



- (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
(51)¹⁹ C07K 16/18; C12N 15/63; C12N 15/13; (13) B
C12N 1/15; C12N 1/19



1-0043308

-
- (21) 1-2019-06727 (22) 02/05/2018
(86) PCT/US2018/030739 02/05/2018 (87) WO 2018/204546 08/11/2018
(30) 62/500,427 02/05/2017 US; 62/580,408 01/11/2017 US
(45) 25/02/2025 443 (43) 25/06/2020 387
(73) PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (IE)
77 Sir John Rogerson's Quay, Block C, Grand Canal Docklands, Dublin 2, D02
T804, Ireland
(72) BARBOUR, Robin (US); ALEXANDER, Svetlana (US); RENZ, Mark E. (US);
GAI, Shuning (US); NIJJAR, Tarlochan S. (US); DOLAN, Philip James (US);
PAYNE, Philip (US).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

-
- (54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI TAU NGƯỜI, DUỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ
NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP IN VITRO ĐỂ LÀM CHO KHÁNG THỂ CHUỘT
TƯƠNG THÍCH VỚI NGƯỜI

(21) 1-2019-06727

(57) Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết đặc hiệu với tau. Các kháng thể này ức chế hoặc làm chậm các bệnh gây ra bởi tau và làm giảm các triệu chứng bị gây ra bởi tau. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa kháng thể này và phương pháp tạo ra kháng thể này.

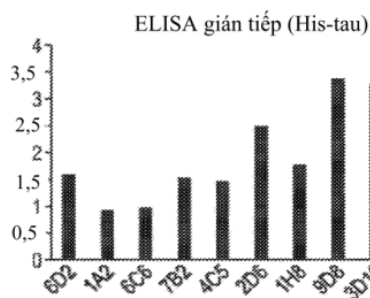


FIG. 1A

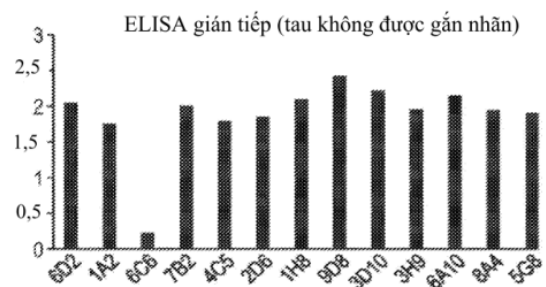


FIG. 1B

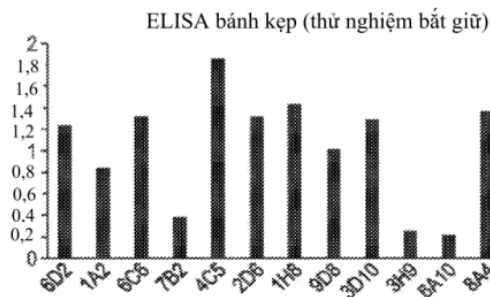


FIG. 1C

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu với tau. Các kháng thể này ức chế hoặc làm chậm các bệnh gây ra bởi tau và làm giảm các triệu chứng gây ra bởi tau.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tau là protein người đã được biết rõ có thể tồn tại ở các dạng được phosphoryl hóa (xem, ví dụ, Goedert, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4051-4055(1988); Goedert, EMBO J. 8:393-399(1989); Lee, Neuron 2:1615-1624(1989); Goedert, Neuron 3:519-526(1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633(1992). Tau đã được báo cáo là đóng vai trò trong việc ổn định các vi ống, cụ thể là ở hệ thần kinh trung ương. Tau toàn phần (t-tau, *nghĩa là*, dạng được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa) và phospho-tau (p-tau, *nghĩa là*, tau được phosphoryl hóa) được giải phóng bởi não đáp ứng với sự tổn thương neuron và thoái hóa thần kinh và đã được báo cáo là xảy ra với mức độ gia tăng trong CSF của bệnh nhân Alzheimer so với quần thể chung (Jack và đồng tác giả, Lancet Neurol 9:119–28 (2010)).

Tau là thành phần chính của đám rối thần kinh, mà cùng với các mảng là dấu hiệu xác nhận bệnh Alzheimer. Các đám rối tạo thành các sợi bất thường có đường kính 10 nm xuất hiện theo cặp được cuộn theo kiểu xoắn với chu kỳ ổn định là 80 nm. Tau nằm trong các đám rối thần kinh bị phosphoryl hóa bất thường (bị tăng phosphoryl hóa) với các nhóm phosphat được gắn vào các vị trí cụ thể trên phân tử. Sự liên quan chặt chẽ của các đám rối thần kinh được quan sát thấy trong các neuron lớp II của vỏ não khứu, các vùng CA1 và vùng nền của hồi hải mã, hạch hạnh nhân, và các lớp sâu hơn (lớp III, V, và mặt ngoài VI) của vỏ não mới ở bệnh Alzheimer. Tau bị phosphoryl hóa tăng cũng được báo cáo là cản trở sự lắp ráp vi ống, điều này có thể thúc đẩy sự phá vỡ mạng neuron.

Các thể vùi Tau là một phần của bệnh học thần kinh xác định của một số bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh liệt trên nhân tiền triển và bệnh Pick.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết đặc hiệu với tau. Một số kháng thể này cạnh tranh để gắn kết với tau người với kháng thể 5G8. Một số kháng thể này gắn kết với cùng một epitop trên tau người với 5G8.

Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 5G8, trong đó 5G8 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:8. Trong một số kháng thể, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:11, 12, và 13) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:14, 15, và 16).

Ví dụ, kháng thể này có thể là 5G8 hoặc dạng khảm, được ngụy trang, hoặc được làm tương thích với người của nó. Trong một số kháng thể này, chuỗi nặng biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người.

Một số kháng thể là kháng thể được làm tương thích với người. Một số kháng thể là kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hoặc khảm gắn kết đặc hiệu với tau người, trong đó 5G8 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:8. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 5G8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 5G8.

Trong một số kháng thể, các CDR có định nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, Tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Tổ hợp Kabat/Chothia của 5G8 (SEQ ID NO:11-13) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Tổ hợp Kabat/Chothia của 5G8 (SEQ ID NO:14-16). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của 5G8 (SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:12, và SEQ ID NO:13) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của 5G8 (SEQ ID NO:14-16). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba

CDR chuỗi nặng Chothia của 5G8 (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, và SEQ ID NO:13) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia của 5G8 (SEQ ID NO:14-16). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM của 5G8 (SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21, và SEQ ID NO:13)) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM của 5G8 (SEQ ID NO:14-16). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact của 5G8 (SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:22, và SEQ ID NO:23)) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact của 5G8 (SEQ ID NO:24-26).

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:33-40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:41-46.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị chiếm bởi P. Trong một số kháng thể, các vị trí H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi I, S, S, và P. Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị chiếm bởi P. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, I, S, S, và P.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H46 bị chiếm bởi D, H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị chiếm bởi P. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H46, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, D, I, S, S, và P. Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H19 bị chiếm bởi R, H20 bị chiếm bởi L, H46 bị chiếm bởi D, H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H76 bị chiếm bởi N, H80 bị chiếm bởi L, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị

chiếm bởi P. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S, và P.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H66 bị chiếm bởi R, H67 bị chiếm bởi V, và H78 bị chiếm bởi V. Trong một số kháng thể, các vị trí H66, H67, và H78 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, V, và V.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi Q hoặc E, H11 bị chiếm bởi V hoặc L, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H19 bị chiếm bởi K hoặc R, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H23 bị chiếm bởi K hoặc A, H46 bị chiếm bởi E hoặc D, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H66 bị chiếm bởi K hoặc R, H67 bị chiếm bởi A hoặc V, H71 bị chiếm bởi R hoặc S, H76 bị chiếm bởi S hoặc N, H78 bị chiếm bởi A hoặc V, H80 bị chiếm bởi M hoặc L, H93 bị chiếm bởi T, S, hoặc A, và H94 bị chiếm bởi I, P, hoặc R.

Trong một số kháng thể, các vị trí H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi I, S, S, và P. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, I, S, S, và P. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H46, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, D, I, S, S, và P. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S, và P. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S, và P. Trong một số kháng thể, các vị trí H66, H67, H78, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, V, V, A, và R. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, D, I, R, V, S, V, S, và P.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi V, L7 bị chiếm bởi S, L17 bị chiếm bởi E, L36 bị chiếm bởi L, L45 bị chiếm bởi Q, L46 bị chiếm bởi R, và L70 bị chiếm bởi D.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi V, L36 bị chiếm bởi L, và L46 bị chiếm bởi

R. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L36, và L46 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, và R. Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi V, L36 bị chiếm bởi L, L46 bị chiếm bởi R, và L70 bị chiếm bởi D. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L36, L46, và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, R, và D. Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L45 bị chiếm bởi Q và L70 bị chiếm bởi D. Trong một số kháng thể, các vị trí L45 và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi Q và D.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi I hoặc V, L7 bị chiếm bởi T hoặc S, L17 bị chiếm bởi Q hoặc E, L36 bị chiếm bởi Y hoặc L, L45 bị chiếm bởi K hoặc Q, L46 bị chiếm bởi L hoặc R, và L70 bị chiếm bởi G hoặc D.

Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L36, và L46 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, và R. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L36, L46, và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, R, và D. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L7, L17, L36, L46, và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, S, E, L, R, và D. Trong một số kháng thể, các vị trí L45 và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi Q và D. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L36, L45, L46, và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, Q, R, và D.

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:33-40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:41-46. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:33-40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:41-46.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:33-40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:41-46.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:45. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:46.

6

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:45. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:46.

7

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:45. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:46.

8

amin nêu trong SEQ ID NO:39 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:45. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:39 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:46.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:42. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:43. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:44. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:45. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:46.

Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 6A10, trong đó 6A10 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:63 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:64. Trong một số kháng thể, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:65, 66, và 67) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:68, 69, và 70).

Ví dụ, kháng thể này có thể là 6A10 hoặc dạng khảm, được ngụy trang, hoặc được làm tương thích với người của nó. Trong một số kháng thể, chuỗi nặng biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người.

Một số kháng thể là kháng thể được làm tương thích với người. Một số kháng thể là kháng thể 6A10 được làm tương thích với người hoặc khảm gắn kết đặc hiệu với tau

người, trong đó 6A10 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:63 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:64. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 6A10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 6A10.

Trong một số kháng thể, các CDR được định nghĩa là được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, Tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Tổ hợp Kabat/Chothia của 6A10 (SEQ ID NO:65-67) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Tổ hợp Kabat/Chothia của 6A10 (SEQ ID NO:68-70). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của 6A10 (SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:66, và SEQ ID NO:67) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của 6A10 (SEQ ID NO:68-70). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia của 6A10 (SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:74, và SEQ ID NO:67) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia của 6A10 (SEQ ID NO:68-70). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM của 6A10 (SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:75, và SEQ ID NO:67)) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM của 6A10 (SEQ ID NO:68-70). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact của 6A10 (SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:76, và SEQ ID NO:77)) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact của 6A10 (SEQ ID NO:78-80).

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:85-87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:88-90.

Trong một số kháng thể, vị trí H48 trong vùng VH bị chiếm bởi I.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H16 bị chiếm bởi A hoặc G, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H69 bị chiếm bởi T hoặc I, và H80 bị chiếm bởi M hoặc L.

Trong một số kháng thể, vị trí H48 trong vùng VH bị chiếm bởi I. Trong một số kháng thể, các vị trí H16, H48, H69, và H80 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi G, I, I, và L.

Trong một số kháng thể, L46 trong vùng VL bị chiếm bởi L.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi P hoặc S, L17 bị chiếm bởi Q hoặc E, và L46 bị chiếm bởi R hoặc L.

Trong một số kháng thể, vị trí L46 trong vùng VL bị chiếm bởi L. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L17, và L46 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, E, và L.

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:85-87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:88-90. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:85-87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:88-90.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:85-87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:88-90.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:88. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:89. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:90.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:88. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:89. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:90.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:88. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:89. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:87 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:90.

Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 8A4, trong đó 8A4 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:92. Trong một số kháng thể, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:93, 94, và 95) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:96, 97, và 98).

Ví dụ, kháng thể này có thể là 8A4 hoặc dạng khảm, được ngụy trang, hoặc được làm tương thích với người của nó. Trong một số kháng thể, chuỗi nặng biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người.

Một số kháng thể là kháng thể được làm tương thích với người. Một số kháng thể là kháng thể 8A4 được làm tương thích với người hoặc khảm gắn kết đặc hiệu với tau người, trong đó 8A4 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:92. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 8A4 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được

làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 8A4.

Trong một số kháng thể, các CDR được định nghĩa là được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, Tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Tổ hợp Kabat/Chothia của 8A4 (SEQ ID NO:93-95) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Tổ hợp Kabat/Chothia của 8A4 (SEQ ID NO:96-98). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của 8A4 (SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:94, và SEQ ID NO:95) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của 8A4 (SEQ ID NO:96-98). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia của 8A4 (SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:102, và SEQ ID NO:95) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia của 8A4 (SEQ ID NO:96-98). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM của 8A4 (SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:103, và SEQ ID NO:95)) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM của 8A4 (SEQ ID NO:96-98). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact của 8A4 (SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:104, và SEQ ID NO:105)) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact của 8A4 (SEQ ID NO:106-108).

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:113-115 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:116-118.

Trong một số kháng thể, vị trí H93 của vùng VH bị chiếm bởi S.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H16 bị chiếm bởi G, H20 bị chiếm bởi L, và H68 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H16, H20,

và H68 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, G, L, và T.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H16 bị chiếm bởi S hoặc G, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H67 bị chiếm bởi A hoặc I, H68 bị chiếm bởi N hoặc T, H85 bị chiếm bởi D hoặc E, và H93 bị chiếm bởi S hoặc A.

Trong một số kháng thể, vị trí H93 trong vùng VH bị chiếm bởi S. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H16, H20, H68, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, G, L, T, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H16, H20, H48, H67, H68, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, G, L, I, A, T, và E.

Trong một số kháng thể, vị trí L17 trong vùng VL bị chiếm bởi E.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi I hoặc V, L17 bị chiếm bởi Q hoặc E, và L36 bị chiếm bởi F hoặc L.

Trong một số kháng thể, vị trí L17 trong vùng VL bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L17, và L36 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, E, và L.

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:113-115 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:116-118.

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:113-115 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:116-118.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:113-115 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:116-118.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:113 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:116. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng

thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:113 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:117. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:113 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:118.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:114 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:116. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:114 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:117. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:114 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:118.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:115 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:116. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:115 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:117. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:115 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trường thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:118.

Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 7G6, trong đó 7G6 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:119 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:120. Trong một số kháng thể, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:121, 122, và 123) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:124, 125, và 126).

Ví dụ, kháng thể này có thể là 7G6 hoặc dạng khảm, được ngụy trang, hoặc được làm tương thích với người của nó. Trong một số kháng thể, chuỗi nặng biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người.

Một số kháng thể là kháng thể được làm tương thích với người. Một số kháng thể là kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hoặc khảm gắn kết đặc hiệu với tau

người, trong đó 7G6 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:119 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:120. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 7G6 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 7G6.

Trong một số kháng thể, các CDR được định nghĩa là được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, Tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Tổ hợp Kabat/Chothia của 7G6 (SEQ ID NO:121-123) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Tổ hợp Kabat/Chothia của 7G6 (SEQ ID NO:124-126). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của 7G6 (SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:122, và SEQ ID NO:123) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của 7G6 (SEQ ID NO:124-126). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia của 7G6 (SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:130, và SEQ ID NO:123) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia của 7G6 (SEQ ID NO:124-126). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM của 7G6 (SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:131, và SEQ ID NO:123) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM của 7G6 (SEQ ID NO:124-126). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact của 7G6 (SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:132, và SEQ ID NO:133)) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact của 7G6 (SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:135, và SEQ ID NO: 136).

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:139-140 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:141-148.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H20 bị chiếm bởi L, H69 bị chiếm bởi I, H76 bị chiếm bởi N, H78 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q, H92 bị chiếm bởi S, và H93 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93, H101 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, I, N, A, L, Q, S, và T.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H38 bị chiếm bởi R hoặc K, H69 bị chiếm bởi M hoặc I, H76 bị chiếm bởi S hoặc N, H78 bị chiếm bởi V hoặc A, H80 bị chiếm bởi M hoặc L, H81 bị chiếm bởi E hoặc Q, H92 bị chiếm bởi C hoặc S, và H93 bị chiếm bởi A hoặc T.

Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, I, N, A, L, Q, S, và T. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, K, I, N, A, L, Q, S, và T.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12 và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S và K.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L36 bị chiếm bởi L, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L36, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L37 bị chiếm bởi L, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L37, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L36 bị chiếm bởi L, L37 bị chiếm bởi L, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L36, L37,

và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, và K.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L45 bị chiếm bởi K, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L45, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, K, và K.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L100 bị chiếm bởi G, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L100, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, G, và K.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L36 bị chiếm bởi F hoặc L, L37 bị chiếm bởi Q hoặc L, L45 bị chiếm bởi R hoặc K, L100 bị chiếm bởi Q hoặc G.

Trong một số kháng thể, các vị trí L12 và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S và K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L37, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L36, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L36, L37, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, và K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L45, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, K, và K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L36, L37, L45, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, K, và K. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L100, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, G, và K, như trong hu7G6-VL_v7. Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L36, L37, L100, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, G, và K.

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:139-140 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:141-148. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:139-140 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:141-148.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:141. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:142. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:143. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:144. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:145. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:146. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:147. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:139 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:148.

19

NO:144. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:140 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:145. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:140 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:146. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:140 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:147. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:140 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:148.

Ví dụ, kháng thể này có thể là kháng thể khảm. Ví dụ, kháng thể này có thể là kháng thể được ngưng tụ. Kháng thể này có thể là kháng thể nguyên vẹn. Kháng thể này có thể là đoạn gắn kết. Trong một phương án, đoạn gắn kết này là kháng thể chuỗi đơn, Fab, hoặc đoạn Fab'2. Kháng thể này có thể là đoạn Fab, hoặc Fv chuỗi đơn. Một số kháng thể này có isotyp IgG1 người, trong khi các kháng thể khác có thể có isotyp IgG2 hoặc IgG4 của người.

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

Một số kháng thể có thể có ít nhất một đột biến trong vùng hằng định, như đột biến làm giảm sự cố định hoặc sự hoạt hóa bổ thể bởi vùng hằng định này, ví dụ, đột biến ở một hoặc nhiều trong số các vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 và 331 theo cách đánh số EU. Một số kháng thể có alanin ở các vị trí 318, 320 và 322.

Một số kháng thể có thể tinh khiết ít nhất là 95% khối lượng/khối lượng. Kháng thể này có thể được liên hợp với dược chất, chất gây độc tế bào, chất kìm hãm tế bào, chất dinh dưỡng thần kinh, hoặc chất bảo vệ thần kinh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả ở đây và chất mang dược dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả ở đây, vector biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic này và tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tương thích với người kháng thể không phải của người bất kỳ được mô tả ở đây, ví dụ, kháng thể chuột 5G8, trong đó 5G8 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:8. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tương thích với người kháng thể không phải của người bất kỳ được mô tả ở đây, ví dụ, kháng thể chuột 6A10, trong đó 6A10 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:63 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:64. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tương thích với người kháng thể không phải của người bất kỳ được mô tả ở đây, ví dụ, kháng thể chuột 8A4, trong đó 8A4 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:91 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:92. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tương thích với người kháng thể không phải của người bất kỳ được mô tả ở đây, ví dụ, kháng thể chuột 7G6, trong đó 7G6 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:119 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:120. Các phương pháp này có thể bao gồm chọn một hoặc nhiều kháng thể nhận, xác định các gốc axit amin của kháng thể chuột cần được giữ lại; tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nặng của chuột và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nhẹ kháng thể chuột, và biểu hiện các axit nucleic này trong tế bào chủ để sản sinh ra kháng thể được làm tương thích với người.

Các phương pháp sản sinh kháng thể, như kháng thể được làm tương thích với người, khảm hoặc được ngụy trang, ví dụ các dạng được làm tương thích với người, khảm hoặc được ngụy trang của 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6, cũng được đề xuất. Trong các phương pháp này, các tế bào được biến nạp bằng các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này được nuôi cấy để các tế bào này tiết ra kháng thể. Sau đó kháng thể này có thể được tinh chế từ môi trường nuôi cấy tế bào.

Các dòng tế bào sản sinh ra bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả ở đây có thể

được tạo ra bằng cách đưa vector mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể và gen đánh dấu chọn lọc được vào trong các tế bào; nhân giống các tế bào này trong các điều kiện để chọn lọc các tế bào có số lượng bản sao của vector này gia tăng, phân lập từng tế bào từ các tế bào đã chọn lọc; và tạo ngân hàng tế bào được tách dòng từ từng tế bào được chọn lọc dựa trên hiệu suất của kháng thể.

Một số tế bào có thể được nhân giống trong các điều kiện chọn lọc và được sàng lọc cho các dòng tế bào biểu hiện tự nhiên và tiết ra ít nhất là 100 mg/L/10⁶ tế bào/24 giờ. Từng tế bào có thể được phân lập từ các tế bào đã chọn lọc. Sau đó các tế bào đã tách dòng từ một tế bào đơn lẻ có thể được lập ngân hàng. Từng tế bào có thể được chọn lọc dựa vào các đặc điểm mong muốn, như hiệu suất của kháng thể này. Các dòng tế bào điển hình là các dòng tế bào biểu hiện 5G8.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ tau ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa tinh bột do tau, bao gồm sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây, nhờ đó ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ tau ở đối tượng này. Các kháng thể điển hình bao gồm các dạng được làm tương thích với người của 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6.

Cũng được đề xuất là các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến tau ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng phác đồ hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây và nhờ đó điều trị hoặc phòng ngừa bệnh này. Các ví dụ về bệnh này là bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Trong một số phương pháp, bệnh liên quan đến tau là bệnh Alzheimer. Trong một số phương pháp, bệnh nhân này là người mang ApoE4.

Cũng được đề xuất là các phương pháp làm giảm sự vận chuyển tau bất thường bao gồm bước sử dụng phác đồ hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây và nhờ đó làm giảm sự vận chuyển tau.

Cũng được đề xuất là các phương pháp cảm ứng hiện tượng thực bào tau bao gồm bước sử dụng phác đồ hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây và nhờ đó cảm ứng hiện tượng thực bào tau.

Cũng được đề xuất là phương pháp ức chế sự kết tụ hoặc lắng đọng tau bao gồm bước sử dụng phác đồ hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây nhờ đó ức chế sự kết tụ hoặc lắng đọng tau.

