nghiên cứu được động học, dược lực học, phân bố sinh học cũng như trong các nghiên cứu đáp ứng kháng thể người-kháng-người (anti-huma-anti antibody - HAHA) ở cá thể đã được điều trị bằng các kháng thể. Ví dụ, kháng thể kháng idiotyp gắn kết đặc hiệu vùng biến đổi của các kháng thể 9E4 được làm giống như của người và do đó có thể được sử dụng để phát hiện các kháng thể 9E4 được làm giống như của người trong nghiên cứu dược động học và hỗ trợ để định lượng đáp ứng kháng thể người-kháng-người (HAHA) ở cá thể đã được điều trị.

Toàn bộ các đơn sáng chế, trang web, các công bố khác, số truy cập và các tài liệu tương tự như nêu trên hoặc dưới đây được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn nhằm toàn bộ mục đích rộng trong cùng phạm vi vì nếu mỗi tài liệu riêng rẽ được biểu thị cụ thể và riêng biệt cần được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Nếu các dạng trình tự khác nhau có liên quan tới số truy cập ở các thời điểm khác nhau, các dạng này có liên quan tới số truy cập ở ngày nộp đơn thích hợp của đơn này là có ý nghĩa. Ngày nộp đơn thích hợp là ngày trước ngày nộp đơn thực tế hoặc ngày nộp đơn của đơn ưu tiên viện dẫn tới số truy nếu thích hợp. Tương tự nếu các dạng khác nhau của công bố đơn, trang web hoặc các tài liệu tương tự được công bố ở các thời điểm khác nhau, thì các dạng được công bố gần nhất ở ngày nộp đơn hữu hiệu của đơn là có nghĩa trừ khi có chỉ dẫn khác. Các đặc điểm, bước, yếu tố, phương án, hoặc khía cạnh bất kỳ của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với các dạng khác nếu không được chỉ định cụ thể theo cách khác. Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ nhằm mục đích làm rõ và hiểu rõ hơn, nhưng vẫn hiển nhiên hiểu được rằng một số biến đổi và cải biến nhất định có thể được tiến hành trong phạm vi của phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Thiết kế kháng thể 9E4 được làm giống như của người

Điểm khởi đầu hoặc kháng thể cho để làm tương thích với người là kháng thể 9E4 của chuột nhắt được sản sinh bởi tế bào lai có số truy cập ATCC PTA-8221 và được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 11/710,248 (số công bố US2009/0208487). Kappa biến đổi (Vκ) của 9E4 thuộc phân nhóm Kabat 1 của chuột nhắt tương ứng với phân nhóm Kabat 1 của người. Chuỗi nặng biến đổi (Vh) của 9E4 thuộc phân nhóm Kabat 3d

của chuột nhắt tương ứng với phân nhóm Kabat 3 của người (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991). Việc đánh số Kabat được sử dụng xuyên suốt trong Ví dụ này.

CDR-L1 ở gốc 17 thuộc lớp chính thống 3, CDR-L2 ở gốc 7 thuộc lớp 1, và CDR-L3 ở gốc 9 thuộc lớp 1 trong Vk (Martin & Thornton, J Mol Biol. 263:800-15, 1996). CDR-H1 ở gốc 5 thuộc lớp 1, và CDR-H2 ở gốc 17 thuộc lớp 2 (Martin & Thornton, J Mol Biol. 263:800-15, 1996). CDR-H3 không có các lớp chính thống, nhưng vòng gốc 7 có thể có bazơ thắt nút theo quy tắc của Shirai et al. (FEBS Lett. 455:188-97, 1999).

Nghiên cứu được tiến hành trên trình tự protein trên dữ liệu PDB (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005) để tìm ra cấu trúc sẽ tạo ra mô hình cấu trúc thô của 9E4. Cấu trúc tinh thể của kháng thể dimer X836 (pdb mã 3MBX) (Teplyakov et al., Mol Immunol., 47(14):2422-6, 2010) được chọn đối với cấu trúc Vk do nó có khả năng dung giải tốt (1,6Å) và toàn bộ trình tự tương đồng với 9E4 Vk, giữ lại được cùng cấu trúc chính thống đối với các vòng này. 1H3P (Pizarro et al., FEBS Lett. 509:463-8, 2001) được sử dụng đối với cấu trúc Vh. Nó có mức tương đồng trình tự toàn thể tốt và khả năng dung giải thích hợp (2,6Å), mà còn có cùng chiều dài CDR-H3 với bazơ thắt nút. Ngoài ra, các CDR-H1 và H2 có cùng cấu trúc chính thống giống như 9E4 Vh. DeepView/Swiss-PdbViewer 3,7 (SP5) (Guex and Peitsch, Electrophoresis 18: 2714-2723, 1997) được sử dụng để tạo ra mô hình cấu trúc.