Cũng được đề xuất là phương pháp ức chế sự tạo thành các đám rối tau bao gồm bước sử dụng phác đồ hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện các lắng đọng protein tau ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh bị gây ra bởi sự kết tụ hoặc lắng đọng tau bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng thể được mô tả ở đây, và phát hiện kháng thể đã được gắn kết với tau ở đối tượng này. Các ví dụ về bệnh này là bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ura bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

Trong một số phương án kháng thể này được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch vào cơ thể của đối tượng. Trong một số phương án kháng thể này được sử dụng trực tiếp cho não của đối tượng bằng cách tiêm trong hộp sọ hoặc bằng cách khoan một lỗ qua hộp sọ của đối tượng. Trong một số phương án kháng thể này được đánh dấu. Trong một số phương án, kháng thể này được đánh dấu bằng nhãn huỳnh quang, nhãn thuận từ, hoặc nhãn hoạt động phóng xạ. Trong một số phương án nhãn hoạt động phóng xạ được phát hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật chụp positron cắt lớp (PET) hoặc kỹ thuật chụp cắt lớp vi tính phát xạ photon đơn (SPECT).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp đo hiệu quả điều trị ở đối tượng đang được điều trị bệnh bị gây ra bởi sự kết tụ hoặc lắng đọng tau, bao gồm bước đo mức lắng đọng protein tau thứ nhất ở đối tượng trước khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể được mô tả ở đây, và phát hiện lượng kháng thể thứ nhất đã gắn kết với tau ở đối tượng, sử dụng

phương pháp điều trị này cho đối tượng, đo mức lắng đọng protein tau thứ hai ở đối tượng này sau khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể này, và phát hiện kháng thể đã được gắn kết với tau ở đối tượng, trong đó sự giảm mức lắng đọng protein tau thể hiện đáp ứng tích cực với điều trị.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp đo hiệu quả điều trị ở đối tượng đang được điều trị bệnh bị gây ra bởi sự kết tụ hoặc lắng đọng tau, bao gồm bước đo mức lắng đọng protein tau thứ nhất ở đối tượng trước khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể được mô tả ở đây, và phát hiện lượng kháng thể thứ nhất đã gắn kết với tau ở đối tượng, sử dụng phương pháp điều trị này cho đối tượng, đo mức lắng đọng protein tau thứ hai ở đối tượng này sau khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể này, và phát hiện lượng kháng thể thứ hai đã được gắn kết với tau ở đối tượng này, trong đó sự không thay đổi mức lắng đọng protein tau hoặc sự tăng nhẹ các lắng đọng protein tau thể hiện đáp ứng tích cực với điều trị.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết đặc hiệu với peptit chứa các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết đặc hiệu với peptit chứa các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3.

Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với cả peptit chứa các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3 và peptit chứa các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết đặc hiệu với polypeptit của SEQ ID NO:3 ở epitop bao gồm ít nhất một gốc trong số các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3.

Một số kháng thể gắn kết với epitop nằm trong các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập gắn kết đặc hiệu với polypeptit của SEQ ID NO:3 ở epitop bao gồm ít nhất một gốc trong số các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3.

Một số kháng thể gắn kết với epitop nằm trong các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3.

Một số kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop bao gồm ít nhất một gốc từ 199-213 và 262-276 của SEQ ID NO:3.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến tau ở đối tượng bao gồm bước sử dụng kháng nguyên chứa peptit tau gồm đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 5G8, trong đó peptit này gây ra sự tạo thành kháng thể gắn kết đặc hiệu với tau ở đối tượng. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến tau ở đối tượng bao gồm bước sử dụng kháng nguyên chứa peptit tau gồm đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 6A10, trong đó peptit này gây ra sự tạo thành kháng thể gắn kết đặc hiệu với tau ở đối tượng. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến tau ở đối tượng bao gồm bước sử dụng kháng nguyên chứa peptit tau gồm đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 8A4, trong đó peptit này gây ra sự tạo thành kháng thể gắn kết đặc hiệu với tau ở đối tượng. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến tau ở đối tượng bao gồm bước sử dụng kháng nguyên chứa peptit tau gồm đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 7G6, trong đó peptit này gây ra sự tạo thành kháng thể gắn kết đặc hiệu với tau ở đối tượng. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến tau ở đối tượng bao gồm bước sử dụng kháng nguyên chứa peptit tau gồm đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 3D6, trong đó peptit này gây ra sự tạo thành kháng thể gắn kết đặc hiệu với tau ở đối tượng.

Trong một số phương pháp này, ít nhất hai trong số các kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, 7G6, và 3D6 gắn kết đặc hiệu với peptit tau.

Trong một số phương pháp này, epitop peptit tau bao gồm 4-11 axit amin liên tục từ các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3 hoặc từ các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3. Trong một số phương pháp này, epitop peptit tau bao gồm hai đoạn axit amin liên tục, một đoạn từ các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3, đoạn còn lại từ các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3, trong đó hai đoạn liên tục này cùng bao gồm 4-11 axit amin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A, Fig.1B, và Fig.1C mô tả kết quả của các thử nghiệm sàng lọc ELISA cho các kháng thể kháng tau đơn dòng của chuột đã chọn lọc.

Fig.2 mô tả động học liên kết cho các kháng thể kháng tau đơn dòng của chuột đã chọn lọc với tau người tái tổ hợp.

Fig.3 mô tả kết quả của các thử nghiệm phong bế chức năng cho các kháng thể kháng tau đơn dòng của chuột đã chọn lọc.

Fig.4 mô tả kết quả của các thử nghiệm chỉ ra rằng 5G8 bắt giữ miễn dịch tau từ mô bệnh Alzheimer của người.

Fig.5 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 của chuột, kháng thể nhận của người aDabi-Fab2b-VH, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 5G8 (hu5G8_VH-v1, hu5G8_VH-v2, hu5G8_VH-v3, hu5G8_VH-v4, hu5G8_VH-v5, hu5G8_VH-v6, hu5G8_VH-v7, hu5G8_VH-v8).

Fig.6 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 của chuột, kháng thể nhận của người aDabi-Fab2b-VL, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 5G8 (hu5G8-VL-v1, hu5G8-VL-v2, hu5G8-VL-v3, hu5G8-VL-v4, hu5G8-VL-v5, và hu5G8-VL-v6).

Fig.7 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 6A10 của chuột, kháng thể nhận của người ACR16112 VH, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 6A10 (hu6A10_VH-v1, hu6A10_VH-v2, và hu6A10_VH-v3).

Fig.8 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 6A10 của chuột, kháng thể nhận của người ABC66863 VL, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 6A10 (hu6A10VL-v1, hu6A10-VL-v2, và hu6A10-VL-v3).

Fig.9 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 8A4 của chuột, kháng thể nhận của người ADU57742 VH, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 8A4 (hu8A4_VH-v1, hu8A4_VH-v2, và hu8A4_VH-v3).

Fig.10 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 8A4 của chuột, kháng thể nhận của người ABA26100 VL, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 8A4 (hu8A4-v1, hu8A4-VL-v2, và hu8A4-VL-v3).

Fig.11 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 7G6 của chuột, kháng thể nhận của người 3U0T_VH, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 7G6 (hu7G6_VH-v1 và hu7G6_VH-v2).

Fig.12 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 của chuột, kháng thể nhận của người 3U0T_VL, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 7G6 (hu7G6-VL-v1, hu7G6-VL-v2, hu7G6-VL-v3, hu7G6-VL-v4,

hu7G6-VL-v5, hu7G6-VL-v6, hu7G6-VL-7, và hu7G6-VL-8).

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO:1 thể hiện trình tự axit amin của đồng dạng của tau người (Swiss-Prot P10636-8).

SEQ ID NO:2 thể hiện trình tự axit amin của đồng dạng của tau người (Swiss-Prot P10636-7).

SEQ ID NO:3 thể hiện trình tự axit amin của đồng dạng của tau người (Swiss-Prot P10636-6), (tau người 4R0N).

SEQ ID NO:4 thể hiện trình tự axit amin của một đồng dạng của tau người (Swiss-Prot P10636-5).

SEQ ID NO:5 thể hiện trình tự axit amin của đồng dạng của tau người (Swiss-Prot P10636-4).

SEQ ID NO:6 thể hiện trình tự axit amin của đồng dạng của tau người (Swiss-Prot P10636-2).

SEQ ID NO:7 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:8 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:9 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:10 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:11 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:12 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:13 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:14 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:15 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:16 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:17 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:18 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Chothia của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:19 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Contact của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:20 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Chothia của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:21 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 AbM của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:22 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Contact của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:23 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Contact của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:24 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Contact của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:25 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:26 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể 5G8 của chuột.

SEQ ID NO:27 thể hiện trình tự axit amin của trình tự mẫu của vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể kháng thể đậm độc 3F4 của chuột Acc. # 1CR9_H.

SEQ ID NO:28 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận Fab kháng dabigatran được làm tương thích với người aDabi-Fab2b-VH Acc. # 4YHM_H.

SEQ ID NO:29 thể hiện trình tự axit amin của trình tự dòng mầm của người IGHV1-46 Acc. # P01743.2.

SEQ ID NO:30 thể hiện trình tự axit amin của trình tự mẫu của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể kháng thể đậm đặc 3F4 của chuột Acc. # 1CR9_L.

SEQ ID NO:31 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận của người Fab kháng dabigatran được làm tương thích với người aDabi-Fab2b-VL Acc. # 4YHM_L.

SEQ ID NO:32 thể hiện trình tự axit amin của gen dòng mầm của người IGKV2-29 Acc. #A2NJV5.2.

SEQ ID NO:33 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_1.

SEQ ID NO:34 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_2.

SEQ ID NO:35 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_3.

SEQ ID NO:36 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_4.

SEQ ID NO:37 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_5.

SEQ ID NO:38 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_6.

SEQ ID NO:39 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_7.

SEQ ID NO:40 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VH_8.

SEQ ID NO:41 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VL_1.

SEQ ID NO:42 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VL_2.

SEQ ID NO:43 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VL_3.

SEQ ID NO:44 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VL_4.

SEQ ID NO:45 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VL_5.

SEQ ID NO:46 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người hu5G8-VL_6.

SEQ ID NO:47 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 5G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:48 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 5G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO 49 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 6A10 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:50 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 6A10 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:51 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 7G6 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:52 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:53 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 8A4 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:54 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 8A4 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:55 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:56 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:57 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:58 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:59 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:60 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:61 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:62 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:63 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:64 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:65 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:66 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:67 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:68 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:69 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:70 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:71 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:72 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Chothia của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:73 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Contact của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:74 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Chothia của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:75 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 AbM của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:76 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Contact của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:77 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Contact của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:78 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Contact của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:79 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:80 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:81 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận vùng biến đổi chuỗi nặng của người, số truy cập# ACR16112.

SEQ ID NO:82 thể hiện trình tự axit amin của trình tự dòng mầm của người IGHV1-2*02.

SEQ ID NO:83 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận của người của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa người, số truy cập# ABC66863.

SEQ ID NO:84 thể hiện trình tự axit amin của trình tự dòng mầm của người IGKV2-30*02.

SEQ ID NO:85 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 6A10 được làm tương thích với người hu6A10-VH_1.

SEQ ID NO:86 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 6A10 được làm tương thích với người hu6A10-VH_2.

SEQ ID NO:87 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 6A10 được làm tương thích với người hu6A10-VH_3.

SEQ ID NO:88 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 6A10 được làm tương thích với người hu6A10-VL_1.

SEQ ID NO:89 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 6A10 được làm tương thích với người hu6A10-VL_2.

SEQ ID NO:90 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 6A10 được làm tương thích với người hu6A10-VL_3.

SEQ ID NO:91 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:92 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:93 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:94 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:95 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:96 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:97 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:98 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:99 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:100 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Chothia của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:101 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Contact của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:102 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Chothia của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:103 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 AbM của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:104 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Contact của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:105 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Contact của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:106 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Contact của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:107 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:108 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể 8A4 của chuột.

SEQ ID NO:109 thể hiện trình tự axit amin của trình tự mẫu 3JAUVH.

SEQ ID NO:110 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận của vùng biến đổi chuỗi nặng của người, số truy cập# ADU57742:.

SEQ ID NO:111 thể hiện trình tự axit amin của trình tự mẫu 3JAUVL.

SEQ ID NO:112 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận của người của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa người, số truy cập# ABA26100.

SEQ ID NO:113 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 8A4 được làm tương thích với người hu8A4-VH_1.

SEQ ID NO:114 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 8A4 được làm tương thích với người hu8A4-VH_2.

SEQ ID NO:115 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 8A4 được làm tương thích với người hu8A4-VH_3.

SEQ ID NO:116 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 8A4 được làm tương thích với người hu8A4-VL_1.

SEQ ID NO:117 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 8A4 được làm tương thích với người hu8A4-VL_2.

SEQ ID NO:118 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 8A4 được làm tương thích với người hu8A4-VL_3.

SEQ ID NO:119 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:120 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:121 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:122 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:123 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:124 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:125 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:126 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:127 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:128 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Chothia của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:129 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Contact của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:130 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Chothia của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:131 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 AbM của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:132 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Contact của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:133 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Contact của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:134 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Contact của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:135 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:136 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể 7G6 của chuột.

SEQ ID NO:137 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận vùng biến đổi chuỗi nặng của người, số truy cập# PDB 3U0T_VH.

SEQ ID NO:138 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận của người của vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa người, số truy cập# PDB 3U0T_VL

SEQ ID NO:139 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VH_1.

SEQ ID NO:140 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VH_2.

SEQ ID NO:141 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_1.

SEQ ID NO:142 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_2.

SEQ ID NO:143 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_3.

SEQ ID NO:144 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_4.

SEQ ID NO:145 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_5.

SEQ ID NO:146 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_6

SEQ ID NO:147 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_7.

SEQ ID NO:148 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người hu7G6-VL_8.

SEQ ID NO:149 thể hiện trình tự axit amin của trình tự dòng mầm của người IGHV1-69-2*01.

Định nghĩa

Các kháng thể đơn dòng hoặc các thực thể sinh học khác thường được cung cấp ở dạng đã phân lập. Điều này có nghĩa là kháng thể hoặc thực thể sinh học khác thường tinh khiết ít nhất là 50% khối lượng/khối lượng đối với các protein nhiễu và các tạp chất khác sinh ra từ quá trình sản xuất hoặc tinh chế nó nhưng không loại trừ khả năng là kháng thể đơn dòng này được kết hợp với lượng dư (các) chất mang được dùng hoặc tá dược lỏng khác được dự định tạo thuận lợi cho việc sử dụng nó. Đôi khi, các kháng thể đơn dòng tinh khiết ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 99% khối lượng/khối lượng đối với protein nhiễu và các tạp chất từ quá trình sản xuất hoặc tinh chế. Thông thường, kháng thể đơn dòng đã phân lập hoặc thực thể sinh học khác là dạng đại phân tử chiếm ưu thế còn lại sau khi tinh chế nó.

Gắn kết đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên đích của nó có nghĩa là ái lực và/hoặc khả lực ít nhất là 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , hoặc 10^{12} M^{-1} . Gắn kết đặc hiệu là gắn kết mạnh hơn về cường độ có thể phát hiện được và phân biệt được với gắn kết không đặc hiệu xảy ra với ít nhất là một đích không liên quan. Gắn kết đặc hiệu có thể là kết quả của sự tạo thành các liên kết giữa các nhóm chức cụ thể hoặc sự ăn khớp đặc thù trong không gian (ví dụ, kiểu ổ khóa và chìa khóa) trong khi đó gắn kết không đặc hiệu thường là kết quả của lực van der Waals. Tuy nhiên gắn kết đặc hiệu không nhất thiết có nghĩa là kháng thể gắn kết với một và chỉ một đích.

Đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản là tetrame của các tiểu đơn vị. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu cùng-amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi chứa khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm về việc nhận biết kháng nguyên. Vùng biến đổi này ban đầu được biểu hiện gắn kết với peptit tín hiệu cắt được. Vùng biến đổi không có peptit tín hiệu đôi khi được gọi là vùng biến đổi trưởng thành. Vì vậy, ví dụ, vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ không có peptit tín hiệu chuỗi nhẹ. Phần đầu cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định chủ yếu chịu trách nhiệm về chức năng hiệu ứng.

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

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc nặng globulin miễn dịch (còn được gọi ở đây lần lượt là “miền biến đổi chuỗi nhẹ” (“miền VL”) hoặc “miền biến đổi chuỗi nặng” (“miền VH”)) chứa vùng “khung” bị gián đoạn bởi ba “vùng quyết định bổ sung” hoặc “CDR”. Các vùng khung có tác dụng sắp xếp thẳng hàng các CDR để gắn kết đặc hiệu với epitop của kháng nguyên. Các CDR này bao gồm các gốc axit amin của kháng thể mà chủ yếu chịu trách nhiệm về sự gắn kết kháng nguyên. Từ đầu amino đến đầu carboxyl, cả miền VL và VH đều chứa vùng khung (FR) và CDR sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và

FR4. Các CDR 1, 2, và 3 của miền VL còn được gọi ở đây lần lượt là CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3; các CDR 1, 2, và 3 của miền VH còn được gọi ở đây lần lượt là CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3. Khi sáng chế mô tả trình tự VL với R là gốc đầu cùng C, theo cách khác R có thể được xem là gốc đầu cùng N của vùng hằng định chuỗi nhẹ. Do đó, sáng chế cũng nên được hiểu là mô tả trình tự VL không có R đầu cùng C.

Việc chỉ định các axit amin vào mỗi miền VL và VH là phù hợp với định nghĩa thông thường bất kỳ về các CDR. Các định nghĩa thông thường bao gồm, định nghĩa Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 và 1991), định nghĩa Chothia (Chothia & Lesk, *J. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia và đồng tác giả, *Nature* 342:878-883, 1989); tổ hợp của CDR Chothia Kabat trong đó CDR-H1 là tổ hợp của các CDR Chothia và Kabat; định nghĩa AbM được sử dụng bởi phần mềm tạo mô hình kháng thể của Oxford Molecular; và, định nghĩa contact của Martin et al (bioinfo.org.uk/abs) (xem Bảng 1). Kabat cung cấp quy ước đánh số được sử dụng rộng rãi (cách đánh số Kabat) trong đó các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được đánh cùng một số. Khi kháng thể được cho là chứa các CDR theo một định nghĩa nhất định về CDR (ví dụ, Kabat), thì định nghĩa này xác định số lượng các gốc CDR tối thiểu có mặt trong kháng thể này (nghĩa là, các CDR Kabat). Không loại trừ là các gốc khác thuộc định nghĩa CDR thông thường khác nhưng nằm ngoài định nghĩa đã chỉ ra này cũng có mặt. Ví dụ, kháng thể chứa các CDR được xác định bởi Kabat bao gồm, trong số các khả năng có thể khác, kháng thể trong đó các CDR này chứa các gốc CDR Kabat và không chứa các gốc CDR khác, và kháng thể trong đó CDR H1 là CDR H1 tổ hợp Chothia-Kabat và các CDR khác chứa các gốc CDR Kabat và không chứa các gốc CDR bổ sung theo các định nghĩa khác.

Bảng 1:

Định nghĩa theo quy ước về CDR sử dụng cách đánh số Kabat

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36

Bảng 1:

Định nghĩa theo quy ước về CDR sử dụng cách đánh số Kabat

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

*CDR-H1 theo Chothia có thể kết thúc ở H32, H33, hoặc H34 (tùy theo độ dài của vòng). Đó là vì sơ đồ đánh số Kabat đặt các đột biến gần xen của gốc thêm vào ở 35A và 35B, trong khi đó cách đánh số Chothia đặt chúng ở 31A và 31B. Nếu cả H35A và H35B (đánh số Kabat) không có mặt, vòng CDR-H1 Chothia kết thúc ở H32. Nếu chỉ H35A có mặt, nó kết thúc ở H33. Nếu cả H35A và H35B có mặt, nó kết thúc ở H34.

Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các kháng thể nguyên vẹn và các đoạn gắn kết của chúng. Thông thường, các đoạn cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn mà chúng thu được từ đó để gắn kết đặc hiệu với đích bao gồm các chuỗi nặng riêng biệt, các chuỗi nhẹ riêng biệt Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂c, Dabs, thể nano, và Fv. Các đoạn có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách tách bằng enzym hoặc hóa học các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể được làm tương thích với người. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể hai chức năng là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau và hai vị trí gắn kết khác nhau (xem, ví dụ, Songvilai và Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny và đồng tác giả, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau này bao gồm cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ

5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 được làm tương thích với người và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ đặc hiệu với một epitop trên tau khác với epitop được gắn kết bởi 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6.

Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, một cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ là kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, hoặc kháng thể 7G6 được làm tương thích với người như được mô tả thêm dưới đây và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ còn lại là từ 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 (IGF), thụ thể leptin, hoặc thụ thể lipoprotein, hoặc thụ thể transferrin (Friden và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden và đồng tác giả, *Science* 259:373-377, 1993). Kháng thể đặc hiệu kép này có thể được vận chuyển qua hàng rào máu não bằng cơ chế xuyên bào qua trung gian thụ thể. Sự hấp thu kháng thể đặc hiệu kép ở não có thể còn được tăng cường bằng cách thao tác di truyền kháng thể đặc hiệu kép để làm giảm ái lực của nó với thụ thể hàng rào máu não. Ái lực với thụ thể này được làm giảm dẫn đến sự phân bố kháng thể này trong não rộng hơn (xem, ví dụ, Atwal. và đồng tác giả, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu và đồng tác giả, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

Các kháng thể đặc hiệu kép điển hình cũng có thể là: (1) kháng thể miền-biến đổi-kép (DVD-Ig), trong đó mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa hai miền biến đổi nối tiếp nhau qua liên kết peptit ngắn (Wu và đồng tác giả, *Generation và Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, mà là thể dung hợp của hai đime của đoạn globulin miễn dịch chuỗi đơn tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hóa trị bốn có hai vị trí gắn kết cho mỗi kháng nguyên đích; (3) thể linh hoạt, mà là sự kết hợp của các scFv với đime của đoạn globulin miễn dịch tạo ra phân tử đa hóa trị; (4) phân tử được gọi là phân tử “neo và khóa”, dựa trên “miền đime hóa và neo” ở Protein Kinaza A, mà khi được áp dụng cho các Fab, có thể tạo ra protein gắn kết đặc hiệu kép hóa trị ba chứa hai đoạn Fab giống nhau gắn kết với một đoạn Fab khác; hoặc (5) phân tử được gọi là Bộ cặp (Scorpion), chứa, ví dụ, hai scFv được dung hợp với cả hai đầu cùng của vùng Fc người. Ví dụ về các nền tảng hữu ích để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab và Mab2 (F-star), IgG1 được thao tác di truyền Fc (Xencor) hoặc DuoBody (dựa trên

sự trao đổi nhánh Fab, Genmab).

Thuật ngữ “epitop” dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà kháng thể gắn kết vào đó. Epitop có thể được tạo ra từ các axit amin liên kề hoặc các axit amin không liên kề được đặt cạnh nhau do sự gấp bậc ba của một hoặc nhiều protein. Các epitop được tạo ra từ các axit amin liên kề (còn được biết là epitop tuyến tính) thường vẫn giữ được khi tiếp xúc với các dung môi làm biến tính trong khi các epitop được tạo ra do sự gấp bậc ba (còn được biết là epitop cấu hình) thường bị mất đi khi xử lý bằng các dung môi làm biến tính. Epitop thường chứa ít nhất là 3, và phổ biến hơn, ít nhất là 5 hoặc 8-10 axit amin trong cấu hình không gian duy nhất. Các phương pháp xác định cấu hình không gian của epitop bao gồm, ví dụ, phương pháp tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. *Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols, trong Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)).*

Các kháng thể nhận biết cùng epitop hoặc các epitop gối lên nhau có thể được nhận diện trong thử nghiệm miễn dịch đơn giản chỉ ra khả năng cạnh tranh của một kháng thể với sự gắn kết của kháng thể khác vào kháng nguyên đích. Epitop của kháng thể cũng có thể được xác định bằng tinh thể học tia X của kháng thể đã gắn kết với kháng nguyên của nó để nhận diện các gốc tiếp xúc. Ngoài ra, hai kháng thể có cùng epitop nếu tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của một kháng thể cũng làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của kháng thể còn lại. Hai kháng thể có các epitop gối lên nhau nếu một số đột biến axit amin mà làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của một kháng thể cũng làm giảm hoặc làm mất khả năng gắn kết của kháng thể còn lại.