Nghiên cứu dữ liệu trình tự protein không dư từ NCBI cho phép chọn lọc khung thích hợp của người để ghép vào các CDR của chuột. Đối với Vk, chuỗi nhẹ kappa của người có mã truy nhập NCBI AAY33350 (GI:63102889) (Kramer et al., Eur J Immunol. 35:2131-45, 2005) được chọn lọc. Nó có cùng các lớp chính thống đối với CDR-L2 và L3 giống như 9E4, và thuộc dòng mầm phôi IGKV1D-39 hoặc IGKV1-39 (tên dòng O2 hoặc O12) của người theo thỏa thuận IMGT. Nó là số của phân nhóm kappa Kabat 1 của người. Đối với Vh, chuỗi nặng Ig của người có mã truy nhập NCBI AAC50998 (GI:1791009) (Glas et al., Clin Exp Immunol. 107:372-80, 1997) được chọn lọc, cũng có cùng lớp chính thống giống như 9E4 và thuộc dòng mầm phôi IGHV3-7'01 hoặc IGHV3-7'02 (tên các dòng là V3-7 hoặc VH3-11) của người. Nó là số của phân nhóm chuỗi nặng Kabat 3 của người. Các vị trí dưới đây khác nhau giữa khung vùng biến đổi nhận của

người và khung vùng biến đổi cho của chuột nhất được xác định theo các chất dự tuyển để đột biến ngược. H73 nằm trên rìa của vị trí gắn kết kháng nguyên và tương tác với CDR-H2. H93 là gốc bề mặt chung nằm dưới các vòng CDR-H1 và H3. L36 là gốc bề mặt chung V_{κ}/V_{λ} . L83 nằm gần với vùng ổn định. Trong 9E4, L83 là leuxin, trong khi đó trong khung của người, L83 là axit amin dài hơn - phenylalanin.

Ba chuỗi nặng được làm giống như của người và 3 chuỗi nhẹ được làm giống như của người tạo ra được các đột biến ngược thống nhất ở các hoán vị khác nhau của các vị trí này (Các Fig.1A, B, trình tự sắp hàng, và các Bảng 2-3).

Bảng 2: Đột biến ngược V_H

Biến thể V_H	Trình tự thể nhận exon V_H	Gốc vùng khung thể cho
Hu9E4VHv1	Mã truy cập AAC50998	H73, H93
Hu9E4VHv2	Mã truy cập AAC50998	H93
Hu9E4VHv3	Mã truy cập AAC50998	H73

Bảng 3: Đột biến ngược V_L

Biến thể V_L	Trình tự thể nhận exon V_L	Gốc vùng khung thể cho
Hu9E4VLv1	Mã truy cập AAY33350	L36
Hu9E4VLv2	Mã truy cập AAY33350	Không
Hu9E4VLv3	Mã truy cập AAY33350	L36, L83

>9E4V κ Phiên bản 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLLYSSNQKNYLAWFQQKPGKAPKLLIY
WASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSYPLTFGGGGTKLEIK
(SEQ ID NO.3)

>9E4V κ Phiên bản 2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIY
WASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSYPLTFGGGGTKLEIK
(SEQ ID NO.4)

>9E4V κ Phiên bản 3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSIQTLLYSSNQKNYLAWFQQKPGKAPKLLIY
WASIRKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLATYYCQQYYSYPLTFGGGGTKLEIK
(SEQ ID NO.5)

>9E4vh Phiên bản 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASISSGG
 GSTYYPDNVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGAGIDYWGQGTLVTV
 SS (SEQ ID NO.8)

>9E4vh Phiên bản 2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASISSGG
 GSTYYPDNVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGGAGIDYWGQGTLVTV
 SS (SEQ ID NO.9)

>9E4vh Phiên bản 3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASISSGG
 GSTYYPDNVKGRFTISRDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGAGIDYWGQGTLVTV
 SS (SEQ ID NO.10)

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat đối với chuỗi nhẹ AAY33350 và chuỗi nặng AAC50998 được liệt kê ở dưới đây:

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat đối với chuỗi nhẹ AAY33350:

L1 D	L2 I	L3 Q	L4 M	L5 T	L6 Q	L7 S	L8 P	L9 S
L10 S	L11 L	L12 S	L13 A	L14 S	L15 V	L16 G	L17 D	L18 R
L19 V	L20 T	L21 I	L22 T	L23 C	L24 R	L25 A	L26 S	L27 Q
L28 S	L29 I	L30 S	L31 S	L32 Y	L33 L	L34 N	L35 W	L36 Y
L37 Q	L38 Q	L39 K	L40 P	L41 G	L42 K	L43 A	L44 P	L45 K
L46 L	L47 L	L48 I	L49 Y	L50 A	L51 A	L52 S	L53 S	L54 L
L55 Q	L56 S	L57 G	L58 V	L59 P	L60 S	L61 R	L62 F	L63 S
L64 G	L65 S	L66 G	L67 S	L68 G	L69 T	L70 D	L71 F	L72 T
L73 L	L74 T	L75 I	L76 S	L77 S	L78 L	L79 Q	L80 P	L81 E
L82 D	L83 F	L84 A	L85 T	L86 Y	L87 Y	L88 C	L89 Q	L90 Q
L91 S	L92 Y	L93 S	L94 T	L95 P	L96 L	L97 T	L98 F	L99 G
L100 G	L101 G	L102 T	L103 K	L104 L	L105 E	L106 I	L107 K	L108 -
L109 -	L110 -	L111 -						

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat đối với chuỗi nặng AAC50998:

H1 E	H2 V	H3 Q	H4 L	H5 V	H6 E	H7 S	H8 G	H9 G
H10 G	H11 L	H12 V	H13 Q	H14 P	H15 G	H16 G	H17 S	H18 L
H19 R	H20 L	H21 S	H22 C	H23 A	H24 A	H25 S	H26 G	H27 F
H28 T	H29 F	H30 S	H31 S	H32 Y	H33 W	H34 M	H35 S	H36 W
H37 V	H38 R	H39 Q	H40 A	H41 P	H42 G	H43 K	H44 G	H45 L
H46 E	H47 W	H48 V	H49 A	H50 N	H51 I	H52 K	H52A Q	H53 D