Sự cạnh tranh giữa các kháng thể được xác định bằng thử nghiệm trong đó một kháng thể đang được thử nghiệm ức chế sự gắn kết đặc hiệu của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên chung (*xem, ví dụ, Junghans và đồng tác giả, Cancer Res. 50:1495, 1990*). Kháng thể thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể tham chiếu nếu lượng dư kháng thể thử nghiệm (*ví dụ, ít nhất 2x, 5x, 10x, 20x hoặc 100x*) ức chế sự gắn kết của kháng thể tham chiếu ít nhất là 50% như được đo trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh. Một số kháng thể thử nghiệm ức chế sự gắn kết của kháng thể tham chiếu ít nhất là 75%, 90% hoặc 99%. Các kháng thể được nhận diện bởi thử nghiệm cạnh tranh (các kháng thể cạnh tranh) bao gồm các kháng thể gắn kết với cùng một epitop với kháng thể tham chiếu và các kháng thể

gắn kết với epitop liên kề đủ gần với epitop được gắn kết bởi kháng thể tham chiếu để xảy ra sự cản trở không gian.

Thuật ngữ “dược dụng” có nghĩa là chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất hỗ trợ là tương thích với các thành phần còn lại của chế phẩm này và gần như không độc với người nhận nó.

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

Cá thể có nguy cơ mắc bệnh tăng nếu đối tượng này có ít nhất là một yếu tố-nguy cơ đã biết (ví dụ, tiền sử di truyền, sinh hóa, gia đình, và tiếp xúc tình huống) đặt các cá thể có yếu tố nguy cơ đó vào nguy cơ phát triển bệnh cao hơn có ý nghĩa thống kê so với các cá thể không có yếu tố nguy cơ này.

Thuật ngữ “mẫu sinh học” dùng để chỉ mẫu chứa nguyên liệu sinh học nằm trong hoặc có thể thu được từ nguồn sinh học, ví dụ, người hoặc đối tượng là động vật có vú. Các mẫu này có thể là các cơ quan, các cơ quan bào, mô, các lát cắt mô, dịch cơ thể, máu ngoại vi, huyết tương máu, huyết thanh máu, tế bào, phân tử như protein và peptit, và các phần bất kỳ hoặc tổ hợp bất kỳ thu được từ chúng. Thuật ngữ mẫu sinh học cũng có thể bao gồm nguyên liệu bất kỳ thu được bằng cách xử lý mẫu này. Nguyên liệu thu được có thể bao gồm các tế bào hoặc dòng con của chúng. Phương pháp xử lý mẫu sinh học này có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số các bước lọc, chưng cất, chiết, cô đặc, cố định, bất hoạt các thành phần gây nhiễu, và tương tự.

Thuật ngữ “mẫu đối chứng” dùng để chỉ mẫu sinh học chưa biết hoặc bị nghi ngờ là chứa các vùng bị tác động bởi bệnh liên quan đến tau, hoặc ít nhất không được biết hoặc bị nghi ngờ là chứa các vùng bị bệnh thuộc loại đã đưa ra. Các mẫu đối chứng có thể thu được từ các cá thể không bị mắc bệnh liên quan đến tau. Ngoài ra, các mẫu đối chứng có thể thu được từ các bệnh nhân bị nhiễm bệnh liên quan đến tau. Các mẫu này có thể thu được cùng một lúc với mẫu sinh học được cho là mang bệnh liên quan đến tau hoặc vào một thời điểm khác. Mẫu sinh học và mẫu đối chứng có thể đều thu được từ cùng một mô. Tốt hơn là, các mẫu đối chứng chủ yếu chứa hoặc chứa hoàn toàn các vùng bình thường, khỏe mạnh và có thể được sử dụng để so sánh với mẫu sinh học được cho là chứa các vùng bị mắc bệnh liên quan đến tau. Tốt hơn là, mô trong mẫu đối chứng thuộc cùng một loại với mô trong mẫu sinh học. Tốt hơn là, các tế bào bị tác động bởi bệnh liên quan đến tau

được cho là nằm trong mẫu sinh học sinh ra từ cùng một loại tế bào (ví dụ, neuron hoặc tế bào thần kinh đệm) với loại tế bào trong mẫu đối chứng.

Thuật ngữ "bệnh" dùng để chỉ tình trạng bất thường bất kỳ làm suy yếu chức năng sinh lý. Thuật ngữ này được sử dụng rộng rãi để bao gồm rối loạn, mệt mỏi, sự bất thường, bệnh, ốm, tình trạng, hoặc hội chứng bất kỳ trong đó chức năng sinh lý bị suy giảm, bất kể bản chất của nguyên nhân.

Thuật ngữ "triệu chứng" đề cập đến bằng chứng chủ quan của bệnh, như đáng đi thay đổi, như được cảm nhận bởi đối tượng. "Dấu hiệu" đề cập đến bằng chứng khách quan của bệnh như được quan sát bởi bác sỹ điều trị.

Thuật ngữ "đáp ứng tích cực với điều trị" đề cập đến đáp ứng ở một bệnh nhân đơn lẻ hoặc đáp ứng trung bình trong một quần thể bệnh nhân tốt hơn so với đáp ứng trung bình trong quần thể đối chứng không nhận được điều trị.

Để phân loại các axit amin thay thế là bảo tồn hay không bảo tồn, các axit amin được chia thành các nhóm sau: Nhóm I (các chuỗi bên kỵ nước): met, ala, val, leu, ile; Nhóm II (các chuỗi bên trung tính ưa nước): xys, ser, thr; Nhóm III (các chuỗi bên axit): asp, glu; Nhóm IV (các chuỗi bên bazơ): asn, gln, his, lys, arg; Nhóm V (các gốc ảnh hưởng đến hướng của chuỗi): gly, pro; và Nhóm VI (các chuỗi bên thơm): trp, tyr, phe. Sự thể bảo tồn bao gồm sự thay thế giữa các axit amin trong cùng một nhóm. Sự thể không bảo tồn là sự thay thế thành viên của một trong các nhóm này cho một thành viên thuộc nhóm khác.

Tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự được xác định bằng các trình tự kháng thể được bắt cặp tối đa theo quy ước đánh số Kabat. Sau khi bắt cặp, nếu vùng kháng thể cần quan tâm (ví dụ, toàn bộ vùng biến đổi trưởng thành của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) đang được so sánh với cùng một vùng của kháng thể tham chiếu, thì tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự giữa vùng kháng thể cần quan tâm và vùng kháng thể tham chiếu là số lượng các vị trí bị chiếm bởi cùng một axit amin ở cả vùng kháng thể cần quan tâm và vùng kháng thể tham chiếu chia cho tổng số vị trí bắt cặp của hai vùng này, không tính các khoảng trống, nhân với 100 để chuyển thành tỷ lệ phần trăm.

Các chế phẩm hoặc phương pháp "chứa" hoặc "bao gồm" một hoặc nhiều thành phần đã đề cập có thể bao gồm các thành phần khác mà chưa được đề cập cụ thể. Ví dụ, chế phẩm "chứa" hoặc "bao gồm" kháng thể có thể chứa một mình kháng thể này hoặc kết

hợp với các thành phần khác.

Ký hiệu khoảng giá trị bao gồm tất cả các số nguyên nằm trong hoặc xác định khoảng này, và tất cả các khoảng con được xác định bởi các số nguyên nằm trong khoảng này.

[0002] Trừ khi ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng, thuật ngữ “khoảng” bao gồm các biến đổi không đáng kể, như các giá trị nằm trong biên sai số chuẩn của phép đo (ví dụ, SEM) của giá trị đã cho.

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

Dạng số ít của đối tượng “một” (“a”, “an,” và “the”) cũng bao gồm cả số nhiều trừ khi có quy định khác một cách rõ ràng. Ví dụ, thuật ngữ “hợp chất” hoặc “ít nhất là một hợp chất” có thể bao gồm nhiều hợp chất, bao gồm các hỗn hợp của chúng.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Tổng quan

Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết đặc hiệu với tau. Một số tính đặc hiệu gắn kết được lấy làm ví dụ của các kháng thể theo sáng chế được đặc trưng bởi sự gắn kết đặc hiệu với peptit chứa các gốc 199-213 hoặc peptit chứa các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc 257-271 hoặc 320-334, của SEQ ID NO:1), hoặc với cả hai peptit. Các kháng thể điển hình theo sáng chế là 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6. Một số kháng thể gắn kết với epitop bao gồm ít nhất một gốc từ các gốc 199-213 hoặc ít nhất một gốc từ các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3 hoặc cả hai. Một số kháng thể gắn kết với epitop trong đó tất cả các gốc của epitop này nằm trong số các gốc 119-213 hoặc các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3 hoặc cả hai. Một số kháng thể gắn kết với epitop được tạo ra từ các axit amin trong số các gốc 199-213 và 262-276 của SEQ ID NO:3. Một số kháng thể gắn kết với epitop nằm trong số các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3 hoặc với các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3. Một số kháng thể gắn kết với tau bất kể trạng thái phosphoryl hóa. Một số kháng thể ức chế hoặc làm chậm các bệnh gây ra bởi tau và làm giảm các triệu chứng bị gây ra bởi tau. Mặc dù không cần thiết phải hiểu cơ chế để thực hành sáng chế, sự giảm độc tính có thể xảy ra do kháng thể này cảm ứng hiện tượng thực bào tau, ức chế tau kết tụ trong phân tử hoặc giữa các phân tử, hoặc ức chế sự gắn kết với các phân tử khác, bằng cách làm ổn định cấu hình không gây độc, bằng cách ức chế sự truyền các dạng tau gây

bệnh trong tế bào hoặc giữa các tế bào, bằng cách phong bế sự phosphoryl hóa Tau, bằng cách ngăn cản sự gắn kết của tau với các tế bào, hoặc bằng cách cảm ứng sự cắt phân giải protein tau, trong số các cơ chế khác. Các kháng thể theo sáng chế hoặc các chất cảm ứng các kháng thể này có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác bị gây ra bởi tau.

II. Các phân tử đích

Trừ khi ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng, việc đề cập đến tau có nghĩa là dạng tau tự nhiên của người bao gồm tất cả các đồng dạng bất kể biến đổi sau dịch mã (*ví dụ*, phosphoryl hóa, đường hóa, hoặc axetyl hóa) có mặt hay không. Có sáu đồng dạng chính (các biến thể cắt) của tau xuất hiện trong não người. Đồng dạng dài nhất trong số các biến thể này có 441 axit amin, trong đó gốc met ban đầu bị cắt đi. Các gốc được đánh số theo đồng dạng 441 này. Do đó, ví dụ, việc đề cập đến phosphoryl hóa ở vị trí 404 có nghĩa là vị trí 404 của đồng dạng 441, hoặc vị trí tương ứng của đồng dạng khác bất kỳ khi được bắt cặp tối đa với đồng dạng 441. Các trình tự axit amin của các đồng dạng và các số Swiss-Prot được chỉ ra dưới đây.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

```

10    20    30    40    50    60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70    80    90   100   110   120
SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
130   140   150   160   170   180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
190   200   210   220   230   240
TPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
250   260   270   280   290   300
SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
310   320   330   340   350   360
PGGGSVQIVY KPVDLKSVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI
370   380   390   400   410   420
THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
430   440
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

```

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

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

P10636-6 (4R0N tau người) (SEQ ID NO:3)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAE EAGI GDTPSLEDEA
70 80 90 100 110 120
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPA KTPPA
130 140 150 160 170 180
 PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREP KKVAV VRTPPKSPSS
190 200 210 220 230 240
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIK
250 260 270 280 290 300
 HVPGGGSVQI VYKPVDLSKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLD FKD RVQSKIGSLD
310 320 330 340 350 360
 NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID
370 380
 MVDSPQLATL ADEVSASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70 80 90 100 110 120
 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIP EG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG

130 140 150 160 170 180
HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
190 200 210 220 230 240
TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
250 260 270 280 290 300
SRLQTAPVPM PDLKNVKS KI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK
310 320 330 340 350 360
PGGGQVEVK EKLD FKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLT FREN AKAKTDHGAE
370 380 390 400 410
IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10 20 30 40 50 60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70 80 90 100 110 120
SETSDAKSTP TAEAE EAGIG DTSPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KAKGADGKT
130 140 150 160 170 180
KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
190 200 210 220 230 240
SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS IGSTENLKHQ
250 260 270 280 290 300
PGGGKVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI
310 320 330 340 350 360
THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
370 380
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10 20 30 40 50 60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI GDTPSLEDEA
70 80 90 100 110 120
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA
130 140 150 160 170 180
PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
190 200 210 220 230 240
AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH

250 260 270 280 290 300
 HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
 310 320 330 340 350
 AEIVYKSPVV SGGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

Việc đề cập đến tau bao gồm các biến thể tự nhiên đã biết, khoảng 30 trong số này được liệt kê trong cơ sở dữ liệu Swiss-Prot và các hoán vị của chúng, cũng như các đột biến liên quan đến các bệnh tau, như chứng sa sút trí tuệ, bệnh Pick, bệnh liệt trên nhân, trong số các bệnh khác (xem, *ví dụ*, cơ sở dữ liệu Swiss-Prot và Poorkaj, và đồng tác giả Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Một số ví dụ về các đột biến tau được đánh số bởi đồng dạng 441 là đột biến lysin thành threonin ở gốc axit amin 257 (K257T), đột biến isoleuxin thành valin ở vị trí axit amin 260 (I260V); đột biến glyxin thành valin ở vị trí axit amin 272 (G272V); đột biến asparagin thành lysin ở vị trí axit amin 279 (N279K); đột biến asparagin thành histidin ở vị trí axit amin 296 (N296H); đột biến prolin thành serin ở vị trí axit amin 301 (P301S); đột biến prolin thành leuxin ở axit amin 301 (P301L); đột biến glyxin thành valin ở vị trí axit amin 303 (G303V); đột biến serin thành asparagin ở vị trí 305 (S305N); đột biến glyxin thành serin ở vị trí axit amin 335 (G335S); đột biến valin thành methionin ở vị trí 337 (V337M); đột biến axit glutamic thành valin ở vị trí 342 (E342V); đột biến lysin thành isoleuxin ở vị trí axit amin 369 (K369I); đột biến glyxin thành arginin ở vị trí axit amin 389 (G389R); và đột biến arginin thành tryptophan ở vị trí axit amin 406 (R406W).

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

Trừ khi ngữ cảnh chỉ ra một cách rõ ràng, việc đề cập đến tau, hoặc các đoạn của chúng bao gồm các trình tự axit amin người tự nhiên bao gồm các đồng dạng, đột biến và các biến thể alen của chúng.

III. Kháng thể

A. Tính đặc hiệu gắn kết và các đặc điểm chức năng

Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết với tau. Một số kháng thể gắn kết với tau

bất kể trạng thái phosphoryl hóa. Một số kháng thể gắn kết với epitop không chứa gốc bị phosphoryl hóa. Các kháng thể này có thể thu được bằng cách gây miễn dịch bằng polypeptit tau được tinh chế từ nguồn tự nhiên hoặc được biểu hiện tái tổ hợp. Các kháng thể có thể được sàng lọc để gắn kết với tau ở dạng không được phosphoryl hóa cũng như dạng trong đó một hoặc nhiều gốc dễ bị phosphoryl hóa được phosphoryl hóa. Tốt hơn nếu các kháng thể này gắn kết với tau được phosphoryl hóa với các ái lực tương đương hoặc ít nhất trong khoảng hệ số là 1,5, 2 hoặc 3 lần so với tau không được phosphoryl hóa (*nghĩa là*, là “đặc hiệu phổ rộng”). 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 là các ví dụ về các kháng thể đơn dòng đặc hiệu phổ rộng. Sáng chế còn đề xuất các kháng thể gắn kết với cùng một epitop hoặc epitop gối lên nhau với epitop của 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6. Cũng được bao gồm là các kháng thể cạnh tranh để gắn kết vào tau với 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6.

Các kháng thể đã đề cập trên đây có thể được tạo ra từ đầu (de novo) bằng cách gây miễn dịch bằng polypeptit tau có độ dài đầy đủ hoặc đoạn peptit của nó. Các peptit này tốt hơn nếu được gắn kết vào phân tử liên hợp khác loài giúp gây ra đáp ứng kháng thể với peptit này. Liên kết này có thể là trực tiếp hoặc qua peptit đệm hoặc axit amin đệm. Xystein được sử dụng làm axit amin đệm vì nhóm SH tự do của nó tạo thuận lợi cho sự gắn kết của phân tử mang. Cầu nối polyglyxin (*ví dụ*, 2-6 glyxin), có hoặc không có gốc xystein giữa các glyxin và peptit này cũng có thể được sử dụng. Phân tử mang có tác dụng cung cấp epitop tế bào T giúp gây ra đáp ứng kháng thể kháng lại peptit này. Một số phân tử mang thường được sử dụng cụ thể là hemoxyanin của loài ốc keyhole limpet (KLH), albumin trứng và albumin huyết thanh bò (BSA). Các đoạn đệm peptit có thể được bổ sung vào kháng nguyên peptit như một phần của quy trình tổng hợp peptit pha rắn. Các phân tử mang thường được bổ sung vào bằng cách liên kết chéo hóa học. Một số ví dụ về các chất liên kết chéo hóa học mà có thể được sử dụng bao gồm N-maleimido-6-aminocaproyl este chéo hoặc m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuxinimit este (MBS) (xem ví dụ, Harlow, E. và đồng tác giả, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1988; Sinigaglia và đồng tác giả, *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz và đồng tác giả, *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer và đồng tác giả, *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. và đồng tác giả, *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; và, Southwood và đồng tác giả *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)). Phân tử mang và đoạn đệm nếu có có thể được gắn kết với một trong hai đầu của kháng nguyên này.

Peptit có đoạn đậm và phân tử mang tùy ý có thể được sử dụng để gây miễn dịch các động vật phòng thí nghiệm hoặc tế bào B như được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Dịch nổi bề mặt chứa tế bào lai có thể được kiểm tra về khả năng gắn kết với các dạng được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa của tau, như, ví dụ, đồng dạng có chiều dài đầy đủ của tau có vị trí 404 ở dạng được phosphoryl hóa. Peptit này có thể được gắn kết với phân tử mang hoặc nhãn khác để tạo thuận lợi cho thử nghiệm sàng lọc. Trong trường hợp này, phân tử mang hoặc nhãn tốt hơn là khác với tổ hợp của đoạn đậm và phân tử mang được sử dụng để gây miễn dịch để loại bỏ các kháng thể đặc hiệu với đoạn đậm hoặc phân tử mang hơn là peptit tau. Bất kỳ trong số các đồng dạng của tau có thể được sử dụng.

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng gắn kết với các epitop nằm trong tau. Kháng thể được ký hiệu 5G8 là một kháng thể chuột điển hình như vậy. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 5G8 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của chuột, khảm, được nguy trang và dạng được làm tương thích với người của kháng thể này. Kháng thể này đã được lưu trữ là [SỐ LƯU TRỮ]. Kháng thể này còn được đặc trưng bởi khả năng gắn kết với cả tau được phosphoryl hóa và tau không được phosphoryl hóa, cả dạng không gây bệnh và dạng bệnh lý và các cấu hình của tau, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

Các kháng thể bổ sung cạnh tranh với 5G8 để gắn kết vào tau và/hoặc gắn kết vào cùng một epitop hoặc epitop trùng lặp với 5G8 đã được phân lập được ký hiệu là 6A10, 8A4, 7G6, và 3D6 và được sản sinh bởi các tế bào lai có cùng tên gọi. 6A10 có vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ lần lượt được đặc trưng bởi SEQ ID NO:49 và SEQ ID NO:50 và thuộc isotyp IgG1/kappa của chuột. 6A10 có các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành (sau khi cắt peptit tín hiệu) lần lượt được đặc trưng bởi SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:64. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 6A10 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của chuột, khảm, được nguy trang và dạng được làm tương thích với người của kháng thể này. 6A10 đã được lưu trữ bằng [SỐ LƯU TRỮ]. 6A10 còn được đặc trưng bởi khả năng gắn kết của nó với cả tau được phosphoryl hóa và tau không được phosphoryl hóa, cả dạng không gây bệnh và dạng bệnh lý và các cấu hình của tau, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

7G6 có vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ lần lượt được đặc trưng bởi SEQ ID NO:51 và SEQ ID NO:52 và thuộc isotyp IgG2b/kappa của chuột. 7G6 có các vùng biến đổi chuỗi

nặng và nhẹ trưởng thành (sau khi cắt peptit tín hiệu) lần lượt được đặc trưng bởi SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:120. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 7G6 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của chuỗi, khảm, được ngụy trang và dạng được làm tương thích với người của kháng thể này. 7G6 đã được lưu trữ bằng [SỐ LƯU TRỮ]. 7G6 còn được đặc trưng bởi khả năng gắn kết của nó với cả tau được phosphoryl hóa và tau không được phosphoryl hóa, cả dạng không gây bệnh và dạng bệnh lý và các cấu hình của tau, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

8A4 có các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ lần lượt được đặc trưng bởi SEQ ID NO:53 và SEQ ID NO:54, và thuộc isotyp IgG1/kappa của chuỗi. 8A4 có các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành (sau khi cắt peptit tín hiệu) lần lượt được đặc trưng bởi SEQ ID NO:91 và SEQ ID NO:92. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 8A4 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của chuỗi, khảm, được ngụy trang và dạng được làm tương thích với người của kháng thể này. 8A4 đã được lưu trữ bằng [SỐ LƯU TRỮ]. 8A4 còn được đặc trưng bởi khả năng gắn kết của nó với cả tau được phosphoryl hóa và tau không được phosphoryl hóa, cả dạng không gây bệnh và dạng bệnh lý và các cấu hình của tau, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

3D6 có vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành lần lượt được đặc trưng bởi SEQ ID NO:55 và SEQ ID NO:59, và thuộc isotyp IgG1 kappa của chuỗi. Đối với 3D6, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO:56, 57, và 58) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Kabat (SEQ ID NO:60, 61, và 62). Đối với 3D6 và các biến thể được làm tương thích với người của nó, xem PCT/IB2017/052544, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả các mục đích. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 3D6 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của chuỗi, khảm, được ngụy trang và dạng được làm tương thích với người của kháng thể này. 3D6 đã được lưu trữ bằng [SỐ LƯU TRỮ]. 3D6 còn được đặc trưng bởi khả năng gắn kết của nó với cả tau được phosphoryl hóa và tau không được phosphoryl hóa, cả dạng không gây bệnh và dạng bệnh lý và các cấu hình của tau, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

Tùy ý, các kháng thể theo sáng chế không bao gồm kháng thể 6A10 như được mô tả trong PCT/IB2017/052544. Tùy ý, các kháng thể theo sáng chế không bao gồm kháng thể 8A4. Tùy ý, các kháng thể theo sáng chế không bao gồm kháng thể 7G6. Tùy ý, các kháng thể theo sáng chế không bao gồm kháng thể 3D6 như được mô tả trong

PCT/IB2017/052544.

Một số kháng thể theo sáng chế gắn kết với cùng một epitop hoặc epitop gồi lên nhau với kháng thể được ký hiệu là 5G8, 6A10, 8A4, 7G6, hoặc 3D6. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của 5G8 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:7 và 8. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của 6A10 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:63 và 64. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của 8A4 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:91 và 92. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của 7G6 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:119 và 120. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của 3D6 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:55 và 59. Các kháng thể khác có tính đặc hiệu gắn kết như vậy có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột bằng tau hoặc một phần của nó chứa epitop mong muốn và sàng lọc các kháng thể thu được về khả năng gắn kết với tau tùy ý cạnh tranh với kháng thể có các vùng biến đổi của 5G8, 6A10, 8A4, 7G6, hoặc 3D6 (IgG1 kappa) của chuột. Các đoạn của tau chứa epitop mong muốn có thể được gắn kết với chất mang giúp gây ra đáp ứng kháng thể với đoạn này và/hoặc được kết hợp với tá được giúp gây ra đáp ứng này. Các kháng thể này có thể được sàng lọc về khả năng gắn kết phân biệt với tau hoặc một đoạn của nó so với các đột biến có các gốc xác định. Việc sàng lọc dựa trên các đột biến này xác định chính xác hơn tính đặc hiệu gắn kết để cho phép nhận diện các kháng thể có khả năng gắn kết bị ức chế bởi kỹ thuật gây đột biến các gốc cụ thể và các kháng thể này có thể có chung các đặc điểm chức năng với các kháng thể điển hình khác. Các đột biến này có thể là đột biến thế thay thế hệ thống bằng alanin (hoặc serin nếu alanin đã có sẵn) một gốc một lần, hoặc các khoảng cách nhau rộng hơn, trên toàn bộ đích này hoặc toàn bộ một phần của nó trong đó được biết là có epitop này. Nếu cùng một tập hợp các đột biến làm giảm đáng kể khả năng gắn kết của hai kháng thể, thì hai kháng thể này gắn kết với cùng một epitop.