H54 G	H55 S	H56 E	H57 K	H58 Y	H59 Y	H60 V	H61 D	H62 S
H63 V	H64 K	H65 G	H66 R	H67 F	H68 T	H69 I	H70 S	H71 R
H72 D	H73 N	H74 A	H75 K	H76 N	H77 S	H78 L	H79 Y	H80 L
H81 Q	H82 M	H82A N	H82B S	H82C L	H83 R	H84 A	H85 E	H86 D
H87 T	H88 A	H89 V	H90 Y	H91 Y	H92 C	H93 A	H94 R	H95 G
H96 S	H97 S	H98 D	H99 M	H100 -	H101 D	H102 Y	H103 W	H104 G
H105 Q	H106 G	H107 T	H108 L	H109 V	H110 T	H111 V	H112 S	H113 S
H114 -								

Số thứ tự Kabat của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác có thể được xác định bằng cách sắp hàng với các gốc tương ứng có cùng số hoặc bằng cách sử dụng phần mềm có sẵn trên thị trường.

Bảng 4. Đánh số thứ tự Kabat của các gốc vùng khung được ưu tiên đối với đột biến ngược ở các kháng thể 9E4 được làm giống như của người

	Chuỗi nhẹ AAY33350	Chuỗi nặng AAC50998	Kháng thể 9E4 của chuột nhất	Kháng thể 9E4 v1 được làm giống như của người	Kháng thể 9E4 v2 được làm giống như của người	Kháng thể 9E4 v3 được làm giống như của người	Kháng thể 9E4 v4 được làm giống như của người (chuỗi nặng)
L36	Y	-	F	F	Y	F	-
L83	F	-	L	F	F	L	-
H73	-	N	D	D	N	D	N
H93	-	A	S	S	S	A	A

Ví dụ 2. Miễn dịch thụ động với kháng thể α -synuclein

Mục đích của thử nghiệm này là nhằm xác định hiệu lực của các kháng thể α -synuclein ở các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* cũng như thử nghiệm hành vi. Các tác giả sáng chế sử dụng α -synuclein chuyển gen (Dòng 61), α -synuclein bất hoạt và chuột nhắt cái kiểu hoang, 3-4 tháng tuổi được bắt đầu tận cùng Nghiên cứu và n=14/nhóm. Các kháng thể được thử nghiệm bao gồm 9E4 (IgG1, epitop: axit amin 118-126 của alpha synuclein), 5C1 (IgG1, epitop: axit amin 118-126 của alpha synuclein, liên kết c), 5D12, IgG2 (SN118-126), 1H7, IgG1 (SN 91-99) và kháng thể đối chứng IgG1 27-1. Chuột nhắt nhận liều lượng 10 mg/kg trong khoảng thời gian 5 tháng, với tổng số lần tiêm là 21. Ngoài ra, các con vật được tiêm lentivirus (LV) biểu hiện α -synuclein của người (khối lượng) bằng cách đưa α -synuclein của người (khối lượng) vào một bên đồi hải mã.

Dữ liệu kháng thể bao gồm dữ liệu thu được từ Chemicon (epitop: alpha synuclein có chiều dài đầy đủ), Millipore (epitop: alpha synuclein có chiều dài đầy đủ), và Neotope, ELADW 105 (epitop: axit amin 121-124 của alpha synuclein có chiều dài đầy đủ).

Chỉ tiêu lâm sàng: Các nồng độ kháng thể được xác định trong pha sống. Thử nghiệm hành vi bao gồm thử nghiệm mê cung nước Morris (MWW) và thử nghiệm tia theo chiều dọc. Thử nghiệm trên chòm D xoay tròn là thử nghiệm khả năng thăng bằng vận động, điều hòa và dáng đi được thực hiện bằng cách sử dụng hai xà có đường kính thay đổi. Xà A có đường kính lớn hơn (mức độ dễ hơn, được gọi là xà tập luyện) và xà D có đường kính nhỏ hơn (mức độ khó hơn, được gọi là xà thử nghiệm). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng “sai số” (số lần trượt/10cm) và “tốc độ” (thời gian cần để di chuyển 10cm/giây). Tính năng mê cung nước được tiến hành ở tuần 10 và khi kết thúc. Việc xác định bệnh thần kinh dưới đây được tiến hành: kết tụ alpha synuclein, synaptophysin, và MAP2. Việc xác định hóa sinh dưới đây được tiến hành: alpha synuclein, PSD95, synaptophysin. Việc dán đa nhãn và dán nhãn đồng tâm đã được tiến hành bằng cách sử dụng chất đánh dấu synap, noron và chất đánh dấu đệm.

Các kết quả chứng tỏ rằng toàn bộ các kháng thể, ngoại trừ 5D12, đã làm giảm đáng kể khả năng tích tụ α -syn và bảo thủ mật độ synap và tế bào hình cây, cũng như thu được kết quả tích cực về tính năng MWM. Kháng thể 9E4 có tác dụng trong các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* cũng như thử nghiệm hành vi. Thông tin chỉ ra rằng kháng thể có thể làm giảm mảng kết tụ synuclein thần kinh/axon alpha.

Kết quả hành vi: Kháng thể 9E4 cải thiện được tính năng mê cung nước trong chuột nhất chuyển gen α -synuclein (Các Fig.3-4). Trái lại, kháng thể 5D12 không làm cải thiện tính năng mê cung nước trong chuột nhất chuyển gen α -synuclein (Fig.4). Các kháng thể 9E4 và 1H7 cải thiện tính năng trên thử nghiệm xà như được xác định theo cả tốc độ lẫn sai số, trong khi đó các kháng thể 5D12 và 5C1 không làm cải thiện tính năng này (Fig.4).