Các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể chuột đã chọn (ví dụ, 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 hoặc 3D6) cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng biến thể của phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Xem Winter, WO 92/20791. Phương pháp này là đặc biệt thích hợp để tạo ra các kháng thể người. Trong phương pháp này, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể chuột đã chọn được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu. Nếu, ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn làm nguyên liệu khởi đầu, thư viện thể thực khuẩn

được xây dựng trong đó các thành viên biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (*nghĩa là*, nguyên liệu khởi đầu của chuỗi) và vùng biến đổi chuỗi nặng khác nhau. Vùng biến đổi chuỗi nặng này có thể, ví dụ, thu được từ thư viện của các vùng biến đổi chuỗi nặng của người được sắp xếp lại. Thẻ thực khuẩn thể hiện khả năng gắn kết đặc hiệu mạnh đối với tau hoặc một đoạn của nó (*ví dụ*, ít nhất là 10^8 và tốt hơn là, ít nhất là 10^9 M⁻¹) được chọn. Sau đó vùng biến đổi chuỗi nặng từ thẻ thực khuẩn này đóng vai trò là nguyên liệu khởi đầu để xây dựng thư viện thẻ thực khuẩn khác nữa. Trong thư viện này, mỗi thẻ thực khuẩn biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nặng (*nghĩa là*, vùng được xác định từ thư viện biểu hiện thứ nhất) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác. Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có thể thu được, ví dụ, từ thư viện của các vùng chuỗi nhẹ biến đổi của người được sắp xếp lại. Một lần nữa, thẻ thực khuẩn thể hiện khả năng gắn kết đặc hiệu mạnh đối với tau hoặc một đoạn của nó được chọn. Các kháng thể tạo thành thường có tính đặc hiệu epitop giống hoặc tương tự với nguyên liệu khởi đầu của chuột.

CDR tổ hợp Kabat/Chothia của chuỗi nặng của 5G8 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:11, 12, và 13, và các CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 5G8 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:14, 15, và 16.

Bảng 2 chỉ ra các CDR 5G8 như được xác định bằng Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat (còn được gọi ở đây là “Tổ hợp Kabat/Chothia”), AbM, và Contact.

Bảng 2
Các CDR 5G8 như được xác định bởi Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat, AbM, và Contact

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:14	L24--L34 SEQ ID NO:14	L24--L34 SEQ ID NO:14	L24--L34 SEQ ID NO:14	L30--L36 SEQ ID NO:24
L2	L50--L56 SEQ ID NO:15	L50--L56 SEQ ID NO:15	L50--L56 SEQ ID NO:15	L50--L56 SEQ ID NO:15	L46--L55 SEQ ID NO:25
L3	L89--L97 SEQ ID NO:16	L89--L97 SEQ ID NO:16	L89--L97 SEQ ID NO:16	L89--L97 SEQ ID NO:16	L89--L96 SEQ ID NO:26
H1	H31--H35B SEQ ID NO:17	H26--H32 SEQ ID NO:18	H26--H35B SEQ ID NO:11	H26--H35B SEQ ID NO:11	H30--H35B SEQ ID NO:19

Bảng 2

Các CDR 5G8 như được xác định bởi Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat, AbM, và Contact

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
H2	H50--H65 SEQ ID NO:12	H52--H56 SEQ ID NO:20	H50--H65 SEQ ID NO:12	H50--H58 SEQ ID NO:21	H47--H58 SEQ ID NO:22
H3	H95--H102 SEQ ID NO:13	H95--H102 SEQ ID NO:13	H95--H102 SEQ ID NO:13	H95--H102 SEQ ID NO:13	H93--H101 SEQ ID NO:23

CDR Tổ hợp Kabat/Chothia của chuỗi nặng của 6A10 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:65-67, và CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 6A10 lần lượt được ký hiệu là SEQ ID NO:68-70.

Bảng 3 chỉ ra các CDR 6A10 như được xác định bằng Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat (còn được gọi ở đây là “Tổ hợp Kabat/Chothia”), AbM, và Contact.

Bảng 3

Các CDR 6A10 như được xác định bởi Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat, AbM, và Contact

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:68	L24--L34 SEQ ID NO:68	L24--L34 SEQ ID NO:68	L24--L34 SEQ ID NO:68	L30--L36 SEQ ID NO:78
L2	L50--L56 SEQ ID NO:69	L50--L56 SEQ ID NO:69	L50--L56 SEQ ID NO:69	L50--L56 SEQ ID NO:69	L46--L55 SEQ ID NO:79
L3	L89--L97 SEQ ID NO:70	L89--L97 SEQ ID NO:70	L89--L97 SEQ ID NO:70	L89--L97 SEQ ID NO:70	L89--L96 SEQ ID NO:80
H1	H31--H35B SEQ ID NO:71	H26--H32. H34* SEQ ID NO:72	H26--H35B* SEQ ID NO:65	H26--H35B SEQ ID NO:65	H30--H35B SEQ ID NO:73
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:76
H3	H95--H102 SEQ ID NO:67	H95--H102 SEQ ID NO:67	H95--H102 SEQ ID NO:67	H95--H102 SEQ ID NO:67	H93--H101 SEQ ID NO:77

CDR Tổ hợp Kabat/Chothia của chuỗi nặng của 8A4 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:93-95, và CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 8A4 lần lượt được ký hiệu là SEQ ID NO:96-98.

Bảng 4 chỉ ra các CDR 8A4 như được xác định bằng Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat (còn được gọi ở đây là “Tổ hợp Kabat/Chothia”), AbM, và Contact.

Bảng 4

Các CDR 8A4 như được xác định bởi Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat, AbM, và Contact

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:96	L24--L34 SEQ ID NO:96	L24--L34 SEQ ID NO:96	L24--L34 SEQ ID NO:96	L30--L36 SEQ ID NO:106
L2	L50--L56 SEQ ID NO:97	L50--L56 SEQ ID NO:97	L50--L56 SEQ ID NO:97	L50--L56 SEQ ID NO:97	L46--L55 SEQ ID NO:107
L3	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L97 SEQ ID NO:98	L89--L96 SEQ ID NO:108
H1	H31--H35B SEQ ID NO:99	H26--H32. . H34* SEQ ID NO:100	H26--H35B* SEQ ID NO:93	H26--H35B SEQ ID NO:93	H30--H35B SEQ ID NO:101
H2	H50--H65 SEQ ID NO:94	H52--H56 SEQ ID NO:102	H50--H65 SEQ ID NO:94	H50--H58 SEQ ID NO:103	H47--H58 SEQ ID NO:104
H3	H95--H102 SEQ ID NO:95	H95--H102 SEQ ID NO:95	H95--H102 SEQ ID NO:95	H95--H102 SEQ ID NO:95	H93--H101 SEQ ID NO:105

CDR Tổ hợp Kabat/Chothia của chuỗi nặng của 7G6 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO:121-123, và CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 7G6 lần lượt được ký hiệu là SEQ ID NO:124-126.

Bảng 5 chỉ ra các CDR 7G6 như được xác định bằng Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat (còn được gọi ở đây là “Tổ hợp Kabat/Chothia”), AbM, và Contact.

Bảng 5

Các CDR 7G6 như được xác định bởi Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat, AbM, và Contact

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:124	L24--L34 SEQ ID NO:124	L24--L34 SEQ ID NO:124	L24--L34 SEQ ID NO:124	L30--L36 SEQ ID NO:134
L2	L50--L56 SEQ ID NO:125	L50--L56 SEQ ID NO:125	L50--L56 SEQ ID NO:125	L50--L56 SEQ ID NO:125	L46--L55 SEQ ID NO:135
L3	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L97 SEQ ID NO:126	L89--L96 SEQ ID NO:136
H1	H31--H35B SEQ ID NO:127	H26--H32. . H34* SEQ ID NO:128	H26--H35B* SEQ ID NO:121	H26--H35B SEQ ID NO:121	H30--H35B SEQ ID NO:129
H2	H50--H65 SEQ ID NO:122	H52--H56 SEQ ID NO:130	H50--H65 SEQ ID NO:122	H50--H58 SEQ ID NO:131	H47--H58 SEQ ID NO:132
H3	H95--H102 SEQ ID NO:123	H95--H102 SEQ ID NO:123	H95--H102 SEQ ID NO:123	H95--H102 SEQ ID NO:123	H93--H101 SEQ ID NO:133

Các kháng thể khác có thể thu được bằng kỹ thuật gây đột biến cADN mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể điển hình, như 5G8, 6A10, 8A4, 7G6, hoặc 3D6. Các kháng thể đơn dòng mà tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 về trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trưởng thành và duy trì các đặc điểm chức năng của nó, và/hoặc khác với kháng thể tương ứng bởi một số lượng nhỏ các đột biến thể (ví dụ, các đột biến thể bảo tồn), các đột biến mất đoạn, hoặc các đột biến gắn xen axit amin không quan trọng về mặt chức năng cũng được bao gồm trong sáng chế. Các kháng thể đơn dòng có ít nhất

là một hoặc toàn bộ sáu CDR như được xác định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ, nhưng tốt hơn nếu là Kabat, mà tương đồng 90%, 95%, 99% hoặc 100% với các CDR tương ứng của 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 cũng được bao gồm.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể có một số hoặc toàn bộ (ví dụ, 3, 4, 5, và 6) CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6. Các kháng thể này có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà có ít nhất là hai, và thường là toàn bộ ba, CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ vùng biến đổi chuỗi nặng của 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất là hai, và thường là toàn bộ ba, CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6. Các kháng thể này có thể bao gồm cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. CDR chủ yếu là từ CDR 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 tương ứng khi nó chứa không nhiều hơn 4, 3, 2, hoặc 1 đột biến thế, đột biến gắn xen hoặc đột biến mất đoạn, ngoại trừ CDR-H2 (khi được xác định bởi Kabat) có thể có không nhiều hơn 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 đột biến thế, đột biến gắn xen hoặc đột biến mất đoạn. Các kháng thể này có thể có tỷ lệ tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 về trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc nhẹ trưởng thành và duy trì được các đặc điểm chức năng của chúng, và/hoặc khác biệt với 5G8 ở một số lượng nhỏ các đột biến thay thế (ví dụ, đột biến thế bảo tồn), đột biến mất đoạn, hoặc đột biến gắn xen axit amin không quan trọng về chức năng.

Một số kháng thể được xác định bằng các thử nghiệm này có thể gắn kết với các dạng monome, dạng bị gấp sai, dạng bị kết tụ, dạng được phosphoryl hóa, hoặc không được phosphoryl hóa của tau hoặc không. Tương tự, một số kháng thể có phản ứng miễn dịch trên các dạng không gây bệnh và dạng bệnh lý và các cấu hình của tau.

B. Các kháng thể không phải của người

Sự tạo thành các kháng thể không phải của người khác, ví dụ, chuột, chuột lang, linh trưởng, thỏ hoặc chuột cống kháng lại tau hoặc một đoạn của nó có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, gây miễn dịch động vật này với tau hoặc một đoạn của nó. Xem Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích). Kháng nguyên này có thể thu được từ nguồn tự nhiên, bằng cách tổng hợp peptit, hoặc biểu hiện tái tổ hợp. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng bằng cách được dung hợp hoặc tạo phức với protein mang. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng với tá dược. Một số loại tá dược có thể được sử dụng như được

mô tả dưới đây. Tá dược Freund hoàn chỉnh sau đó là tá dược không hoàn chỉnh được ưu tiên hơn để gây miễn dịch các động vật thí nghiệm. Thỏ hoặc chuột lang thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đa dòng. Chuột thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng. Các kháng thể được sàng lọc về khả năng gắn kết đặc hiệu với tau hoặc epitop trong tau. Việc sàng lọc này có thể được thực hiện bằng cách xác định sự gắn kết của kháng thể với tập hợp các biến thể tau, và xác định các biến thể tau gắn kết với kháng thể này. Khả năng gắn kết có thể được đánh giá, ví dụ, bằng kỹ thuật thâm tách Tây, FACS hoặc ELISA.

C. Các kháng thể được làm tương thích với người

Kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể được thao tác di truyền trong đó các CDR từ kháng thể “cho” không phải của người được ghép vào các trình tự kháng thể “nhận” của người (xem, ví dụ, Queen, US 5,530,101 và 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; và Foote, US 6,881,557). Các trình tự kháng thể nhận có thể là, ví dụ, trình tự kháng thể người trưởng thành, thể liên hợp của các trình tự này, trình tự liên ứng của các trình tự kháng thể người, hoặc trình tự vùng dòng mầm. Do đó, kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể có ít nhất là ba, bốn, năm hoặc toàn bộ các CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ kháng thể cho và các trình tự khung vùng biến đổi và vùng hằng định, nếu có mặt, hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ các trình tự kháng thể người. Tương tự, chuỗi nặng được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nặng của kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nặng, nếu có mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng của người và trình tự vùng hằng định của người. Tương tự, chuỗi nhẹ được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nhẹ kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nhẹ, nếu có mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ của người và trình tự vùng hằng định của người. Ngoài các thể nano và dAb, kháng thể được làm tương thích với người chứa chuỗi nặng được làm tương thích với người và chuỗi nhẹ được làm tương thích với người. CDR trong kháng thể được làm tương thích với người chủ yếu là từ CDR tương ứng trong kháng thể không phải của người khi ít nhất là 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng (như được xác định bởi định nghĩa thông thường bất kỳ nhưng tốt hơn nếu được

xác định bằng Kabat) là giống nhau giữa các CDR tương ứng. Các trình tự khung vùng biến đổi của chuỗi kháng thể hoặc vùng hằng định của chuỗi kháng thể chủ yếu là từ trình tự khung vùng biến đổi của người hoặc vùng hằng định của người, tương ứng, khi ít nhất là 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng được xác định bởi Kabat là giống nhau. Để được phân loại là được làm tương thích với người theo định nghĩa về tên gốc quốc tế (INN) của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) 2014 về các kháng thể được làm tương thích với người, một kháng thể phải có tỷ lệ tương đồng ít nhất là 85% với các trình tự kháng thể dòng mầm của người (nghĩa là, trước quá trình siêu đột biến thân). Các kháng thể hỗn hợp là các kháng thể mà một chuỗi kháng thể (ví dụ, chuỗi nặng) phù hợp giới hạn nhưng chuỗi còn lại (ví dụ, chuỗi nhẹ) không phù hợp với giới hạn. Kháng thể được phân loại là khả năng nếu cả hai chuỗi đều không phù hợp với giới hạn, mặc dù các vùng khung biến đổi cho cả hai chuỗi đều gần như là của người với một số đột biến ngược của chuột. Xem, Jones và đồng tác giả (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862. 2015.1114320. Ngoài ra, xem “WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)” (Internet) 2014. Có trên: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Để tránh nhầm lẫn, thuật ngữ “được làm tương thích với người” như được sử dụng ở đây không được dự định bị giới hạn vào định nghĩa INN của WHO năm 2014 về các kháng thể được làm tương thích với người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỷ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với trình tự dòng mầm của người và một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỷ lệ tương đồng trình tự ít hơn 85% với trình tự dòng mầm của người. Một số chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỷ lệ tương đồng trình tự từ khoảng 60% đến 100% với các trình tự dòng mầm của người, như, ví dụ, trong khoảng từ khoảng 60% đến 69%, 70% đến 79%, 80% đến 84%, hoặc 85% đến 89%. Một số chuỗi nặng nằm trong định nghĩa INN của WHO 2014 và có, ví dụ, tỷ lệ tương đồng trình tự khoảng 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, hoặc 82%, 83%, hoặc 84% với các trình tự dòng mầm của người, trong khi các chuỗi nặng khác thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 và có tỷ lệ tương đồng trình tự khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89% hoặc lớn hơn với các trình tự dòng mầm của người. Một số chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỷ lệ tương đồng trình tự từ khoảng 60% đến 100%

với các trình tự dòng mầm của người, như, ví dụ, trong khoảng từ khoảng 80% đến 84%, hoặc 85% đến 89%. Một số chuỗi nhẹ nằm trong định nghĩa INN của WHO 2014 và có, ví dụ, tỷ lệ tương đồng trình tự khoảng 81%, 82%, 83%, hoặc 84% với các trình tự dòng mầm của người, trong khi các chuỗi nhẹ khác thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 và có tỷ lệ tương đồng trình tự khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89% hoặc lớn hơn với các trình tự dòng mầm của người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây mà là "khảm" theo định nghĩa INN của WHO 2014 có các chuỗi nặng có tỷ lệ tương đồng ít hơn 85% với trình tự dòng mầm của người được bắt cặp với các chuỗi nhẹ có tỷ lệ tương đồng ít hơn 85% với các trình tự dòng mầm của người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây là "hỗn hợp" theo định nghĩa INN của WHO 2014, ví dụ, có chuỗi nặng có tỷ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người được bắt cặp với chuỗi nhẹ có tỷ lệ tương đồng trình tự ít hơn 85% với các trình tự dòng mầm của người, hoặc ngược lại. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 về "được làm tương thích với người" và có chuỗi nặng có tỷ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với trình tự dòng mầm người được bắt cặp với chuỗi nhẹ có tỷ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người. Các kháng thể 5G8 được lấy làm ví dụ thỏa mãn định nghĩa INN của WHO năm 2014 về "được làm tương thích với người" bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:39 được ghép đôi với trình tự chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, hoặc SEQ ID NO:46. Các kháng thể 5G8 được làm tương thích với người bổ sung theo sáng chế bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:33-40 được ghép đôi với chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:41-46. Các kháng thể 6A10 được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:85-87 được ghép đôi với chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:88-90. Các kháng thể 8A4 được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:113-115 được ghép đôi với chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:116-118. Các kháng thể 7G6 được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất

kỳ trong số SEQ ID NO:139-140 được ghép đôi với chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO:141-148.

Mặc dù các kháng thể được làm tương thích với người thường đưa vào tất cả sáu CDR (được xác định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ nhưng tốt hơn, nếu được định nghĩa bằng Kabat) từ kháng thể chuột, chúng cũng có thể được tạo ra với chưa đến toàn bộ các CDR (ví dụ, ít nhất là 3, 4, hoặc 5 CDR) từ kháng thể chuột (ví dụ, Pascalis và đồng tác giả, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos và đồng tác giả, *J. of Mol. Biol.*, 320:415-428, 2002; Iwahashi và đồng tác giả, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura và đồng tác giả, *J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000).

Trong một số kháng thể, chỉ một phần của các CDR, cụ thể là một nhóm con của các gốc CDR cần thiết cho sự gắn kết, được gọi là SDR, là cần thiết để giữ được khả năng gắn kết trong kháng thể được làm tương thích với người. Các gốc CDR không tiếp xúc với kháng nguyên và không ở trong các SDR có thể được nhận diện dựa vào các nghiên cứu trước đó (ví dụ, các gốc H60-H65 trong CDR H2 thường là không cần thiết), từ các vùng của CDR Kabat nằm ngoài vòng siêu biến Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), bằng cách lập mô hình phân tử và/hoặc theo kinh nghiệm, hoặc như được mô tả trong Gonzales và đồng tác giả, *Mol. Immunol.* 41:863, 2004. Trong các kháng thể được làm tương thích với người này, ở các vị trí, trong đó một hoặc nhiều gốc CDR cho là vắng mặt hoặc trong đó toàn bộ CDR cho bị loại bỏ, axit amin chiếm vị trí này có thể là axit amin chiếm vị trí tương ứng (bằng cách đánh số Kabat) trong trình tự kháng thể nhận. Số lượng các đột biến thay thế axit amin nhận cho các axit amin cho trong các CDR đưa vào phản ánh sự cân bằng của các xem xét cạnh tranh. Các đột biến thể này có thể có lợi trong việc làm giảm số lượng axit amin chuột trong kháng thể được làm tương thích với người và do đó làm giảm khả năng gây miễn dịch tiềm tàng và/hoặc thỏa mãn định nghĩa của INN WHO về "được làm tương thích với người". Tuy nhiên, các đột biến thể cũng có thể gây ra các thay đổi về ái lực, và sự giảm đáng kể về ái lực tốt hơn, nếu tránh được. Các vị trí thể trong các CDR và các axit amin thể cũng có thể được lựa chọn theo kinh nghiệm.

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

Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng 5G8 là aDabi-Fab2b-VH kháng dabigatran được làm tương thích với người có mã truy cập NCBI là 4YHM_H (SEQ ID NO:28). Ví dụ khác về trình tự nhận cho chuỗi nặng 5G8 là IGHV1-46 của gen dòng mầm của người có mã truy cập NCBI là P01743. 2 (SEQ ID NO:29). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ 5G8 là aDabi-Fab2b-VL kháng dabigatran được làm tương thích với người có mã truy cập NCBI là 4YHM_L (SEQ ID NO:31). Ví dụ khác về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ 5G8 là IGKV2-29 của gen dòng mầm của người có mã truy cập NCBI là A2NJV5. 2 (SEQ ID NO:32).

Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng 6A10 là vùng biến đổi chuỗi nặng của người với #truy cập là ACR16112 (SEQ ID NO:81). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ 6A10 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa của người với #truy cập là ABC66863 (SEQ ID NO:83).

Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng 8A4 là vùng biến đổi chuỗi nặng của người với #truy cập là ADU57742 (SEQ ID NO:110). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ 8A4 là vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa của người với #truy cập là ABA26100 (SEQ ID NO:112).

Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng 7G6 là vùng VH của kháng thể người với #truy cập là PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ 7G6 là vùng VL của kháng thể người với #truy cập là PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138).

Nếu nhiều hơn một trình tự kháng thể nhận của người được lựa chọn, tổ hợp hoặc thể lai của các trình tự nhận này có thể được sử dụng, và các axit amin được sử dụng ở các vị trí khác nhau trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được làm tương thích với người có thể được lấy từ bất kỳ trong số các trình tự kháng thể nhận của người đã sử dụng.

Một số axit amin từ các gốc khung vùng biến đổi của người có thể được chọn để thay thế dựa vào ảnh hưởng có thể của chúng trên cấu hình CDR và/hoặc khả năng gắn kết với kháng nguyên. Việc điều tra về các ảnh hưởng có thể này được thực hiện bằng cách tạo mô hình, kiểm tra các đặc điểm của các axit amin ở các vị trí cụ thể, hoặc quan sát bằng kinh nghiệm tác động của đột biến thể hoặc sự đột biến của các axit amin cụ thể.

Ví dụ, khi một axit amin khác nhau giữa gốc khung vùng biến đổi của chuột và gốc khung vùng biến đổi của người đã chọn, axit amin khung người này có thể được thay thế bằng axit amin khung tương đương từ kháng thể chuột khi được mong đợi hợp lý là axit amin này:

- (1) liên kết trực tiếp không đồng hóa trị với kháng nguyên;
- (2) là liên kết với vùng CDR hoặc nằm trong CDR như được xác định bởi Chothia nhưng không theo Kabat;
- (3) theo cách khác, tương tác với vùng CDR (*ví dụ*, trong khoảng 6 Å của vùng CDR), (*ví dụ*, được nhận diện bằng cách tạo mô hình chuỗi nhẹ hoặc nặng trên cấu trúc đã được giải thích của chuỗi globulin miễn dịch tương đồng đã biết); hoặc
- (4) là gốc tham gia vào mặt phân cách VL-VH.

Sáng chế đề xuất dạng được làm tương thích với người của kháng thể 5G8 của chuột bao gồm 8 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33), hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34), hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35), hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36), hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37), hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38), hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39), và hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)), và 6 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41), hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42), hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43), hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44), hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45), và hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)).

Sáng chế đề xuất dạng được làm tương thích với người của kháng thể 6A10 của chuột bao gồm 3 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85), hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86), và hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)), và 3 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88), hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89), và hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)).

Sáng chế đề xuất dạng được làm tương thích với người của kháng thể 8A4 của chuột bao gồm 3 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113), hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114), và hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)), và 3 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116), hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117), và hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)).

Sáng chế đề xuất dạng được làm tương thích với người của kháng thể 7G6 của chuột bao gồm 2 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm tương thích với người được

lấy làm ví dụ (hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139) và hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140), và 8 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141), hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142), hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143), hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144), hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145), hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146), hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147), và hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)).

Trong một phương án, các trình tự được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình PCR hai bước cho phép đưa vào nhiều đột biến, đột biến mất đoạn, và các đột biến gắn xen bằng cách sử dụng kỹ thuật gây đột biến định hướng điểm QuikChange [Wang, W. và Malcolm, B. A. (1999) *BioTechniques* 26:680-682)].

Các gốc khung từ các lớp (1) đến (3) như được xác định bởi Queen, US 5,530,101, đôi khi được gọi theo cách khác là các gốc chính tắc và vecnê. Các gốc khung mà giúp xác định cấu hình của vòng CDR đôi khi được gọi là các gốc chính tắc (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800-815 (1996)). Các gốc khung mà hỗ trợ cấu hình vòng liên kết kháng nguyên và đóng vai trò trong việc tinh chỉnh sự ăn khớp của kháng thể với kháng nguyên đôi khi được gọi là các gốc vecnê (Foote & Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)).

Các gốc khung khác mà là ứng viên cho sự thể là các gốc tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Các ứng viên khác cho sự thể là các axit amin khung nhận của người mà là bất thường đối với globulin miễn dịch người ở vị trí đó. Các axit amin này có thể được thay thế bằng các axit amin từ vị trí tương đương của kháng thể cho của chuột hoặc từ các vị trí tương đương của các globulin miễn dịch người điển hình hơn.

Các gốc khung khác mà là ứng viên cho sự thể là các gốc glutamin đầu cùng N (Q) mà có thể được thay thế bằng axit glutamic (E) để làm giảm tối đa khả năng chuyển hóa pyroglutamat [Y. Diana Liu, và đồng tác giả, 2011, *J. Biol. Chem.*, 286:11211–11217]. Sự chuyển hóa axit glutamic (E) thành pyroglutamat (pE) xảy ra chậm hơn so với từ glutamin (Q). Vì sự mất amin bậc một trong chuyển hóa glutamin thành pE, các kháng thể trở nên có tính axit hơn. Sự chuyển hóa không hoàn toàn tạo ra tính không tương đồng trong kháng thể mà có thể quan sát được dưới dạng nhiều đỉnh bằng cách sử dụng các phương pháp phân tích dựa vào điện tích. Sự khác biệt về tính không tương đồng có thể chỉ ra sự thiếu kiểm soát quy trình. Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ với

các đột biến thể glutamin đầu cùng N thành glutamat là SEQ ID NO:35 (hu5G8-VH_v3), SEQ ID NO:36 (hu5G8-VH_v4), SEQ ID NO:37 (hu5G8-VH_v5), SEQ ID NO:38 (hu5G8-VH_v6), và SEQ ID NO:40 (hu5G8-VH_v8).

Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ là các dạng được làm tương thích với người của 5G8 của chuột, được ký hiệu là Hu5G8.

Kháng thể 5G8 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:8. Sáng chế đề xuất 8 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7, và hu5G8-VH_v8. Sáng chế đề xuất thêm 6 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ: hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5, và hu5G8-VL_v6. Sự sắp xếp thẳng hàng kháng thể 5G8 của chuột và nhiều kháng thể được làm tương thích với người khác nhau được chỉ ra cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (Bảng 6 và Fig.6), và các vùng biến đổi chuỗi nặng (Bảng 7 và Fig.5).

Với các lý do như ảnh hưởng có thể trên cấu hình CDR và/hoặc khả năng gắn kết với kháng nguyên, gây ra sự tương tác giữa các chuỗi nặng và nhẹ, tương tác với vùng hằng định, là vị trí biến đổi sau dịch mã mong muốn hoặc không mong muốn, là gốc bất thường về vị trí của nó trong trình tự vùng biến đổi của người và do đó có khả năng gây miễn dịch, có khả năng kết tụ, và các lý do khác, 23 vị trí khung vùng biến đổi sau đây của 5G8 được xem là ứng viên cho các đột biến thể trong 6 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ và 8 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người được lấy làm ví dụ, như được chỉ ra cụ thể hơn trong ví dụ 6: L2 (I2V), L7 (T7S), L17 (Q17E), L36 (Y36L), L45 (K45Q), L46 (G46R), L70 (G70D), H1 (Q1E), H11 (V11L), H12 (K12V), H19 (K19R), H20 (V20L), H23 (K23A), H46 (E46D), H48 (M48I), H66 (K66R), H67 (A67V), H71 (R71S), H76 (S76N), H78 (A78V), H80 (M80L), H93 (T93S hoặc T93A), H94 (I94P hoặc I94R).

Ở đây, và các phần khác, gốc được đề cập đầu tiên là gốc của kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách ghép các CDR Kabat hoặc CDR tổ hợp Chothia-Kabat trong trường hợp CDR-H1 vào khung nhận của người, và gốc được đề cập thứ hai là gốc đang được xem xét để thay thế gốc này. Do đó, trong các khung vùng biến

đôi, gốc được đề cập đầu tiên là người, và trong các CDR, gốc được đề cập đầu tiên là chuột.

Các kháng thể được lấy làm ví dụ bao gồm các hoán vị bất kỳ hoặc các tổ hợp của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành được lấy làm ví dụ của 5G8 *ví dụ*, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v1/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v2/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v3/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v4/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v5/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v6/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v1, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v2, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v5, hu5G8VH_v7/ hu5G8VL_v6, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v3, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v4, hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v5, hoặc hu5G8VH_v8/ hu5G8VL_v6.

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 5G8 được làm tương thích với người trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7, và hu5G8-VH_v8. (SEQ ID NO:33-40) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4,

hu5G8-VL_v5, và hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:41-46). Trong một số kháng thể này ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, hoặc toàn bộ 23 đột biến ngược hoặc các đột biến khác được tìm thấy trong SEQ ID NO:33-40 và SEQ ID NO:41-46 được giữ lại.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị chiếm bởi P. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi I, S, S, và P.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị chiếm bởi P. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, I, S, S, và P.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H46 bị chiếm bởi D, H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị chiếm bởi P. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H46, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, D, I, S, S, và P.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H19 bị chiếm bởi R, H20 bị chiếm bởi L, H46 bị chiếm bởi D, H48 bị chiếm bởi I, H71 bị chiếm bởi S, H76 bị chiếm bởi N, H80 bị chiếm bởi L, H93 bị chiếm bởi S, và H94 bị chiếm bởi P. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S, và P.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H66 bị chiếm bởi R, H67 bị chiếm bởi V, và H78 bị chiếm bởi V. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H66, H67, và H78 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, V, và V.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi Q hoặc E, H11 bị chiếm bởi V hoặc L, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H19 bị chiếm bởi K hoặc R, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H23 bị chiếm bởi K hoặc A, H46 bị chiếm bởi E hoặc D, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H66 bị chiếm bởi K hoặc R, H67 bị chiếm bởi A hoặc V, H71 bị chiếm bởi R hoặc S, H76 bị chiếm bởi S hoặc N, H78 bị chiếm bởi A hoặc V, H80 bị chiếm bởi M hoặc L, H93 bị chiếm bởi T, S, hoặc A, và H94 bị chiếm bởi I, P, hoặc R.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi I, S, S, và P, như trong hu5G8-VH_v2. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, I, S, S, và P, như trong hu5G8-VH_v3. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H46, H48, H71, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, D, I, S, S, và P, như trong hu5G8-VH_v4. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, L, V, R, L, D, I, S, N, L, S, và P, như trong hu5G8-VH_v5. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S, và P, như trong hu5G8-VH_v6. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H66, H67, H78, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, V, V, A, và R, như trong hu5G8-VH_v7. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, D, I, R, V, S, V, S, và P, như trong hu5G8-VH_v8.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi V, L36 bị chiếm bởi L, và L46 bị chiếm bởi R. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L36, và L46 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, và R.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi V, L36 bị chiếm bởi L, L46 bị chiếm bởi R, và L70 bị chiếm bởi D. Trong một số kháng thể 5G8

được làm tương thích với người, các vị trí L2, L36, L46, và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, R, và D.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L45 bị chiếm bởi Q và L70 bị chiếm bởi D. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí L45 và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi Q và D.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi I hoặc V, L7 bị chiếm bởi T hoặc S, L17 bị chiếm bởi Q hoặc E, L36 bị chiếm bởi Y hoặc L, L45 bị chiếm bởi K hoặc Q, L46 bị chiếm bởi L hoặc R, và L70 bị chiếm bởi G hoặc D.

Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L36, L46 được đề xuất trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, và R, như trong hu5G8-VL_v2. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L36, L46, và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, R, và D, như trong hu5G8-VL_v3. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L7, L17, L36, L46, và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, S, E, L, R, và D, như trong hu5G8-VL_v4. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí L45 và L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi Q và D, như trong hu5G8-VL_v5. Trong một số kháng thể 5G8 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L36, L45, L46, L70 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, L, Q, R, và D, như trong hu5G8-VL_v6.

Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ là các dạng được làm tương thích với người của 6A10 của chuột, được ký hiệu là Hu6A10.

Kháng thể 6A10 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO:63 và SEQ ID NO:64. Sáng chế đề xuất 3 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của 6A10 được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2, và hu6A10-VH_v3. Sáng chế đề xuất thêm 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của 6A10 của người được lấy làm ví dụ: hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2, và hu6A10-VL_v3. Sự sắp xếp thẳng hàng kháng thể 6A10 của chuột và nhiều kháng thể được làm tương thích với người khác nhau được chỉ ra cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (Bảng 12 và Fig.8), và các vùng biến đổi chuỗi nặng (Bảng 13 và Fig.7).

Với các lý do như ảnh hưởng có thể trên cấu hình CDR và/hoặc khả năng gắn kết với kháng nguyên, gây ra sự tương tác giữa các chuỗi nặng và nhẹ, tương tác với vùng hằng định, là vị trí biến đổi sau dịch mã mong muốn hoặc không mong muốn, là gốc bất thường về vị trí của nó trong trình tự vùng biến đổi của người và do đó có khả năng gây miễn dịch, có khả năng kết tụ, và các lý do khác, 7 vị trí khung vùng biến đổi sau đây được xem là ứng viên cho các đột biến thể trong 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ và 3 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người được lấy làm ví dụ, như được chỉ ra cụ thể hơn trong ví dụ 7: L12 (P12S), L17 (Q17E), L46 (R46L), H16 (A16G), H48 (M48I), H69 (T69I), và H80 (M80L).

Ở đây, và các phần khác, gốc được đề cập đầu tiên là gốc của kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách ghép các CDR Kabat hoặc CDR tổ hợp Chothia-Kabat trong trường hợp CDR-H1 vào khung nhận của người, và gốc được đề cập thứ hai là gốc đang được xem xét để thay thế gốc này. Do đó, trong các khung vùng biến đổi, gốc được đề cập đầu tiên là người, và trong các CDR, gốc được đề cập đầu tiên là chuột.

Các kháng thể 6A10 được lấy làm ví dụ bao gồm các hoán vị bất kỳ hoặc các tổ hợp của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành được lấy làm ví dụ *ví dụ*, hu6A10VH_v1/ hu6A10VL_v1, hu6A10VH_v1/ hu6A10VL_v2, hu6A10VH_v1/ hu6A10VL_v3, hu6A10VH_v2/ hu6A10VL_v1, hu6A10VH_v2/ hu6A10VL_v2, hu6A10VH_v2/ hu6A10VL_v3, hu6A10VH_v3/ hu6A10VL_v1, hu6A10VH_v3/ hu6A10VL_v2, hoặc hu6A10VH_v3/ hu6A10VL_v3.

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 6A10 được làm tương thích với người trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2, và hu6A10-VH_v3, (SEQ ID NO:85-87) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2, hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:88-90). Trong một số kháng thể này ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc toàn bộ 7 đột biến ngược hoặc các đột biến khác được tìm thấy trong SEQ ID NO:85-87 và SEQ ID NO:88-90 được giữ lại.

Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, vị trí H48 trong

vùng VH bị chiếm bởi I.

Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H16 bị chiếm bởi A hoặc G, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H69 bị chiếm bởi T hoặc I, và H80 bị chiếm bởi M hoặc L.

Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, vị trí H48 trong vùng VH bị chiếm bởi I như trong hu6A10-VH_v2. Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, các vị trí H16, H48, H69, và H80 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi G, I, I, và L, như trong hu6A10-VH_v3.

Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, vị trí L46 trong vùng VL bị chiếm bởi L.

Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi P hoặc S, L17 bị chiếm bởi Q hoặc E, và L46 bị chiếm bởi R hoặc L.

Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, vị trí L46 trong vùng VL bị chiếm bởi L, như trong hu6A10-VL_v2. Trong một số kháng thể 6A10 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L17, và L46 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, E, và L, như trong hu6A10-VL_v3.

Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ là các dạng được làm tương thích với người của 8A4 của chuột, được ký hiệu là Hu8A4.

Kháng thể 8A4 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO:91 và SEQ ID NO:92. Sáng chế đề xuất 3 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2, và hu8A4-VH_v3. Sáng chế đề xuất thêm 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của của người được lấy làm ví dụ: hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2, và hu8A4-VL_v3. Sự sắp xếp thẳng hàng kháng thể 8A4 của chuột và nhiều kháng thể được làm tương thích với người khác nhau được chỉ ra cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (Bảng 18 và Fig.10), và các vùng biến đổi chuỗi nặng (Bảng 19 và Fig.9).

Với các lý do như ảnh hưởng có thể trên cấu hình CDR và/hoặc khả năng gắn kết với kháng nguyên, gây ra sự tương tác giữa các chuỗi nặng và nhẹ; tương tác với vùng

hằng định, là vị trí biến đổi sau dịch mã mong muốn hoặc không mong muốn, là gốc bắt thường về vị trí của nó trong trình tự vùng biến đổi của người và do đó có khả năng gây miễn dịch, có khả năng kết tụ, và các lý do khác, 11 vị trí khung vùng biến đổi sau đây của 8A4 được xem là ứng viên cho các đột biến thể trong 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ và 3 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người được lấy làm ví dụ, như được chỉ ra cụ thể hơn trong ví dụ 8: L2 (I2V), L17 (Q17E), L36 (F36L), H12 (K12V), H16 (S16G), H20 (V20L), H48 (M48I), H67 (I67A), H68 (N68T), H85 (D85E), và H93 (A93S).

Ở đây, và các phần khác, gốc được đề cập đầu tiên là gốc của kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách ghép các CDR Kabat hoặc CDR tổ hợp Chothia-Kabat trong trường hợp CDR-H1 vào khung nhận của người, và gốc được đề cập thứ hai là gốc đang được xem xét để thay thế gốc này. Do đó, trong các khung vùng biến đổi, gốc được đề cập đầu tiên là người, và trong các CDR, gốc được đề cập đầu tiên là chuột.

Các kháng thể 8A4 được lấy làm ví dụ bao gồm các hoán vị bất kỳ hoặc các tổ hợp của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành được lấy làm ví dụ *ví dụ*, hu8A4VH_v1/ hu8A4VL_v1, hu8A4VH_v1/ hu8A4VL_v2, hu8A4VH_v1/ hu8A4VL_v3, hu8A4VH_v2/ hu8A4VL_v1, hu8A4VH_v2/ hu8A4VL_v2, hu8A4VH_v2/ hu8A4VL_v3, hu8A4VH_v3/ hu8A4VL_v1, hu8A4VH_v3/ hu8A4VL_v2, hoặc hu8A4VH_v3/ hu8A4VL_v3.

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 8A4 được làm tương thích với người trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2, và hu8A4-VH_v3, (SEQ ID NO:113-115) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2, hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:116-118). Trong một số kháng thể này ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, hoặc 11 trong số các đột biến ngược hoặc các đột biến khác được tìm thấy trong SEQ ID NO:113-115 và SEQ ID NO:116-118 được giữ lại.

Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, vị trí H93 trong vùng VH bị chiếm bởi S.

Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H16 bị chiếm bởi G, H20 bị chiếm bởi L, và H68 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H16, H20, và H68 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, G, L, và T.

Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H16 bị chiếm bởi S hoặc G, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H67 bị chiếm bởi A hoặc I, H68 bị chiếm bởi N hoặc T, H85 bị chiếm bởi D hoặc E, và H93 bị chiếm bởi S hoặc A.

Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, vị trí H93 trong vùng VH bị chiếm bởi S, như trong hu8A4VH_v1. Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H16, H20, H68, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, G, L, T, và S, như trong hu8A4VH_v2. Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H16, H20, H48, H67, H68, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, G, L, I, A, T, và E, như trong hu8A4VH_v3.

Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, vị trí L17 trong vùng VL bị chiếm bởi E.

Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi I hoặc V, L17 bị chiếm bởi Q hoặc E, và L36 bị chiếm bởi F hoặc L.

Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, vị trí L17 trong vùng VL bị chiếm bởi E, như trong hu8A4-VL_v2. Trong một số kháng thể 8A4 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L17, và L36 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, E, và L, như trong hu8A4-VL_v3.

Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ là các dạng được làm tương thích với người của 7G6 của chuột, được ký hiệu là Hu7G6.

Kháng thể 7G6 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO:119 và SEQ ID NO:120. Sáng chế đề xuất 2 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví

dụ: hu7G6-VH_v1 và hu7G6-VH_v2. Sáng chế đề xuất thêm 8 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ: hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7, và hu7G6-VL_v8. Sự sắp xếp thẳng hàng kháng thể 7G6 của chuột và nhiều kháng thể được làm tương thích với người khác nhau được chỉ ra cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (Bảng 25 và Fig.12), và các vùng biến đổi chuỗi nặng (Bảng 26 và Fig.11).

Với các lý do như ảnh hưởng có thể trên cấu hình CDR và/hoặc khả năng gắn kết với kháng nguyên, gây ra sự tương tác giữa các chuỗi nặng và nhẹ, tương tác với vùng hằng định, là vị trí biến đổi sau dịch mã mong muốn hoặc không mong muốn, là gốc bất thường về vị trí của nó trong trình tự vùng biến đổi của người và do đó có khả năng gây miễn dịch, có khả năng kết tụ, và các lý do khác, 16 vị trí khung vùng biến đổi sau đây của 7G6 được xem là ứng viên cho các đột biến thể trong 8 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ và 2 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người được lấy làm ví dụ, như được chỉ ra cụ thể hơn trong ví dụ 9: L12 (P12S), L36 (F36L), L37 (Q37L), L45 (R45K), L100 (Q100G), L103 (R103K), H12 (K12V), H20 (V20L), H38 (R39K), H69 (M69I), H76 (S76N), H78 (V78A), H80 (M80L), H81 (E81Q), H92 (C92S), và H93 (A93T).

Ở đây, và các phần khác, gốc được đề cập đầu tiên là gốc của kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách ghép các CDR Kabat hoặc CDR tổ hợp Chothia-Kabat trong trường hợp CDR-H1 vào khung nhận của người, và gốc được đề cập thứ hai là gốc đang được xem xét để thay thế gốc này. Do đó, trong các khung vùng biến đổi, gốc được đề cập đầu tiên là người, và trong các CDR, gốc được đề cập đầu tiên là chuột.

Các kháng thể 7G6 được lấy làm ví dụ bao gồm các hoán vị bất kỳ hoặc các tổ hợp của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành được lấy làm ví dụ, *ví dụ*, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v1, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v2, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v3, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v4, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v5, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v6, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v7, hu7G6VH_v1/ hu7G6VL_v8, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v1, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v2, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v3, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v4, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v5, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v6, hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v7, hoặc

hu7G6VH_v2/ hu7G6VL_v8.

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 7G6 được làm tương thích với người trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu7G6-VH_v1, và hu7G6-VH_v2, (SEQ ID NO:139-140) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7, và hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:141-148). Trong một số kháng thể này ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, hoặc toàn bộ 17 đột biến ngược hoặc các đột biến khác được tìm thấy trong SEQ ID NO:139-140 và SEQ ID NO:141-148 được giữ lại.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H20 bị chiếm bởi L, H69 bị chiếm bởi I, H76 bị chiếm bởi N, H78 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q, H92 bị chiếm bởi S, và H93 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, I, N, A, L, Q, S, và T.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H38 bị chiếm bởi R hoặc K, H69 bị chiếm bởi M hoặc I, H76 bị chiếm bởi S hoặc N, H78 bị chiếm bởi V hoặc A, H80 bị chiếm bởi M hoặc L, H81 bị chiếm bởi E hoặc Q, H92 bị chiếm bởi C hoặc S, và H93 bị chiếm bởi A hoặc T.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, I, N, A, L, Q, S, và T, như trong hu7G6-VH_v1. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, K, I, N, A, L, Q, S, và T, như trong hu7G6-VH_v2.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm

bởi S và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12 và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S và K.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L36 bị chiếm bởi L, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L36, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L37 bị chiếm bởi L, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L37, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L36 bị chiếm bởi L, L37 bị chiếm bởi L, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L36, L37, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, và K.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L45 bị chiếm bởi K, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L45, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, K, và K.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S, L100 bị chiếm bởi G, và L103 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L100, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, G, và K.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L36 bị chiếm bởi F hoặc L, L37 bị chiếm bởi Q hoặc L, L45 bị chiếm bởi R hoặc K, hoặc L100 bị chiếm

bởi Q hoặc G.

Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12 và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S và K, như trong hu7G6-VL_v1. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L37, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K, như trong hu7G6-VL_v2. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L36, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, và K, như trong hu7G6-VL_v3. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L36, L37, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, và K, như trong hu7G6-VL_v4. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L45, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, K, và K, như trong hu7G6-VL_v5. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L36, L37, L45, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, K, và K, như trong hu7G6-VL_v6. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L100, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, G, và K, như trong hu7G6-VL_v7. Trong một số kháng thể 7G6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L36, L37, L100, và L103 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, G, và K, như trong hu7G6-VL_v8.

Trong một số kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người, chuỗi nặng biến đổi có tỷ lệ tương đồng với trình tự người $\geq 85\%$. Trong một số kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người, chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng với trình tự người $\geq 85\%$. Trong một số kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người.

Các vùng CDR của các kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người này có thể lần lượt giống hoặc gần như giống với các vùng CDR của 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6. Các vùng CDR có thể được xác định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ (ví dụ, Chothia, hoặc tổ hợp Chothia và Kabat) nhưng tốt hơn là như được định nghĩa bởi Kabat.

Các vị trí khung vùng biến đổi là theo cách đánh số Kabat trừ khi có quy định khác. Các biến thể khác này thường khác với các trình tự của các chuỗi nặng và nhẹ Hu5G8, Hu6A10, Hu8A4, hoặc Hu7G6 được lấy làm ví dụ ở một số lượng nhỏ (ví dụ, thường là

không nhiều hơn 1, 2, 3, 5, 10, hoặc 15) các đột biến thế, đột biến mất đoạn hoặc đột biến gắn xen.