Kết quả bệnh thần kinh: Các kháng thể 9E4, 1H7 và 5C1 làm giảm chứng loạn dưỡng viêm dây thần kinh ELADW-105 dương tính, trong khi đó kháng thể 5D12 không có tác dụng làm giảm này. Trong chuột nhất chuyển gen alpha synuclein, kháng thể 9E4 làm giảm diện tích mạng lưới thần kinh 43% trong vỏ não mới và 40% trong hạch đáy

não như được so sánh với nhóm đối chứng. Kháng thể 9E4 cũng bảo thủ được synaptophysin và MAP2 trong vỏ não mới và hạch đáy não.

Ví dụ 3. Miễn dịch kết tủa

Quá trình miễn dịch kết tủa được tiến hành để thử nghiệm khả năng liên kết của các phiên bản kháng thể 9E4 được làm giống như của người khác nhau hướng kháng nguyên của nó lấy từ mô bị bệnh (Fig.5). Dịch phân giải dễ tan Tris lấy từ bệnh sa sút trí tuệ ở não bị thể Lewy (150µg) được miễn dịch kết tủa với mỗi kháng thể đã định (5µg) bằng cách sử dụng hạt từ tính protein G (New England Biolabs). Các mẫu được rửa 5 lần bằng PBS/350 mM NaCl/0,5% NP-40, được lọc, và các mẫu thu được được phân giải bằng SDS-PAGE. Sau khi thấm, màng được ủ bằng Ab5038 (Millipore), kháng thể đa dòng phát hiện toàn bộ synuclein. Thử nghiệm này được lặp lại 3 lần để xác nhận độ chính xác.

Ví dụ 4. Thấm tách Western

Quá trình thấm tách Western synuclein tái tổ hợp của người với chuột nhắt, kháng thể khảm và các kháng thể 9E4 được làm giống như của người được thể hiện trên Fig.6. Đường cong pha loãng kháng thể là tương tự đối với kháng thể 9E4 được làm giống như của người và kháng thể khảm của chuột nhắt. Toàn bộ các kháng thể đã phát hiện dải ở 28 KDa và dải thứ hai ở 49 kDa. Dải 49 kDa có thể là multimer của synuclein.

Lượng đã định của synuclein kiểu hoang được biểu hiện người trên vi khuẩn, tái tổ hợp, được phân giải bằng SDS-PAGE, và đã thấm bằng cùng lượng của dạng 9E4 đã định. Sau khi rửa, kháng thể đa dòng của dê tương thích với loài được tiếp hợp với phân tử phát huỳnh quang IRDye-800 được dùng, và các điểm được rửa. Thời gian tiếp xúc là giống như đối với các kháng thể khác nhau.

Lưu trữ

Tế bào lai dưới đây được lưu trữ theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest với Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ (American Type Culture Collection) (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108) vào ngày được chỉ định. Việc lưu trữ này sẽ được giữ ở kho lưu trữ đã được cấp phép và được thay thế trong trường hợp đột biến, không

còn sống sót hoặc phân huỷ trong khoảng thời gian ít nhất 5 năm sau khi có yêu cầu sớm nhất để giải phóng mẫu bởi kho lưu trữ, trong thời gian ít nhất 30 năm sau ngày lưu trữ, hoặc trong thời gian còn hiệu lực của patent liên quan, tính theo thời gian dài nhất. Tất cả việc giới hạn về khả năng công bố các dòng tế bào này sẽ được loại bỏ bắt buộc khi patent được cấp bằng.

Kháng thể đơn dòng	Dòng tế bào	Epitop/ Độ đặc hiệu	Isotyp	Ngày lưu trữ	Số truy cập
9E4	JH17.9E4.3.37.1.14.2	các gốc alpha-synuclein 118-126	IgG1 κ	26 tháng 2 năm 2007	PTA-8221

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể chứa chuỗi nặng nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO. 10 hoặc SEQ ID NO. 8 và chuỗi nhẹ nhân tạo chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5, trong đó kháng thể này gắn kết với alpha-synuclein với ái lực tương đương hoặc lớn hơn ái lực của kháng thể được sản sinh bởi tế bào lai có số lưu trữ là ATCC PTA-8221, và trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoàn chỉnh được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ của người.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14 với điều kiện gốc lysin ở đầu tận cùng C có thể được loại bỏ; và vùng hằng định chuỗi nhẹ này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13.
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14 với điều kiện gốc lysin ở đầu tận cùng C có thể được loại bỏ; và vùng hằng định chuỗi nhẹ này có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.28.
4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này là vùng hằng định chuỗi nặng của isotyp IgG1 của người
5. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng nhân tạo và chuỗi nhẹ nhân tạo như nêu trong điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.
6. Axit nucleic theo điểm 5, trong đó axit nucleic này có trình tự như nêu trong trình tự bất kỳ SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.18 và SEQ ID NO.20.
7. Tế bào vật chủ chứa vectơ chứa axit nucleic theo điểm 5 hoặc 6.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED
 <120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI ALPHA-SYNUCLEIN, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY, VÀ TẾ BÀO VẬT CHỦ CHỨA VECTO CHỨA AXIT NUCLEIC NÀY
 <130> 057450/424859
 <150> 61/553,131
 <151> 2011-10-28
 <160> 32
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 1
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 Lys
 <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 2
 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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 3
 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 Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 4

```

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

```

Lys

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 5

```

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

```

Lys

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 6

```

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

```

Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

> 7

```

Glu Val Gln Leu Val 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
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
           50           55           60

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Ser Asp Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 8
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 8
 Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 9
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 11
 <211> 116

```

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 11
Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Tyr
 20           25           30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35           40           45
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85           90           95
Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100          105          110
Thr Val Ser Ser
 115
<210> 12
<211> 140
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 12
Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 1           5           10           15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
 20           25           30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35           40           45
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50           55           60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65           70           75           80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85           90           95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
 100          105          110
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115          120          125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130          135          140
<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 13
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1           5           10           15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20           25           30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35           40           45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50           55           60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65           70           75           80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85           90           95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100          105
<210> 14
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 14
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

```

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

<210> 15

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 15

```

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60
atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180
aagtcggcgg tgccctcccg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
atctcctccc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300
cccctgacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

```

<210> 16

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 16

```

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60
atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180
aagtcggcgg tgccctcccg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
atctcctccc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300
cccctgacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

```

<210> 17

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 17

```

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60
atcacctgca agtccatcca gaccctgctg tactcctcca accagaagaa ctacctggcc 120
tggttccagc agaagcccgg caaggccccc aagctgctga tctactgggc ctccatccgc 180
aagtcggcgg tgccctcccg cttctccggc tccggctccg gcaccgactt caccctgacc 240
atctcctccc tgcagcccga ggacttcgcc acctactact gccagcagta ctactcctac 300
cccctgacct tcggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

```

<210> 18

<211> 348

<212> ADN

```

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 18
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcgggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccgggctt caccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcgggctc cacctactac 180
cccgacaacg tgaaggggccg cttcaccatc tcccgcgacg acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcgggcggc 300
gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
<210> 19
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 19
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcgggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccgggctt caccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcgggctc cacctactac 180
cccgacaacg tgaaggggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcgggcggc 300
gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
<210> 20
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 20
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcgggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccgggctt caccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcgggctc cacctactac 180
cccgacaacg tgaaggggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcgggcggc 300
gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
<210> 21
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 21
gaggtgcagc tgggtggagtc cggcgggcggc ctggtgcagc ccggcgggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccgggctt caccttctcc aactacggca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctcctccg gcggcgggctc cacctactac 180
cccgacaacg tgaaggggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagatga actccctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgctc ccgcgggcggc 300
gccggcatcg actactgggg ccagggcacc ctggtgaccg tgtcctcc 348
<210> 22
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 22
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp
1 5 10 15
Val Ser Gly Ser Ser Gly
20
<210> 23
<211> 66
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 23
atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60
tccggc 66
<210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 24
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys

```

```

<210> 25
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 25
atggagttcg gcctgtcctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgc 57
<210> 26
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<220>
<221> Trình tự biến thể
<222> 42
<223> Xaa = Y hoặc F
<220>
<221> Trình tự biến thể
<222> 89
<223> Xaa = F hoặc L
<400> 26
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 Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Xaa Gln Gln Lys Pro Gly Lys
35 40 45
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys
<210> 27
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<220>
<221> Trình tự biến thể
<222> 74
<223> Xaa = N hoặc D
<220>
<221> Trình tự biến thể
<222> 97
<223> Xaa = A hoặc S
<400> 27
Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Xaa Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Xaa Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115
<210> 28
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 28
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

```

```

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

```

<210> 29

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 29

```

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

```

<210> 30

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 30