Khả năng biến đổi thêm trong các biến thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người là các đột biến ngược bổ sung trong các khung vùng biến đổi. Nhiều gốc khung không tiếp xúc với các CDR trong mAb được làm tương thích với người có thể chứa các đột biến thế của các axit amin từ các vị trí tương ứng của mAb cho của chuột hoặc các kháng thể của người hoặc chuột khác, và thậm chí nhiều gốc tiếp xúc-CDR tiềm năng cũng có thể thích hợp để thay thế. Ngay cả các axit amin trong các CDR có thể được thay đổi, ví dụ, bằng các gốc được phát hiện ở vị trí tương ứng của trình tự nhận của người được sử dụng để cung cấp các khung vùng biến đổi. Ngoài ra, các trình tự nhận của người khác có thể được sử dụng, ví dụ, cho chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Nếu các trình tự nhận khác nhau được sử dụng, một hoặc nhiều trong số các đột biến ngược đã đề cập trên đây có thể không được thực hiện vì các gốc cho và nhận tương ứng đã là giống nhau mà không cần các đột biến ngược.

Tốt hơn, nếu sự thay thế hoặc các đột biến ngược trong các biến thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người (được bảo tồn hoặc không) không có tác động đáng kể đến ái lực liên kết hoặc hiệu lực của mAb được làm tương thích với người, nghĩa là, khả năng gắn kết với tau của nó.

Các kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người còn được đặc trưng bởi khả năng gắn kết của chúng với bất kỳ hoặc toàn bộ tau được phosphoryl hóa, tau không được phosphoryl hóa, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau. Các kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, và 7G6 được làm tương thích với người còn được đặc trưng bởi khả năng cạnh tranh của chúng với 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 của chuột để gắn kết vào bất kỳ hoặc toàn bộ tau được phosphoryl hóa, tau không được phosphoryl hóa, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

D. Kháng thể khảm và được ngụy trang

[0003] Sáng chế đề xuất thêm các dạng khảm và được ngụy trang của các kháng thể không phải của người, cụ thể là các kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 trong các ví dụ.

Kháng thể khảm là kháng thể trong đó các vùng biến đổi trưởng thành của các chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể không phải của người (*ví dụ*, chuột) được kết hợp với các vùng

hằng định chuỗi nhẹ và nặng của người. Các kháng thể này gần như hoặc hoàn toàn giữ được tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể chuột, và là khoảng hai phần ba trình tự của người.

Kháng thể được ngụy trang là một loại kháng thể được làm tương thích với người mà vẫn giữ được một số và thường là toàn bộ các CDR và một số gốc khung vùng biến đổi không phải của người của kháng thể không phải của người nhưng thay thế các gốc khung vùng biến đổi khác mà có thể tham gia vào các epitop tế bào B hoặc T, ví dụ các gốc được bộc lộ (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) bằng các gốc từ các vị trí tương ứng của trình tự kháng thể người. Kết quả là một kháng thể trong đó các CDR hoàn toàn hoặc gần như là từ kháng thể không phải của người và các khung vùng biến đổi của kháng thể không phải của người được làm cho giống của người hơn nhờ các đột biến thể này. Các dạng được ngụy trang của kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 được bao gồm trong sáng chế.

E. Các kháng thể người

Các kháng thể người kháng tau hoặc một đoạn của nó được tạo ra bởi nhiều kỹ thuật khác nhau được mô tả dưới đây. Một số kháng thể người được chọn lọc bằng các thí nghiệm liên kết cạnh tranh, bằng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn của Winter, trên đây, hoặc theo cách khác, để có cùng tính đặc hiệu epitop với kháng thể chuột cụ thể, chẳng hạn như một trong số các kháng thể đơn dòng của chuột được mô tả trong các ví dụ. Các kháng thể người cũng có thể được sàng lọc về tính đặc hiệu epitop cụ thể bằng cách chỉ sử dụng một đoạn của tau làm kháng nguyên đích, và/hoặc bằng cách sàng lọc các kháng thể kháng tập hợp các biến thể của tau.

Các phương pháp sản sinh kháng thể người bao gồm phương pháp trioma của Oestberg và đồng tác giả, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, Patent Mỹ số 4,634,664; và Engleman và đồng tác giả, Patent Mỹ số 4,634,666, sử dụng chuột chuyển gen mang các gen globulin miễn dịch người (xem, ví dụ, Lonberg và đồng tác giả, WO93/12227 (1993); US 5,877,397; US 5,874,299; US 5,814,318; US 5,789,650; US 5,770,429; US 5,661,016; US 5,633,425; US 5,625,126; US 5,569,825; US 5,545,806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); và Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)) các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn (xem, ví dụ, Dower và đồng tác giả, WO 91/17271; McCafferty và đồng tác giả, WO 92/01047; US 5,877,218; US 5,871,907; US 5,858,657; US 5,837,242; US 5,733,743; và US 5,565,332); và các phương pháp được mô tả trong

WO 2008/081008 (ví dụ, làm bất tử dòng tế bào B nhớ được phân lập từ người, ví dụ, bằng EBV, sàng lọc về các đặc điểm mong muốn, và tách dòng và biểu hiện các dạng tái tổ hợp).

F. Lựa chọn vùng hằng định

Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể khảm, được nguy trang hoặc được làm tương thích với người có thể được gắn kết với ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Việc chọn vùng hằng định một phần tùy thuộc vào tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, tác dụng thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể và/hoặc tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể có được mong muốn hay không. Ví dụ, các isotyp IgG1 và IgG3 của người có tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể và các isotyp IgG2 và IgG4 của người thì không. IgG1 và IgG3 của người cũng cảm ứng các chức năng hiệu ứng qua trung gian tế bào mạnh hơn so với IgG2 và IgG4 của người. Các vùng hằng định chuỗi nhẹ có thể là lambda hoặc kappa. Các quy ước đánh số cho vùng hằng định bao gồm cách đánh số EU (Edelman, G. M. và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969)), cách đánh số Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, cách đánh số đơn nhất IMGT (Lefranc M. -P. và đồng tác giả, IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, *Dev. Comp. Immunol.*, 29, 185-203 (2005), và cách đánh số exon IMGT (Lefranc, như trên).

Một hoặc một số axit amin ở các đầu cùng amino hoặc carboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc nặng, chẳng hạn như lysin đầu cùng C của chuỗi nặng, có thể bị khuyết hoặc được tạo dẫn xuất ở một phần hoặc toàn bộ phân tử. Các đột biến thể có thể được tạo ra trong vùng hằng định để làm giảm hoặc làm tăng chức năng hiệu ứng như tác dụng gây độc tế bào qua trung gian bổ thể hoặc ADCC (xem tài liệu, ví dụ, Winter và đồng tác giả, patent Mỹ số 5,624,821; Tso và đồng tác giả, Patent Mỹ số 5,834,597; và Lazar và đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài thời gian bán thải ở người (xem tài liệu, ví dụ, Hinton và đồng tác giả, *J. Chem.* 279:6213, 2004). Các đột biến thể được lấy làm ví dụ bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (cách đánh số EU được sử dụng trong đoạn này cho vùng hằng định) để làm tăng thời gian bán thải của kháng thể. Đột biến thể ở 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 (xem, ví dụ, US 6,624,821). Đột biến

thể alanin ở các vị trí 234, 235, và 237 của IgG1 người có thể được sử dụng để làm giảm chức năng hiệu ứng. Một số kháng thể có đột biến thể alanin ở các vị trí 234, 235 và 237 của IgG1 người để làm giảm chức năng hiệu ứng. Tùy ý, các vị trí 234, 236 và/hoặc 237 ở IgG2 của người được thay thế bằng alanin và vị trí 235 bằng glutamin (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,624,821). Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329, và 331 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 318, 320, và 322 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và/hoặc 235 được thay thế bằng alanin và/hoặc vị trí 329 được thay thế bằng glyxin. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và 235 được thay thế bằng alanin. Trong một số kháng thể, isotyp này là IgG2 hoặc IgG4 người.

Các kháng thể có thể được thể hiện ở dạng các tetrame chứa hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, ở dạng các chuỗi nặng, các chuỗi nhẹ riêng biệt, ở dạng Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, hoặc ở dạng các kháng thể mạch đơn trong đó các miền biến đổi trưởng thành của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết qua đoạn đệm.

Các vùng hằng định của người thể hiện sự biến đổi alotyp và biến đổi isoalotyp giữa các cá thể khác nhau, tức là, các vùng hằng định có thể khác nhau ở các cá thể khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí đa hình. Các isoalotyp khác alotyp ở chỗ huyết thanh nhận diện isoalotyp gắn kết với vùng không đa hình của một hoặc nhiều isotyp khác. Do đó, ví dụ, một vùng hằng định chuỗi nặng khác là của IgG1 G1m3 có hoặc không có lysin đầu cùng C. Việc đề cập đến vùng hằng định của người bao gồm vùng hằng định có alotyp tự nhiên bất kỳ hoặc hoán vị bất kỳ của các gốc chiếm các vị trí trong các alotyp tự nhiên.

G. Biểu hiện kháng thể tái tổ hợp

Nhiều phương pháp đã được biết để tạo ra các kháng thể khảm và được làm tương thích với người bằng cách sử dụng dòng tế bào biểu hiện kháng thể (ví dụ, tế bào lai). Ví dụ, các vùng biến đổi globulin miễn dịch của các kháng thể có thể được tách dòng và giải trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ. Trong một phương pháp, vùng VH biến đổi chuỗi nặng được tách dòng bằng RT-PCR bằng cách sử dụng mARN được tạo ra từ các tế bào lai. Các đoạn môi liên ứng được sử dụng cho peptit dẫn đầu vùng VH chứa codon khởi đầu dịch mã làm đoạn môi 5' và đoạn môi 3' đặc hiệu vùng hằng định g2b. Các đoạn môi được lấy làm ví dụ được mô tả trong công bố patent Mỹ số US

2005/0009150 bởi Schenk và đồng tác giả (sau đây gọi là “Schenk”). Các trình tự từ nhiều dòng, thu được độc lập có thể được so sánh để đảm bảo không có thay đổi nào được đưa vào trong quá trình khuếch đại. Trình tự của vùng VH cũng có thể được xác định hoặc được xác nhận bằng cách giải trình tự đoạn VH thu được bằng hệ phương pháp 5' RACE RT-PCR và đoạn môi đặc hiệu 3' g2b.

Vùng VL biến đổi chuỗi nhẹ có thể được tách dòng theo cách tương tự. Trong một phương pháp tiếp cận, tập hợp đoạn môi liên ứng được thiết kế để khuếch đại các vùng VL bằng cách sử dụng đoạn môi 5' được thiết kế để lai với vùng VL chứa codon khởi đầu dịch mã và đoạn môi 3' đặc hiệu với vùng Ck xuôi dòng của vùng nối V-J. Trong phương pháp tiếp cận thứ hai, hệ phương pháp 5'RACE RT-PCR được sử dụng để tách dòng cADN mã hóa VL. Các đoạn môi điển hình được mô tả trong Schenk, trên đây. Các trình tự đã tách dòng này sau đó được kết hợp với các trình tự mã hóa các vùng hằng định của người (hoặc dạng khác không phải của người).

Trong một phương pháp tiếp cận, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thao tác di truyền lại để mã hóa các trình tự cho cắt nối xuôi dòng của các khớp nối VDJ hoặc VJ tương ứng và được tách dòng vào vectơ biểu hiện động vật có vú, như pCMV-hy1 đối với chuỗi nặng và pCMV-Mcl đối với chuỗi nhẹ. Các vectơ này mã hóa các vùng hằng định $\gamma 1$ và Ck của người như các đoạn exon xuôi dòng của caset vùng biến đổi đã được gắn xen. Sau khi kiểm tra trình tự, vectơ biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào CHO để tạo ra các kháng thể khảm. Môi trường có điều kiện được thu gom 48 giờ sau chuyển nhiễm và được thử nghiệm bằng phân tích thẩm tách tây về khả năng sản sinh kháng thể hoặc bằng ELISA về khả năng gắn kết kháng nguyên. Các kháng thể khảm này được làm tương thích với người như được mô tả trên đây.

Các kháng thể khảm, được nguy trang, được làm tương thích với người, và kháng thể người thường được tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Các cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp thường bao gồm trình tự kiểm soát biểu hiện được liên kết chức năng với các trình tự mã hóa của các chuỗi kháng thể, bao gồm các yếu tố kiểm soát biểu hiện kết hợp tự nhiên hoặc khác loại, chẳng hạn như trình tự khởi động. Các trình tự kiểm soát biểu hiện này có thể là các hệ trình tự khởi động trong các vectơ có khả năng biến nạp hoặc chuyển nhiễm các tế bào chủ có nhân điển hình hoặc tiền nhân. Khi vectơ này được đưa vào vật chủ thích hợp, vật chủ này được nuôi trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện ở mức độ

cao các trình tự nucleotit này và để thu gom và tinh chế các kháng thể phản ứng chéo.

Các vector biểu hiện này có thể sao chép được trong các sinh vật chủ như là các episom hoặc như một phần nguyên vẹn của ADN nhiễm sắc thể vật chủ. Thông thường, các vector biểu hiện chứa gen đánh dấu lựa chọn, *ví dụ*, tính kháng ampicilin hoặc kháng hygromycin, để cho phép phát hiện các tế bào đã được biến nạp bằng các trình tự ADN mong muốn.

E. coli là một vật chủ tiền nhân hữu ích để biểu hiện các kháng thể, cụ thể là các đoạn kháng thể. Vi khuẩn, chẳng hạn như nấm men, cũng là hữu ích cho việc biểu hiện. *Saccharomyces* là vật chủ nấm men với các vector thích hợp có các trình tự kiểm soát biểu hiện, gốc sao chép, các trình tự kết thúc, và các yếu tố tương tự nếu muốn. Các trình tự khởi động điển hình bao gồm 3-phosphoglycerat kinaza và các enzym thủy phân đường khác. Các trình tự khởi động nấm men cảm ứng được bao gồm, trong số các loại khác, các trình tự khởi động từ alcohol dehydrogenaza, isoxytocrom C, và các enzym chịu trách nhiệm về việc sử dụng maltoza và galactoza.

Các tế bào động vật có vú có thể được sử dụng để biểu hiện các đoạn nucleotit mã hóa các globulin miễn dịch hoặc các đoạn của chúng. Xem Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Nhiều dòng tế bào chủ thích hợp có khả năng tiết ra các protein khác loại nguyên vẹn đã được phát triển, và bao gồm các dòng tế bào CHO, nhiều dòng tế bào COS khác nhau, các tế bào HeLa, các tế bào HEK293, các tế bào L, và các tế bào u tủy không sản sinh kháng thể bao gồm Sp2/0 và NS0. Các tế bào này có thể không phải của người. Các vector biểu hiện cho các tế bào này có thể bao gồm các trình tự kiểm soát biểu hiện, như gốc sao chép, trình tự khởi động, trình tự tăng cường (Queen và đồng tác giả, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), và các vị trí thông tin xử lý cần thiết, như các vị trí liên kết ribosom, các vị trí cắt nối ARN, các vị trí polyadenyl hóa, và các trình tự kết thúc phiên mã. Các trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm các trình tự khởi động thu được từ các gen nội sinh, cytomegalovirus, SV40, adenovirut, bovine papillomavirus, và tương tự. Xem Co và đồng tác giả, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Ngoài ra, các trình tự mã hóa kháng thể có thể được đưa vào các gen chuyển để đưa vào bộ gen của động vật chuyển gen và biểu hiện tiếp trong sữa của động vật chuyển gen (*xem, ví dụ*, patent Mỹ số 5,741,957; patent Mỹ số 5,304,489; và patent Mỹ số 5,849,992). Các gen chuyển thích hợp bao gồm các trình tự mã hóa cho chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng

được liên kết chức năng với trình tự khởi động và trình tự tăng cường từ gen đặc hiệu tuyến vú, như casein hoặc beta lactoglobulin.

Các vector chứa các đoạn ADN cần quan tâm có thể được chuyển vào tế bào chủ bằng các phương pháp tùy theo loại tế bào chủ. Ví dụ, phương pháp chuyển nhiễm canxi clorua thường được sử dụng cho các tế bào tiền nhân, trong khi đó phương pháp xử lý canxi phosphat, xung điện, chuyển gen bằng liposom, kỹ thuật bắn gen, hoặc chuyển nhiễm dựa vào virus có thể được sử dụng cho các tế bào chủ khác. Các phương pháp khác được sử dụng để biến nạp tế bào động vật có vú bao gồm sử dụng polybrene, dung hợp tế bào trần, liposom, xung điện, và tiêm tế bào. Để tạo ra các động vật chuyển gen, các gen chuyển có thể được tiêm tế bào vào noãn bào đã thụ tinh hoặc có thể được đưa vào bộ gen của tế bào gốc phôi, và nhân của các tế bào này được chuyển vào noãn bào đã được khoét nhân.

(Các) vector mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được đưa vào môi trường nuôi cấy tế bào, các phân gộp tế bào có thể được sàng lọc về năng suất phát triển và chất lượng sản phẩm trong môi trường không chứa huyết thanh. Sau đó, các phân gộp tế bào có năng suất cao nhất có thể được tách dòng tế bào đơn lẻ dựa vào FACS để tạo ra các dòng đơn dòng. Năng suất cụ thể trên 50 pg hoặc 100 pg mỗi tế bào mỗi ngày, mà tương ứng với các hiệu giá sản phẩm lớn hơn 7,5 g/L môi trường nuôi cấy, có thể được sử dụng. Các kháng thể được sinh ra bởi các dòng tế bào đơn lẻ cũng có thể được kiểm tra về độ đục, các đặc điểm lọc, PAGE, IEF, quét UV, HP-SEC, lập bản đồ hydrat cacbon-oligosacarit, đo phổ khối lượng, và thử nghiệm liên kết, chẳng hạn như ELISA hoặc Biacore. Sau đó dòng được chọn có thể được đưa vào nhiều lọ thủy tinh và được bảo quản đông lạnh để sử dụng tiếp.

Khi đã được biểu hiện, các kháng thể có thể được tinh chế theo các quy trình chuẩn trong lĩnh vực này, bao gồm bắt protein A, tinh chế HPLC, sắc ký cột, điện di gel và kỹ thuật tương tự (*xem tổng quan*, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Hệ phương pháp để sản xuất thương mại các kháng thể có thể được sử dụng, bao gồm tối ưu hóa codon, chọn lọc trình tự khởi động, chọn lọc các yếu tố phiên mã, chọn lọc gen kết thúc, tách dòng tế bào đơn lẻ không huyết thanh, tạo ngân hàng tế bào, sử dụng các gen đánh dấu lựa chọn để khuếch đại số lượng bản sao, gen kết thúc CHO, hoặc cải thiện hiệu giá protein (*xem, ví dụ*, US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388;

W02009/027471; và US 5,888,809).

IV. Kháng nguyên hoạt động

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến tau ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng chất gây ra đáp ứng miễn dịch kháng tau. Chất được sử dụng để gây miễn dịch chủ động này có tác dụng cảm ứng ở bệnh nhân cùng loại kháng thể đã mô tả liên quan đến phương pháp gây miễn dịch thụ động trên đây. Một số phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng nguyên chứa epitop mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 5G8 với phác đồ hữu hiệu để tạo ra kháng thể kháng tau. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa peptit tau có đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 5G8. Trong các phương pháp khác, kháng nguyên chứa epitop mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 6A10 được sử dụng. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa peptit tau có đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 6A10. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa epitop mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 8A4 được sử dụng. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa peptit tau có đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 8A4. Trong các phương pháp khác, kháng nguyên chứa epitop mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 7G6 được sử dụng. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa epitop mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 3D6 được sử dụng. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa peptit tau có đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể 3D6. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa peptit tau có đến 20 axit amin liên tục của SEQ ID NO:3 được sử dụng, trong đó ít nhất hai trong số các kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, 7G6, và 3D6 gắn kết đặc hiệu với peptit tau. Trong một số phương pháp, kháng nguyên chứa epitop mà gắn kết đặc hiệu với nhiều hơn một trong số các kháng thể đã đề cập trên đây, epitop này bao gồm peptit có 4-11 axit amin liên tục từ các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3 hoặc các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3, hoặc 4-11 axit amin liên tục từ các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3 và các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3. Trong một số phương pháp, epitop peptit tau bao gồm 4-11 axit amin liên tục từ các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3 hoặc từ các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3. Trong các phương pháp khác, epitop peptit tau bao gồm hai đoạn axit amin liên tục, một đoạn từ các gốc 199-213 của SEQ ID NO:3, đoạn còn lại từ các gốc 262-276 của SEQ ID NO:3, trong đó hai đoạn liên tục này cùng bao gồm 4-11 axit amin.

Để cảm ứng các kháng thể gắn kết với cùng một epitop hoặc epitop gộp lên nhau với 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 hoặc 3D6, tính đặc hiệu epitop của các kháng thể này có thể được lập bản đồ (ví dụ, bằng cách kiểm tra khả năng gắn kết với một loạt peptit gộp lên nhau kéo dài tau). Sau đó một đoạn của tau bao gồm hoặc chứa hoặc gộp lên epitop này có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Các đoạn này thường được sử dụng ở dạng không được phosphoryl hóa.

Chất mang và tá dược khác loại, nếu được sử dụng có thể là giống như được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng, nhưng cũng có thể được chọn vì thích hợp để làm thuốc để sử dụng cho người hơn. Các chất mang thích hợp bao gồm albumin huyết thanh, hemoxyanin của loài ốc keyhole limpet, các phân tử globulin miễn dịch, thyroglobulin, albumin trứng, biến độc tố uốn ván, hoặc biến độc tố từ vi khuẩn gây bệnh khác, như vi khuẩn gây bệnh bạch hầu (ví dụ, CRM197), *E. coli*, tả, hoặc *H. pylori*, hoặc dẫn xuất độc tố nhược động. Các epitop tế bào T cũng là các phân tử mang thích hợp. Một số thể liên hợp có thể được tạo ra bằng cách liên kết các chất theo sáng chế với phân tử polyme kích thích miễn dịch (ví dụ, tripalmitoyl-S-glyxerin xystein (Pam₃Cys), mannan (polyme mannoza), hoặc glucan (polyme α β 1 $\rightarrow$ 2)), xytokin (ví dụ, peptit IL-1, IL-1 α và β , IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF), và các chemokin (ví dụ, MIP1- α và β , và RANTES). Các kháng nguyên có thể được gắn kết với các chất mang có hoặc không có các axit amin đệm (ví dụ, gly-gly). Các chất mang khác bao gồm các hạt tương tự virus. Các hạt tương tự virus (VLP), còn được gọi là virion giả hoặc các hạt thu được từ virus, là các cấu trúc dưới đơn vị chứa nhiều bản sao của protein vỏ capsit và/hoặc protein vỏ ngoài virus có khả năng tự lắp ráp thành các VLP có cấu trúc đối xứng hình cầu xác định trên in vivo. (Powilleit, và đồng tác giả, (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) Ngoài ra, các kháng nguyên peptit có thể được gắn kết với ít nhất một epitop tế bào T nhân tạo có khả năng gắn kết với phần lớn các phân tử MHC Lóp II, như epitop pan DR ("PADRE"). PADRE được mô tả trong US 5,736,142, WO 95/07707, và Alexander J và đồng tác giả, Immunity, 1:751-761 (1994). Các kháng nguyên hoạt động có thể được trình diện ở dạng đa phân tử trong đó nhiều bản sao của kháng nguyên và/hoặc chất mang của nó được trình diện dưới dạng phân tử cộng hóa trị đơn.

Nhiều đoạn thường được sử dụng với các tá dược được dùng. Tá dược này làm tăng hiệu giá của các kháng thể được cảm ứng và/hoặc ái lực gắn kết của các kháng thể được cảm ứng so với trường hợp peptit này được sử dụng một mình. Nhiều loại tá dược khác

nhau có thể được sử dụng kết hợp với đoạn kháng nguyên của tau để gây ra đáp ứng miễn dịch. Tốt hơn nếu các tá được làm tăng đáp ứng nội tại với kháng nguyên mà không gây ra sự thay đổi cấu hình trong kháng nguyên này mà ảnh hưởng đến dạng định tính của đáp ứng này. Các tá được ưu tiên hơn bao gồm các muối nhôm, như nhôm hydroxit và nhôm phosphat, 3 De-O-axyl hóa monophosphoryl lipit A (MPL™) (xem GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, hiện nay là một phần của Corixa). Stimulon™ QS-21 là triterpen glycosit hoặc saponin được phân lập từ vỏ của cây *Quillaja Saponaria* Molina được tìm thấy ở Nam Mỹ (xem Kensil và đồng tác giả, trong *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; now Antigenics, Inc., New York, NY). Các tá được khác là các nhũ tương dầu trong nước (như squalen hoặc dầu lạc), tùy ý kết hợp với các chất kích thích miễn dịch, như monophosphoryl lipit A (xem Stoute và đồng tác giả, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), các polyme pluronic, và vi khuẩn mycobacterium bị diệt. Các tá được Ribi là các nhũ tương dầu trong nước. Ribi chứa dầu chuyển hóa được (squalen) được tạo nhũ tương với nước muối chứa Tween 80. Ribi còn chứa các sản phẩm mycobacterium được tinh chế mà có tác dụng làm chất kích thích miễn dịch và monophosphoryl lipit A của vi khuẩn. Một tá được khác là CpG (WO 98/40100). Các tá được có thể được sử dụng làm thành phần của dược phẩm cùng với hoạt chất hoặc có thể được sử dụng riêng, trước, đồng thời với, hoặc sau khi sử dụng dược chất.

Các dạng tương tự của các đoạn tự nhiên của tau mà cảm ứng các kháng thể kháng tau cũng có thể được sử dụng. Ví dụ, một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các L-axit amin có thể được thế bằng D axit amin trong các peptit này. Ngoài ra, thứ tự của các axit amin có thể được đảo ngược (retro peptit). Tùy ý một peptit bao gồm tất cả các D-axit amin theo thứ tự đảo ngược (retro-inverso peptit). Các peptit và các hợp chất khác mà không nhất thiết phải có sự tương đồng trình tự axit amin đáng kể với các peptit tau nhưng đóng vai trò là các giả peptit tau và cảm ứng đáp ứng miễn dịch tương tự. Các kháng thể kháng idiotyp kháng các kháng thể đơn dòng với tau như được mô tả trên đây cũng có thể được sử dụng. Các kháng thể kháng Id này bất chức kháng nguyên và tạo ra đáp ứng miễn dịch với nó (xem *Essential Immunology*, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA xuất bản lần 6, trang 181).

Các peptit (và tùy ý chất mang được dung hợp với peptit này) cũng có thể được sử

dùng ở dạng axit nucleic mã hóa peptit này và được biểu hiện tại chỗ ở bệnh nhân. Đoạn axit nucleic mã hóa kháng nguyên thường được gắn kết với các yếu tố điều hòa, như trình tự khởi động và trình tự tăng cường mà cho phép biểu hiện đoạn ADN này trong tế bào đích dự kiến của bệnh nhân. Để biểu hiện trong các tế bào máu, như được mong muốn để cảm ứng đáp ứng miễn dịch, trình tự khởi động và yếu tố tăng cường từ các gen globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng hoặc trình tự khởi động rất sớm trung gian chính CMV và các gen tăng cường là thích hợp để điều khiển sự biểu hiện. Các yếu tố điều hòa được liên kết và các trình tự mã hóa thường được tách dòng vào vector. Các kháng thể cũng có thể được sử dụng ở dạng các axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ kháng thể. Nếu cả chuỗi nặng và nhẹ đều có mặt, các chuỗi này tốt hơn nếu được liên kết như là một kháng thể chuỗi đơn. Các kháng thể để sử dụng thụ động cũng có thể được tạo ra *ví dụ*, bằng sắc ký ái lực từ huyết thanh của bệnh nhân được điều trị bằng các kháng nguyên peptit.

ADN có thể được phân phối ở dạng trần (*nghĩa là*, không có vật liệu keo hoặc vật liệu bao nang). Ngoài ra nhiều hệ vector virus có thể được sử dụng bao gồm các hệ retrovirus (xem, *ví dụ*, Lawrie và Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); các vector adenovirus {xem, *ví dụ*, Bett và đồng tác giả, *J. Virol.* 67, 591-1 (1993)}; vector virus liên hợp adeno {xem, *ví dụ*, Zhou và đồng tác giả, *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)}, các vector virus từ họ pox bao gồm các virus vaccinia và virus pox ở chim, các vector virus từ chi virus alpha như các vector thu được từ virus Sindbis và Semliki Forest (xem, *ví dụ*, Dubensky và đồng tác giả, *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), virus gây viêm não ngựa Venezuela (xem US 5,643,576) và rhabdovirus, như virus gây bệnh viêm miệng mụn nước (xem WO 96/34625) và các papillomavirus (Ohe và đồng tác giả, *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo và đồng tác giả, WO 94/12629 và Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

ADN mã hóa kháng nguyên, hoặc vector chứa nó, có thể được đóng gói vào các liposom. Các lipid thích hợp và các chất tương tự liên quan được mô tả bởi US 5,208,036, US 5,264,618, US 5,279,833, và US 5,283,185. Các vector và ADN mã hóa kháng nguyên cũng có thể được hấp thụ vào hoặc được liên hợp với các chất mang dạng hạt, *ví dụ* về chúng bao gồm polymethyl methacrylate polyme và polylactit và poly(lactit-co-glycolit), (xem, *ví dụ*, McGee và đồng tác giả, *J. Micro Encap.* 1996).

H. Các thử nghiệm sàng lọc kháng thể

Các kháng thể có thể được sàng lọc ban đầu về tính đặc hiệu gắn kết dự kiến như được mô tả trên đây. Các kháng nguyên hoạt động cũng có thể được sàng lọc như vậy về khả năng cảm ứng các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết này. Trong trường hợp này, kháng nguyên hoạt động được sử dụng để gây miễn dịch động vật thí nghiệm và huyết thanh thu được được kiểm tra về tính đặc hiệu gắn kết thích hợp.

Sau đó các kháng thể có tính đặc hiệu gắn kết mong muốn có thể được kiểm tra trong các mô hình tế bào và động vật. Các tế bào được sử dụng để sàng lọc như vậy tốt hơn, nếu là các tế bào neuron. Mô hình tế bào của bệnh học tau đã được báo cáo trong đó các tế bào u nguyên bào thần kinh được chuyển nhiễm với miền lặp bốn của tau, tùy ý với đột biến liên quan đến bệnh học tau (ví dụ, delta K280, xem Khlistunova, Current Alzheimer Research 4, 544-546 (2007)). Trong một mô hình khác, tau được cảm ứng trong dòng tế bào u nguyên bào thần kinh N2a bằng cách bổ sung doxycyclin. Mô hình tế bào này cho phép nghiên cứu về độc tính của tau với các tế bào ở trạng thái hòa tan hoặc kết tụ, hình dạng của các khối kết tụ tau sau khi gây ra sự biểu hiện gen tau, sự hòa tan khối kết tụ tau sau khi dừng biểu hiện gen một lần nữa, và tác dụng của các kháng thể trong việc ức chế sự tạo thành các khối kết tụ tau hoặc tách chúng ra.

Các kháng thể hoặc các kháng nguyên hoạt động cũng có thể được sàng lọc trong các mô hình động vật chuyển gen của các bệnh bị gây ra bởi tau. Các động vật chuyển gen này có thể mang gen chuyển tau (ví dụ, bất kỳ trong số các đồng phân người) và tùy ý gen chuyển APP người ngoài các gen khác, như kinaza mà phosphoryl hóa tau, ApoE, presenilin hoặc alpha synuclein. Các động vật chuyển gen này được bố trí để phát triển ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh bị gây ra bởi tau.

Động vật chuyển gen được lấy làm ví dụ là dòng K3 của chuột (Itner và đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(41):15997-6002 (2008)). Các chuột này có gen chuyển tau người với đột biến K 369 I (đột biến này liên quan đến bệnh Pick) và trình tự khởi động Thy 1. 2. Mô hình này thể hiện quá trình thoái hóa thần kinh, thiếu vận động và thoái hóa các sợi hướng tâm và các tế bào hạt tiểu não nhanh. Động vật khác điển hình là dòng JNPL3 của chuột. Chuột có gen chuyển tau người với đột biến P301L (đột biến này liên quan đến bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương) và trình tự khởi động Thy 1. 2 (Taconic, Germantown, N. Y., Lewis, và đồng tác giả, Nat Genet. 25:402-405 (2000)). Các chuột này có quá trình

thoái hóa thần kinh từ từ. Chuột phát triển các đám rối thần kinh trong một số vùng não và dây rốn, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ). Đây là mô hình hoàn hảo để nghiên cứu các hậu quả của sự phát triển đám rối và để sàng lọc liệu pháp mà có thể ức chế sự tạo thành các khối kết tụ này. Ưu điểm khác của các động vật này là sự tấn công của bệnh tương đối sớm. Trong dòng đồng hợp tử, các bất thường về hành vi liên quan đến bệnh học tau có thể được quan sát thấy ở sớm nhất là 3 tháng, nhưng các động vật vẫn tương đối khỏe mạnh ít nhất đến 8 tháng tuổi. Nói cách khác, ở 8 tháng tuổi, các động vật đi loanh quanh, tự ăn, và có thể thực hiện các nhiệm vụ hành vi đủ tốt để cho phép theo dõi được tác dụng điều trị. Việc gây miễn dịch chủ động cho các con chuột này trong 6-13 tháng bằng - AI wI KLH-PHF-1 tạo ra các hiệu giá khoảng 1.000 và thể hiện các đám rối thần kinh ít hơn, pSer422 ít hơn, và sự sụt cân được giảm đi so với chuột đối chứng không được điều trị.

Hoạt tính của các kháng thể hoặc hoạt chất có thể được đánh giá bằng nhiều tiêu chuẩn khác nhau bao gồm giảm lượng tau toàn phần hoặc tau được phosphoryl hóa, giảm các đặc điểm bệnh học khác, như các lắng đọng dạng tinh bột của A β , và tác dụng ức chế hoặc làm chậm hoặc các khuyết tật hành vi. Các kháng nguyên hoạt động cũng có thể được kiểm tra về khả năng cảm ứng các kháng thể trong huyết thanh. Cả kháng nguyên chủ động và thụ động đều có thể được kiểm tra về sự xâm nhập của kháng thể qua hàng rào máu não vào não của động vật chuyển gen. Các kháng thể hoặc đoạn cảm ứng kháng thể cũng có thể được kiểm tra ở động vật linh trưởng không phải là người mà phát triển các triệu chứng của bệnh được đặc trưng bởi tau một cách tự nhiên hoặc do cảm ứng. Các thử nghiệm trên kháng thể hoặc hoạt chất thường được thực hiện kết hợp với đối chứng, trong đó một thử nghiệm song song được thực hiện ngoại trừ là kháng thể hoặc hoạt chất không có mặt (ví dụ, được thay thế bằng tá dược lỏng). Sau đó tác dụng làm giảm, trì hoãn hoặc ức chế các dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh do kháng thể hoặc hoạt chất được thử nghiệm có thể được đánh giá so với đối chứng.

V. Các bệnh nhân phù hợp với việc điều trị

Sự có mặt của các đám rối thần kinh đã được phát hiện ra ở một số bệnh bao gồm bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân,

bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), và bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Các phác đồ này cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bất kỳ trong số các bệnh này. Do mối liên quan rộng rãi giữa các tình trạng và bệnh thần kinh với tau, các phác đồ hiện nay có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa cho đối tượng bất kỳ thể hiện các mức nồng độ tau hoặc tau được phosphoryl hóa gia tăng (ví dụ, trong CSF) so với giá trị trung bình ở các cá thể không bị bệnh thần kinh. Các phác đồ này cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thần kinh ở các cá thể có đột biến ở tau liên quan đến bệnh thần kinh. Các phương pháp này là đặc biệt thích hợp để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer, và cụ thể là ở các bệnh nhân.

Các bệnh nhân thích hợp để điều trị bao gồm các cá thể có nguy cơ bị bệnh nhưng chưa thể hiện các triệu chứng, cũng như các bệnh nhân đang thể hiện các triệu chứng. Các bệnh nhân có nguy cơ mắc bệnh bao gồm các bệnh nhân có nguy cơ mắc bệnh do di truyền đã biết. Các cá thể này bao gồm các đối tượng có họ hàng đã từng mắc bệnh này, và các đối tượng có nguy cơ được xác định bằng cách phân tích các dấu hiệu di truyền hoặc hóa sinh. Các dấu hiệu di truyền về nguy cơ mắc bệnh bao gồm các đột biến ở tau, như các đột biến đã thảo luận trên đây, cũng như các đột biến trong các gen khác liên quan đến bệnh thần kinh. Ví dụ, alen ApoE4 ở dạng dị hợp tử và thậm chí còn hơn như vậy ở dạng đồng hợp tử có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh Alzheimer. Các dấu hiệu khác về nguy cơ mắc bệnh Alzheimer bao gồm các đột biến ở gen APP, cụ thể là các đột biến ở vị trí 717 và các vị trí 670 và 671 được gọi lần lượt là các đột biến Hardy và Swedish, các đột biến ở gen presenilin, PS1 và PS2, tiền sử gia đình về AD, bệnh tăng cholesterol huyết hoặc chứng xơ vữa động mạch. Các cá thể đang mắc bệnh Alzheimer có thể được nhận biết bằng cách chụp PET, từ chứng suy giảm nhận thức đặc trưng, cũng như sự có mặt của các yếu tố nguy cơ được mô tả trên đây. Ngoài ra, nhiều xét nghiệm chẩn đoán là sẵn có để xác định các cá thể mắc AD. Các xét nghiệm này bao gồm đo các mức nồng độ tau CSF hoặc phospho-tau và A β 42. Các mức nồng độ tau hoặc phospho-tau gia tăng và mức A β 42 giảm thể hiện sự có mặt của AD. Một số đột biến liên quan đến bệnh Parkinson. Ala30Pro hoặc Ala53, hoặc các đột biến trong các gen khác liên quan đến bệnh Parkinson như kinaza lập giàu leuxin, PARK8. Các cá thể cũng có thể được chẩn đoán với bất kỳ trong số các bệnh thần kinh

được đề cập trên đây theo tiêu chuẩn của DSM IV TR.

Ở các bệnh nhân không có triệu chứng, việc điều trị có thể bắt đầu ở độ tuổi bất kỳ (ví dụ, 10, 20, 30). Tuy nhiên, thông thường, không cần bắt đầu điều trị cho đến khi người bệnh 40, 50, 60 hoặc 70 tuổi. Thông thường, việc điều trị đòi hỏi nhiều liều trong một khoảng thời gian. Việc điều trị có thể được theo dõi bằng cách thử nghiệm các mức nồng độ kháng thể theo thời gian. Nếu đáp ứng này giảm, liều tăng cường được chỉ định. Trong trường hợp bệnh nhân mắc hội chứng Down tiềm tàng, việc điều trị có thể bắt đầu từ trước khi sinh bằng cách sử dụng dươc chất cho mẹ hoặc ngay sau khi sinh.

I. Các axit nucleic

Sáng chế đề xuất thêm các axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số các chuỗi nặng và nhẹ được mô tả trên đây (ví dụ, SEQ ID NO:7-8, 47-48, 49-50, 51-52, 53-54, 55, 59). Ví dụ SEQ ID NO:9 mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng 5G8 của chuột SEQ ID NO:47, và SEQ ID NO:10 mã hóa trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 5G8 của chuột SEQ ID NO:48. Tùy ý, các axit nucleic này mã hóa thêm peptit tín hiệu và có thể được biểu hiện với peptit tín hiệu được gắn kết với vùng hằng định. Các trình tự axit nucleic mã hóa có thể được liên kết chức năng với các trình tự điều hòa để đảm bảo sự biểu hiện của các trình tự mã hóa, chẳng hạn như trình tự khởi động, yếu tố tăng cường, vị trí liên kết ribosom, tín hiệu kết thúc phiên mã, và tương tự. Các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ có thể xuất hiện ở dạng được phân lập hoặc có thể được tách dòng vào một hoặc nhiều vector. Các axit nucleic này có thể được tổng hợp bằng, ví dụ, phương pháp tổng hợp trạng thái rắn hoặc PCR của các oligonucleotit gộp lên nhau. Các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ có thể được nối thành một axit nucleic liền kề, ví dụ, trong một vector biểu hiện, hoặc có thể là riêng biệt, ví dụ, mỗi axit nucleic được tách dòng vào vector biểu hiện riêng của nó.

J. Kháng thể liên hợp

Các kháng thể liên hợp mà gắn kết đặc hiệu với các kháng nguyên như tau, là hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của tau; theo dõi và đánh giá hiệu quả của các dươc chất đang được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái

đương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP); ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ của tau; ức chế hoặc làm giảm tau sự tạo sợi; làm giảm hoặc làm sạch các lắng đọng tau; ổn định cấu hình không độc của tau; hoặc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) ở bệnh nhân. Ví dụ, các kháng thể này có thể được liên hợp với các gốc điều trị khác, các protein khác, các kháng thể khác, và/hoặc các nhãn phát hiện được. Xem WO 03/057838; US 8,455,622. Các gốc điều trị này có thể là hợp chất bất kỳ mà có thể được sử dụng để điều trị, chống, cải thiện, phòng ngừa, hoặc cải thiện bệnh hoặc tình trạng không mong muốn ở bệnh nhân, như bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

Các gốc điều trị được liên hợp có thể bao gồm các chất gây độc tế bào, chất kim tế bào, chất dinh dưỡng thần kinh, chất bảo vệ thần kinh, chất điều trị bằng phóng xạ, chất điều hòa miễn dịch, hoặc chất có tác dụng sinh học bất kỳ mà tạo thuận lợi hoặc tăng cường tác dụng của kháng thể. Chất gây độc tế bào có thể là chất bất kỳ độc với tế bào. Chất kim tế bào có thể là chất bất kỳ ức chế sự tăng sinh của tế bào. Chất dinh dưỡng thần kinh có thể là chất bất kỳ, bao gồm các chất hóa học hoặc chứa protein, mà tăng cường sự nuôi dưỡng, sự sinh trưởng hoặc biệt hóa neuron. Chất bảo vệ thần kinh có thể là chất, bao gồm

các chất hóa học hoặc chứa protein, mà bảo vệ các noron khỏi quá trình chấn thương cấp tính hoặc các quá trình thoái hóa. Chất điều hòa miễn dịch có thể là chất bất kỳ mà kích thích hoặc ức chế sự phát triển hoặc sự duy trì đáp ứng miễn dịch. Chất điều trị bằng phóng xạ có thể là phân tử hoặc hợp chất bất kỳ mà phát ra phóng xạ. Nếu các gốc điều trị này được kết hợp với kháng thể đặc hiệu tau, như các kháng thể được mô tả ở đây, các gốc điều trị kết hợp này sẽ có ái lực đặc hiệu với các tế bào mắc bệnh liên quan đến tau so với các tế bào bình thường. Do đó, việc sử dụng các kháng thể được liên hợp này gắn đích trực tiếp các tế bào ung thư với tác dụng gây tổn thương tối thiểu đến các mô khỏe mạnh, bình thường xung quanh. Điều này có thể đặc biệt hữu ích đối với các gốc điều trị quá độc để được sử dụng riêng. Thêm vào đó, các lượng nhỏ hơn của các gốc điều trị này có thể được sử dụng.

Một số kháng thể này có thể được biến đổi để có tác dụng như các độc tố miễn dịch. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,194,594. Ví dụ, ricin, chất độc tế bào thu được từ thực vật, có thể được kết hợp với các kháng thể bằng cách sử dụng chất phản ứng hai chức S-axetylmercaptosuxinic anhydrit cho kháng thể này và suxinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat cho ricin. Xem Pietersz và đồng tác giả, *Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). Sự kết hợp này dẫn đến sự mất hoạt tính liên kết chuỗi B của ricin, trong khi không làm suy yếu khả năng gây độc của chuỗi A của ricin cũng như tác dụng của kháng thể này. Tương tự, saporin, chất ức chế cấu trúc ribosom, có thể được ghép với các kháng thể nhờ liên kết disulfua giữa các nhóm sulfhydryl được gắn xen hóa học. Xem Polito và đồng tác giả, *Leukemia* 18:1215-1222 (2004).

Một số kháng thể này có thể được gắn kết với các đồng vị phóng xạ. Ví dụ về các đồng vị phóng xạ bao gồm, ví dụ, yttri⁹⁰ (90Y), indi¹¹¹ (111In), ¹³¹I, ^{99m}Tc, bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, và Bismut²¹³. Sự liên kết các đồng vị phóng xạ với các kháng thể có thể được thực hiện với các chelat hai chức thông thường. Đối với liên kết bạc phóng xạ-111 và bạc phóng xạ-199, các cầu nối dựa trên lưu huỳnh có thể được sử dụng. Xem Hazra và đồng tác giả, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Liên kết của các đồng vị phóng xạ bạc có thể liên quan đến phản ứng khử globulin miễn dịch bằng axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ như 111In và 90Y, ibritumomab tiuxetan có thể được sử dụng và sẽ phản ứng với các chất đồng vị này để lần lượt tạo ra 111In-ibritumomab tiuxetan và 90Y-ibritumomab tiuxetan. Xem Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95

(2001).

Một số kháng thể này có thể được gắn kết với các gốc điều trị khác. Các gốc điều trị này có thể, ví dụ, gây độc tế bào, kìm tế bào, dinh dưỡng thần kinh, hoặc bảo vệ thần kinh. Ví dụ, các kháng thể có thể được liên hợp với các dược chất hóa trị liệu gây độc như maytansine, geldanamycin, chất ức chế tubulin như chất liên kết tubulin (ví dụ, auristatin), hoặc chất liên kết rãnh nhỏ như calicheamicin. Các gốc điều trị điển hình khác bao gồm các chất đã biết là hữu ích để điều trị, quản lý, hoặc cải thiện bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với các protein khác. Ví dụ, các kháng thể có thể được kết hợp với các Fynomer. Fynomer là các protein liên kết nhỏ (ví dụ, 7 kDa) thu được từ miền Fyn SH3 của người. Chúng có thể ổn định và hòa tan được, và chúng có thể thiếu các gốc xystein và các liên kết disulfua. Fynomer có thể được thao tác di truyền để gắn kết với các phân tử đích với cùng ái lực và tính đặc hiệu với các kháng thể. Chúng là thích hợp để tạo ra các protein dung hợp đa đặc hiệu dựa trên các kháng thể. Ví dụ, Fynomer có thể được dung hợp với đầu cùng N và/hoặc đầu cùng C của các kháng thể để tạo ra FynomAb đặc hiệu kép và đặc hiệu ba với các cấu trúc khác nhau. Các Fynomer có thể được lựa chọn bằng cách sử dụng các thư viện Fynomer nhờ các công nghệ sàng lọc sử dụng các thử nghiệm FACS, Biacore, và thử nghiệm dựa trên tế bào cho phép lựa chọn hiệu quả Fynomer có các đặc điểm tối ưu. Các ví dụ về Fynomer được mô tả trong Grabulovski và đồng tác giả, *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger và đồng tác giả, *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter và đồng tác giả, *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner và đồng tác giả, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013); và Brack và đồng tác giả, *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

Các kháng thể đã mô tả ở đây cũng có thể được kết hợp hoặc liên hợp với một hoặc nhiều kháng thể khác (ví dụ, để tạo ra các kháng thể cộng hợp đa loài). Các kháng thể khác

này có thể gắn kết với các epitop khác nhau trong tau hoặc có thể gắn kết với kháng nguyên đích khác.