```

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

```

```

195          200          205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215
<210> 31
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 31
Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Tyr
20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100          105          110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115          120          125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130          135          140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145          150          155          160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165          170          175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180          185          190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195          200          205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210          215          220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225          230          235          240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245          250          255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260          265          270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr
275          280          285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290          295          300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305          310          315          320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325          330          335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340          345          350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355          360          365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370          375          380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385          390          395          400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405          410          415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420          425          430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435          440          445
<210> 32
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự tổng hợp
<400> 32
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35          40          45

```

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

Sắp thẳng hàng 9E4 VH

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
m9E4VH		E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	A	S	L	K	L
1791009		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHV1		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHV2		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHV3		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hu9E4VHV4		E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L
Hệ thống đánh số thứ tự Kabat		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
m9E4VH		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T
1791009		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHV1		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHV2		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHV3		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Hu9E4VHV4		S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	N	Y	G	M	S	W	V	R	Q	A
Hệ thống đánh số thứ tự Kabat		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59
m9E4VH		S	D	K	R	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
1791009		P	G	K	G	L	E	W	V	A	N	I	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y
Hu9E4VHV1		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
Hu9E4VHV2		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
Hu9E4VHV3		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y
Hu9E4VHV4		P	G	K	G	L	E	W	V	A	S	I	S	S	G	G	G	S	T	Y	Y

Fig.1

Sắp thẳng hàng 9E4 VH

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
m9E4VH	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	F	T	I	S	R	E	D	A	K	N	T	L	Y
1791009	<u>V</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y
Hu9E4VHv1	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	F	T	I	S	R	D	D	A	K	N	S	L	Y
Hu9E4VHv2	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y
Hu9E4VHv3	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	F	T	I	S	R	D	D	A	K	N	S	L	Y
Hu9E4VHv4	<u>P</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>G</u>	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y
Hệ thống đánh số thứ tự Kabat	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
m1H7VH	L	Q	M	S	S	L	R	S	E	D	T	A	L	Y	Y	C	S	R	G	G
1791009	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	S
Hu9E4VHv1	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	G	G
Hu9E4VHv2	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	G	G
Hu9E4VHv3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	G	G
Hu9E4VHv4	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	G
Hệ thống đánh số thứ tự Kabat	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114		
m9E4VH	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	-	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	-		
1791009	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>M</u>	-	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-		
Hu9E4VHv1	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	-	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-		
Hu9E4VHv2	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	-	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-		
Hu9E4VHv3	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	-	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-		
Hu9E4VHv4	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	-	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	-		

Fig.1 (tiếp theo)

Sắp thẳng hàng 9E4 VL

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat m9E4VL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
63102889	D	I	V	M	S	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	V	G	E	K	V	T
Hu9E4VLv1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu9E4VLv2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
Hu9E4VLv3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T

Hệ thống đánh
số thứ tự Kabat
m9E4VL

63102889	21	22	23	24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	27F	28	29	30	31	32	33	34
Hu9E4VLv1	M	S	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
Hu9E4VLv2	I	T	C	R	A	S	Q	-	-	-	-	-	-	S	I	S	S	Y	L	N
Hu9E4VLv3	I	T	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
	I	T	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
	I	T	C	K	S	I	Q	T	L	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A

Hệ thống đánh
số thứ tự Kabat
m9E4VL

63102889	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
Hu9E4VLv1	W	F	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R
Hu9E4VLv2	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L
Hu9E4VLv3	W	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R
	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R
	W	F	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R

Fig.2

Sắp thẳng hàng 9E4 VL

Hệ thống đánh số thứ tự Kabat		55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
m9E4VL		<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
63102889		<u>Q</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
Hu9E4VLv1		<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
Hu9E4VLv2		<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
Hu9E4VLv3		<u>K</u>	<u>S</u>	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
Hệ thống đánh số thứ tự Kabat		75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
m9E4VL		I	S	S	V	K	A	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
63102889		I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	S	T
Hu9E4VLv1		I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
Hu9E4VLv2		I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
Hu9E4VLv3		I	S	S	L	Q	P	E	D	L	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y
Hệ thống đánh số thứ tự Kabat		95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107							
m9E4VL		<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K							
63102889		<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K							
Hu9E4VLv1		<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K							
Hu9E4VLv2		<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K							
Hu9E4VLv3		<u>P</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K							

Fig.2 (tiếp theo)

Góc phần tư hiệu chỉnh

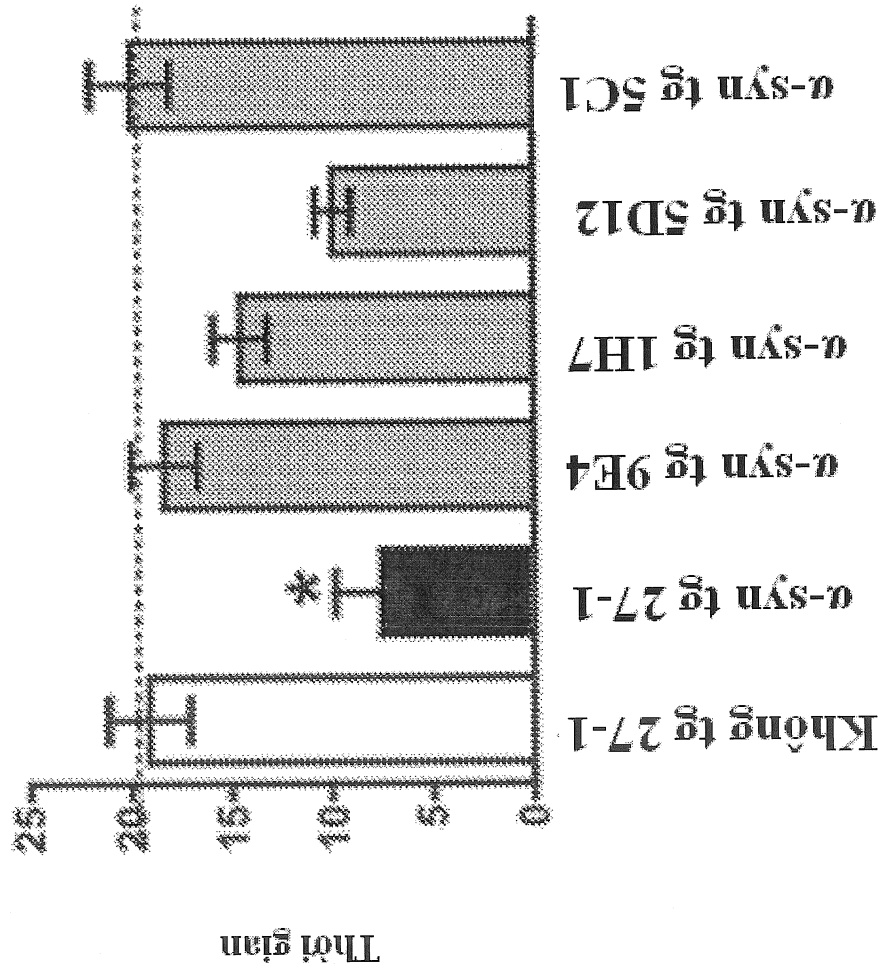
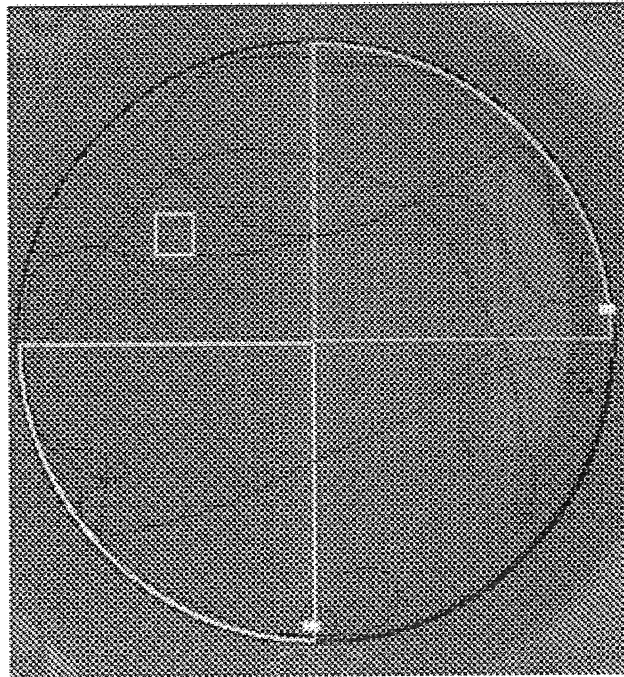


Fig.3



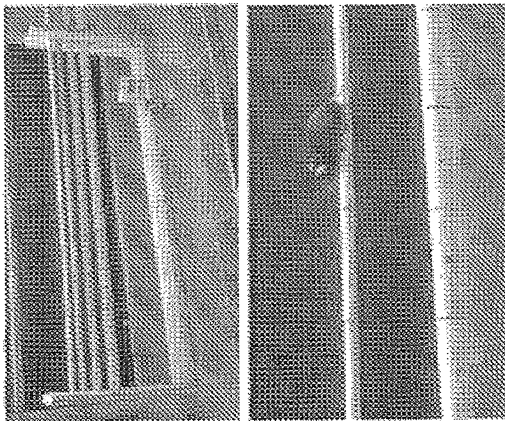
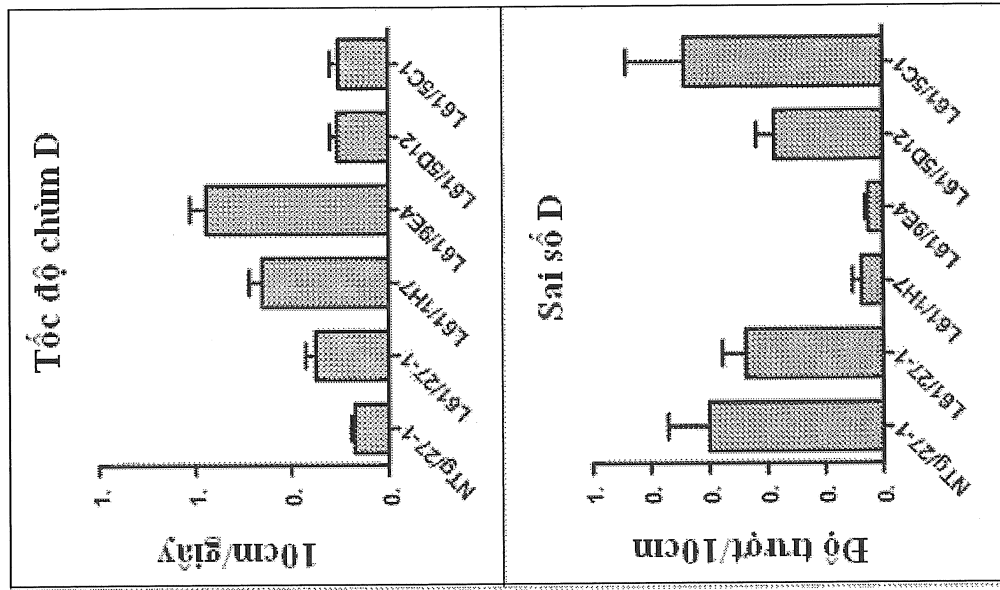


Fig.4

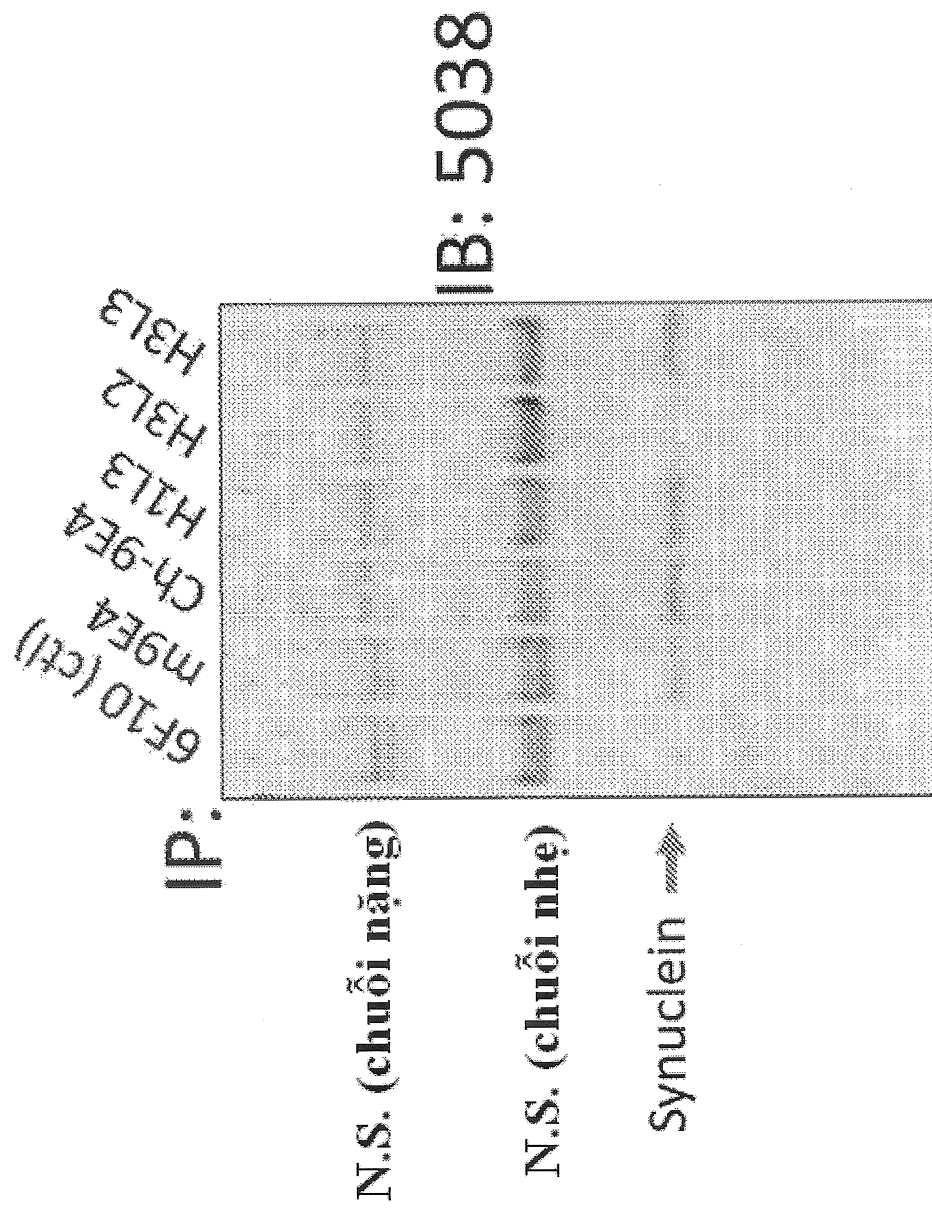


Fig.5

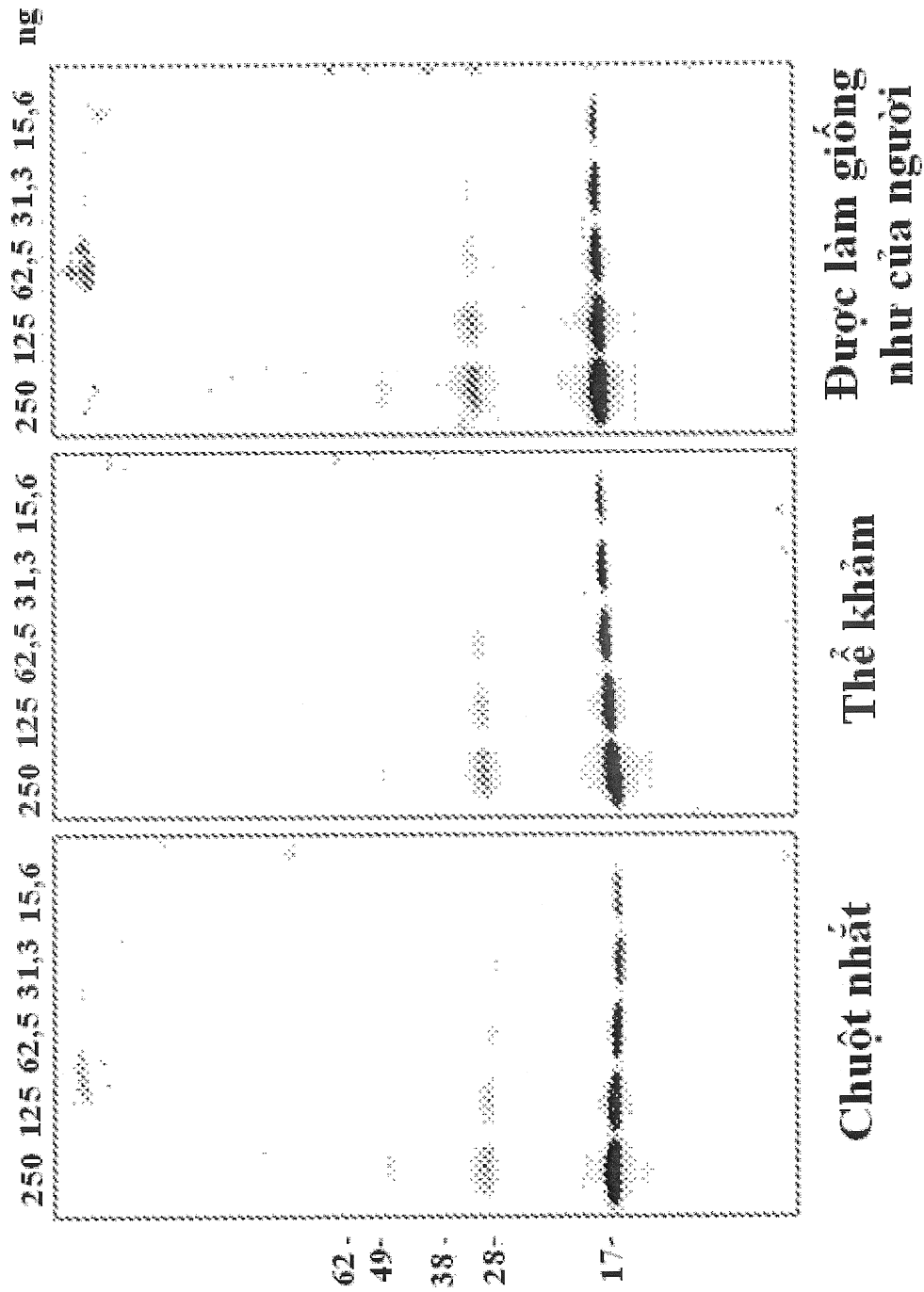


Fig.6