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với nhãn phát hiện được. Các kháng thể này có thể được sử dụng, ví dụ, để chẩn đoán bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP), và/hoặc để đánh giá tác dụng điều trị. Các kháng thể này là đặc biệt hữu ích để thực hiện các kỹ thuật xác định như vậy ở đối tượng mắc hoặc dễ bị mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP), hoặc trong các mẫu sinh học thích hợp thu được từ các đối tượng này. Các nhãn phát hiện được điển hình mà có thể được kết hợp hoặc gắn kết với kháng thể bao gồm nhiều enzym khác nhau, như peroxidaza cây cải ngựa, phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; các nhóm giả, như streptavidin/biotin và avidin/biotin; các nguyên liệu huỳnh quang, như umbelliferone, floresxein, floresxein isothioxyanat, rođamin, diclotriazinylamin floresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; các nguyên liệu phát quang, như luminol; các nguyên liệu phát quang sinh học, như luciferaza, luxiferin, và aequorin; các nguyên liệu hoạt động phóng xạ, như bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, Bismuth²¹³, iot (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), cacbon (¹⁴C), lưu huỳnh (³⁵S), triti (³H), indi (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), tecneti (⁹⁹Tc), tali (²⁰¹Tl), gali (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladi (¹⁰³Pd), molybden (⁹⁹Mo), xenon (¹³³Xe), flo (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, và ¹¹⁷Tin; kim loại

phát xạ positron sử dụng nhiều kỹ thuật chụp cắt lớp phát xạ positron khác nhau; các ion kim loại thuận từ không có hoạt tính phóng xạ; và các phân tử được đánh dấu phóng xạ hoặc được gắn kết với các đồng vị phóng xạ đặc hiệu.

Sự liên kết các đồng vị phóng xạ với các kháng thể có thể được thực hiện bằng các chelat hai chức thông thường. Đối với liên kết bạc phóng xạ-111 và bạc phóng xạ-199, các cầu nối dựa trên lưu huỳnh có thể được sử dụng. Xem Hazra và đồng tác giả, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Liên kết của các đồng vị phóng xạ bạc có thể liên quan đến phản ứng khử globulin miễn dịch với axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ như 111In và 90Y, ibritumomab tiuxetan có thể được sử dụng và sẽ phản ứng với các chất đồng vị này để lần lượt tạo ra 111In-ibritumomab tiuxetan và 90Y-ibritumomab tiuxetan. Xem Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

Các gốc điều trị, các protein khác, các kháng thể khác, và/hoặc các nhãn phát hiện được có thể được kết hợp hoặc được liên hợp, trực tiếp hoặc gián tiếp qua phân tử trung gian (ví dụ, cầu nối), với kháng thể theo sáng chế. Xem, ví dụ, Arnon và đồng tác giả, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", trong *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld và đồng tác giả (eds.), trang 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom và đồng tác giả, "Antibodies For Drug Delivery", trong *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson và đồng tác giả (eds.), trang 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", trong *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera và đồng tác giả (eds.), trang 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", trong *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin và đồng tác giả (eds.), trang 303-16 (Academic Press 1985); và Thorpe và đồng tác giả, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982). Các cầu nối thích hợp bao gồm, ví dụ, các cầu nối cắt được và không cắt được. Các cầu nối khác nhau mà giải phóng các gốc điều trị, các protein, các kháng thể và/hoặc các nhãn phát hiện được đã kết hợp trong các điều kiện axit hóa hoặc khử, khi tiếp xúc với các proteaza đặc hiệu, hoặc trong các điều kiện xác định khác có thể được sử dụng.

VI. Dược phẩm và phương pháp sử dụng

Trong các ứng dụng điều trị dự phòng, kháng thể hoặc chất cảm ứng kháng thể hoặc

được phẩm chứa kháng thể này được sử dụng cho bệnh nhân nhạy cảm với, hoặc có nguy cơ bị bệnh (ví dụ, bệnh Alzheimer) theo phác đồ (liều, tần suất sử dụng và đường dùng) hữu hiệu để làm giảm nguy cơ, làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh, hoặc làm chậm sự khởi phát của ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh này. Cụ thể là, tốt hơn, nếu phác đồ này có tác dụng ức chế hoặc làm chậm sự tạo thành tau hoặc phospho-tau và các sợi tạo cặp được tạo thành từ nó trong não, và hoặc ức chế hoặc làm chậm tác dụng gây độc của nó và/hoặc ức chế/hoặc làm chậm sự phát triển của tình trạng khuyết tật hành vi. Trong các ứng dụng điều trị, kháng thể hoặc chất cảm ứng kháng thể được sử dụng cho bệnh nhân bị nghi ngờ, hoặc đã mắc bệnh (ví dụ, bệnh Alzheimer) theo phác đồ (liều, tần số và đường sử dụng) hữu hiệu để cải thiện hoặc ít nhất là ức chế sự hủy hoại thêm của ít nhất là một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh này. Cụ thể là, tốt hơn, nếu phác đồ này là hữu hiệu để làm giảm hoặc ít nhất là ức chế sự tăng thêm các mức nồng độ tau, phospho-tau, hoặc các sợi được tạo cặp được tạo ra từ nó, các tác dụng gây độc có liên quan và/hoặc tình trạng khuyết tật hành vi.

Một phác đồ được coi là hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa nếu từng bệnh nhân được điều trị thu được kết quả tốt hơn so với kết quả trung bình ở nhóm đối chứng gồm các bệnh nhân tương tự không được điều trị bằng các phương pháp theo sáng chế, hoặc nếu kết quả tốt hơn được chứng minh ở các bệnh nhân được điều trị so với các bệnh nhân đối chứng trong thử nghiệm lâm sàng có đối chứng (ví dụ, thử nghiệm giai đoạn II, giai đoạn II/III hoặc giai đoạn III) ở $p < 0,05$ hoặc 0,01 hoặc thậm chí ở mức 0,001.

Các liều hữu hiệu thay đổi tùy theo nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như cách thức sử dụng, vị trí đích, tình trạng sinh lý của bệnh nhân, bất kể bệnh nhân là người mang ApoE hay không, bất kể bệnh nhân là người hay động vật, các thuốc khác được sử dụng, và bất kể phương pháp điều trị là phòng ngừa hay chữa bệnh.

Các khoảng liều được lấy làm ví dụ cho các kháng thể là từ khoảng 0,01 đến 60 mg/kg, hoặc từ khoảng 0,1 đến 3 mg/kg hoặc 0,15-2 mg/kg hoặc 0,15-1,5 mg/kg, thể trọng của bệnh nhân. Kháng thể có thể được sử dụng với các liều hàng ngày, cách ngày, hàng tuần, hai tuần một lần, hàng tháng, hàng quý hoặc theo lịch bất kỳ khác được xác định bằng phân tích theo kinh nghiệm. Phương pháp điều trị được lấy làm ví dụ đòi hỏi sử dụng nhiều liều trong một khoảng thời gian dài, ví dụ, ít nhất là 6 tháng. Các phác đồ điều trị được lấy làm ví dụ khác đòi hỏi sử dụng hai tuần một lần hoặc một tháng một lần hoặc 3 đến 6 tháng

một lần.

Lượng hoạt chất để sử dụng chủ động thay đổi từ 0,1-500 μg trên mỗi bệnh nhân và thường xuyên hơn là từ 1-100 hoặc 1-10 μg mỗi lần tiêm để sử dụng cho người. Thời gian tiêm có thể thay đổi đáng kể từ một lần mỗi ngày, đến một lần một năm, đến một lần trong mười năm. Phác đồ điển hình bao gồm gây miễn dịch sau đó tiêm liều tăng cường giãn cách nhau các khoảng thời gian, như cách nhau các khoảng thời gian 6 tuần hoặc hai tháng. Một phác đồ khác bao gồm gây miễn dịch sau đó tiêm liều tăng cường 1, 2 và 12 tháng sau đó. Một phác đồ khác đòi hỏi việc tiêm mỗi hai tháng một lần suốt cuộc đời. Ngoài ra, các lần tiêm tăng cường có thể dựa trên cơ sở không lặp lại đều đặn như được chỉ ra bằng cách theo dõi đáp ứng miễn dịch.

Tốt hơn, nếu các kháng thể hoặc các chất cảm ứng kháng thể được sử dụng qua đường ngoại vi (tức là, đường trong đó kháng thể được sử dụng hoặc được cảm ứng đi qua hàng rào máu não để tới được vị trí dự định trong não). Các đường sử dụng bao gồm khu trú, trong tĩnh mạch, dùng qua đường miệng, dùng dưới da, dùng trong động mạch, dùng trong hộp sọ, dùng nội tủy mạc, dùng trong màng bụng, dùng trong mũi, trong mắt hoặc trong cơ. Các đường sử dụng kháng thể ưu tiên hơn là trong tĩnh mạch và dưới da. Các đường gây miễn dịch chủ động được ưu tiên hơn là dưới da và trong cơ. Kiểu tiêm này được thực hiện nhiều nhất ở cơ cánh tay hoặc bắp chân. Theo một vài phương pháp, các chất được tiêm trực tiếp vào mô cụ thể nơi mà tích tụ các chất lắng đọng, ví dụ tiêm trong hộp sọ.

Dược phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa tốt hơn, nếu là vô trùng và gần như đẳng trương và được sản xuất theo các điều kiện GMP. Các dược phẩm có thể được cung cấp ở dạng liều đơn vị (*nghĩa là*, liều để sử dụng một lần duy nhất). Dược phẩm có thể được bào chế bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ gia được chấp nhận về mặt sinh lý. Dạng bào chế phụ thuộc vào đường sử dụng đã chọn. Để tiêm, các kháng thể có thể được bào chế trong dung dịch nước, tốt hơn, nếu trong dung dịch đệm tương thích về mặt sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc nước muối sinh lý hoặc đệm axetat (để làm giảm sự khó chịu ở vị trí tiêm). Dung dịch này có thể chứa tá dược chẳng hạn như các chất tạo huyền phù, chất ổn định và/hoặc phân tán. Các kháng thể khác có thể là ở dạng đông khô để hoàn nguyên với tá dược lỏng thích hợp, ví dụ, nước tiệt trùng không chứa chất gây sốt, trước khi sử dụng.

Các phác đồ này có thể được sử dụng kết hợp với một chất khác hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đang được điều trị. Ví dụ, trong trường hợp bệnh Alzheimer, các phác đồ này có thể được kết hợp với liệu pháp miễn dịch kháng A β (WO/2000/072880), các chất ức chế cholinesteraza hoặc memantin hoặc trong trường hợp của bệnh Parkinson liệu pháp miễn dịch kháng alpha synuclein WO/2008/103472, Levodopa, chất chủ vận dopamin, các chất ức chế COMT, các chất ức chế MAO-B, Amantadine, hoặc các chất kháng cholinergic.

Các kháng thể được sử dụng trong phác đồ hữu hiệu có nghĩa là liều, đường sử dụng và tần số sử dụng mà trì hoãn sự phát bệnh, làm giảm mức độ nghiêm trọng, ức chế sự hủy hoại thêm nữa, và/hoặc cải thiện ít nhất là một dấu hiệu hoặc triệu chứng của rối loạn đang được điều trị. Nếu bệnh nhân đã mắc sẵn một rối loạn, phác đồ này có thể được gọi là phác đồ hữu hiệu để điều trị. Nếu bệnh nhân có nguy cơ cao mắc rối loạn này so với quần thể chung nhưng vẫn chưa thể hiện các triệu chứng, phác đồ này có thể được gọi là phác đồ hữu hiệu để phòng ngừa. Trong một số trường hợp, tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa có thể được quan sát thấy ở từng bệnh nhân so với các đối chứng trong quá khứ hoặc kinh nghiệm trước đây ở cùng một bệnh nhân. Trong các trường hợp khác, tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa có thể được chứng minh trong các thử nghiệm tiền lâm sàng hoặc lâm sàng ở quần thể các bệnh nhân được điều trị so với quần thể đối chứng gồm các bệnh nhân không được điều trị.

Liều được lấy làm ví dụ cho kháng thể là 0,1-60 mg/kg (ví dụ, 0,5, 3, 10, 30, hoặc 60 mg/kg), hoặc 0,5-5 mg/kg thể trọng (ví dụ, 0,5, 1, 2, 3, 4 hoặc 5 mg/kg) hoặc 10-4000 mg hoặc 10-1500 mg làm liều cố định. Liều này phụ thuộc vào tình trạng của bệnh nhân và đáp ứng với điều trị trước đó, nếu có, dù phương pháp điều trị này là phòng ngừa hay chữa bệnh và dù rối loạn này là cấp tính hay mãn tính, trong số các yếu tố khác.

Đường sử dụng có thể là ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong miệng, dưới da, trong động mạch, trong sọ, nội tủy mạch, trong màng bụng, khu trú, trong mũi hoặc trong cơ. Một số kháng thể có thể được sử dụng trong hệ tuần hoàn toàn thân bằng cách sử dụng trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Việc sử dụng trong tĩnh mạch có thể, ví dụ, bằng cách truyền trong khoảng thời gian như 30 đến 90 phút.

Tần số sử dụng phụ thuộc vào thời gian bán thải của kháng thể trong hệ tuần hoàn, tình trạng của bệnh nhân và đường sử dụng trong số các yếu tố khác. Tần số này có thể là

hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng, hàng quý, hoặc cách nhau các khoảng thời gian không đồng đều tương ứng với các thay đổi về tình trạng của bệnh nhân hoặc tiến triển của rối loạn đang được điều trị. Tần số điển hình để sử dụng trong tĩnh mạch là từ hàng tuần đến hàng quý qua một đợt điều trị liên tục, mặc dù cũng có thể sử dụng liều thường xuyên hơn hoặc ít thường xuyên hơn. Đối với sử dụng dưới da, tần số sử dụng liều điển hình là hàng ngày đến hàng tháng, mặc dù cũng có thể sử dụng liều thường xuyên hơn hoặc ít thường xuyên hơn.

Số lượng liều được sử dụng phụ thuộc vào việc rối loạn là cấp tính hay mãn tính và đáp ứng của rối loạn với việc điều trị. Đối với các rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng cấp tính của rối loạn mãn tính, từ 1 đến 10 liều thường là đủ. Đôi khi, một liều truyền tĩnh mạch nhanh duy nhất, tùy ý ở dạng được chia nhỏ, là đủ cho rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng cấp tính của rối loạn mãn tính. Việc điều trị có thể được lặp lại khi tái phát rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng cấp tính. Đối với các rối loạn mãn tính, kháng thể có thể được sử dụng cách nhau các khoảng thời gian đều đặn, *ví dụ*, hàng tuần, hai tuần một lần, hàng tháng, hàng quý, mỗi sáu tháng một lần, trong ít nhất là 1, 5 hoặc 10 năm, hoặc toàn bộ cuộc đời của bệnh nhân.

A. Phương pháp theo dõi và chẩn đoán

Chụp ảnh in vivo, các phương pháp chẩn đoán, và liệu pháp miễn dịch tối ưu hóa.

Sáng chế đề xuất các phương pháp chụp ảnh in vivo các lắng đọng protein tau (ví dụ, các đám rối thần kinh và các thể vùi tau) ở bệnh nhân. Phương pháp này hoạt động bằng cách sử dụng chất phản ứng, như kháng thể gắn kết với tau (*ví dụ*, kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc ngụy trang), cho bệnh nhân và sau đó phát hiện chất này sau khi nó được liên kết. Phản ứng đào thải đối với các kháng thể đã sử dụng có thể tránh được hoặc được làm giảm bằng cách sử dụng các đoạn kháng thể thiếu vùng hằng định có độ dài đầy đủ, như Fab. Trong một số phương pháp, cùng một kháng thể có thể có tác dụng vừa làm chất điều trị và vừa làm chất chẩn đoán.

Các chất chẩn đoán có thể được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch vào cơ thể của bệnh nhân, hoặc trực tiếp vào não bằng cách tiêm trong hộp sọ hoặc bằng cách khoan một lỗ qua hộp sọ. Liều của chất phản ứng nên nằm trong các khoảng giống như đối với các phương pháp điều trị. Thông thường, chất phản ứng này được đánh dấu, mặc dù trong

một số phương pháp, chất phản ứng chính có ái lực với tau không được đánh dấu và chất đánh dấu phụ được sử dụng để gắn kết với chất phản ứng chính. Việc lựa chọn nhãn phụ thuộc vào cách thức phát hiện. Ví dụ, nhãn huỳnh quang là thích hợp để phát hiện bằng mắt thường. Việc sử dụng các nhãn thuận từ là thích hợp để phát hiện bằng cách chụp cắt lớp mà không cần can thiệp phẫu thuật. Các nhãn hoạt động phóng xạ cũng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật chụp cắt lớp phát xạ positron (PET) hoặc kỹ thuật ghi hình cắt lớp vi tính bằng bức xạ photon đơn (SPECT).

Các phương pháp chụp ảnh in vivo các lắng đọng protein tau là hữu ích để chẩn đoán hoặc xác nhận chẩn đoán bệnh do protein tau, như bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh liệt trên nhân tiến triển và bệnh Pick, hoặc khả năng dễ bị mắc các bệnh này. Ví dụ, nhiều phương pháp có thể được sử dụng trên bệnh nhân thể hiện các triệu chứng suy giảm nhận thức. Nếu bệnh nhân này có các đám rối thần kinh bất thường, thì bệnh nhân này có thể mắc bệnh Alzheimer. Ngoài ra, nếu bệnh nhân này có các thể vùi tau bất thường, thì tùy theo vị trí của thể vùi, bệnh nhân có thể mắc bệnh thoái hóa thùy trán thái dương. Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng trên các bệnh nhân không có triệu chứng. Sự có mặt của các lắng đọng protein tau bất thường chỉ ra khả năng dễ mắc bệnh có triệu chứng trong tương lai. Các phương pháp này cũng là hữu ích để theo dõi tiến trình của bệnh và/hoặc đáp ứng với việc điều trị ở bệnh nhân đã được chẩn đoán trước đó là mắc bệnh liên quan đến tau.

Việc chẩn đoán có thể được thực hiện bằng cách so sánh số lượng, kích thước, và/hoặc mật độ của các locut được đánh dấu, với các trị số đường cơ sở tương ứng. Các trị số đường cơ sở này có thể thể hiện các mức nồng độ trung bình trong quần thể gồm các cá thể không mắc bệnh. Các trị số đường cơ sở cũng có thể thể hiện nhiều mức nồng độ trước đó đã được xác định ở cùng một bệnh nhân. Ví dụ, các trị số đường cơ sở có thể được xác định ở bệnh nhân trước khi bắt đầu điều trị bằng liệu pháp miễn dịch tau, và các trị số đo được sau đó được so sánh với các trị số đường cơ sở. Sự giảm các trị số so với đường cơ sở báo hiệu đáp ứng tích cực với điều trị.

Ở một số bệnh nhân, việc chẩn đoán bệnh do protein tau có thể được hỗ trợ bằng cách thực hiện kỹ thuật quét PET. Kỹ thuật quét PET có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, thiết bị chụp ảnh PET thông thường và thiết bị bổ trợ. Kỹ thuật quét thường bao gồm một hoặc nhiều vùng của não nói chung đã được biết là liên quan đến các lắng

động protein tau và một hoặc nhiều vùng trong đó một vài lắng đọng, nếu có, thường có mặt để đóng vai trò làm đối chứng.

Dấu hiệu phát hiện được bằng cách quét PET có thể được thể hiện dưới dạng hình ảnh đa chiều. Hình ảnh đa chiều có thể là ở hai chiều thể hiện mặt cắt qua não, ba chiều, thể hiện não ba chiều, hoặc bốn chiều thể hiện các thay đổi trong não ba chiều theo thời gian. Thang màu có thể được sử dụng với nhiều màu sắc khác nhau chỉ ra các lượng khác nhau của nhãn và, do đó, phát hiện được lắng đọng protein tau. Các kết quả của việc quét cũng có thể được thể hiện bằng số, với các số liên quan đến lượng nhãn phát hiện được và do đó là lượng lắng đọng protein tau. Nhãn có mặt trong vùng não đã được biết là liên quan đến các lắng đọng đối với một bệnh do protein tau cụ thể (ví dụ, bệnh Alzheimer) có thể được so sánh với nhãn có mặt trong vùng đã biết là không liên quan đến các lắng đọng để tạo ra tỷ lệ thể hiện mức độ của các lắng đọng trong vùng ban đầu. Với cùng một phối tử được đánh dấu phóng xạ, các tỷ lệ này cung cấp số đo có thể so sánh được của các lắng đọng protein tau và các thay đổi của chúng giữa các bệnh nhân khác nhau.

Trong một số phương pháp, kỹ thuật quét PET được thực hiện đồng thời với hoặc trong cùng một lần khám của bệnh nhân với kỹ thuật quét MRI hoặc CAT. Kỹ thuật quét MRI hoặc CAT cung cấp giải phẫu chi tiết hơn về bộ não so với kỹ thuật quét PET. Tuy nhiên, hình ảnh từ kỹ thuật quét PET có thể được chồng lên hình ảnh quét MRI hoặc CAT chỉ ra vị trí của phối tử PET và do đó các lắng đọng tau một cách chính xác hơn so với các cấu trúc giải phẫu trong não. Một số máy có thể thực hiện cả quét PET và quét MRI hoặc CAT mà bệnh nhân không cần thay đổi các vị trí giữa các lần quét tạo thuận lợi cho việc chồng các hình ảnh.

Các phối tử PET thích hợp bao gồm các kháng thể được đánh dấu phóng xạ theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc được nguy trang). Các chất đồng vị phóng xạ được sử dụng có thể là, ví dụ, C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} , hoặc I^{123} . Khoảng cách thời gian giữa việc sử dụng phối tử PET và việc thực hiện kỹ thuật quét này có thể phụ thuộc vào phối tử PET và cụ thể là tốc độ hấp thu và đào thải của nó trong não, và thời gian bán thải của nhãn phóng xạ.

Kỹ thuật quét PET cũng có thể được thực hiện như là một biện pháp phòng bệnh ở bệnh nhân không có triệu chứng hoặc ở bệnh nhân có triệu chứng suy giảm nhận thức nhẹ nhưng vẫn chưa được chẩn đoán mắc bệnh do protein tau nhưng có nguy cơ phát triển bệnh

do protein tau ngày càng tăng. Đối với bệnh nhân không có triệu chứng, kỹ thuật quét là đặc biệt hữu ích cho các cá thể được xem là có nguy cơ mắc bệnh do protein tau tăng do tiền sử gia đình, yếu tố di truyền hoặc các yếu tố nguy cơ hóa sinh, hoặc tuổi trưởng thành. Kỹ thuật quét phòng bệnh có thể bắt đầu, ví dụ, ở độ tuổi của bệnh nhân nằm trong khoảng từ 45 đến 75 tuổi. Ở một số bệnh nhân, lần quét đầu tiên được thực hiện ở 50 tuổi.

Các lần quét phòng bệnh có thể được thực hiện cách nhau các khoảng thời gian là, ví dụ, từ sáu tháng đến mười năm, tốt hơn, nếu từ 1-5 năm. Ở một số bệnh nhân, kỹ thuật quét phòng bệnh được thực hiện hàng năm. Nếu kỹ thuật quét PET được thực hiện như là một biện pháp phòng bệnh chỉ ra mức lắng đọng protein tau cao bất thường, liệu pháp miễn dịch có thể được bắt đầu và các lần quét PET tiếp theo được thực hiện như ở bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh do protein tau. Nếu kỹ thuật quét PET được thực hiện như là biện pháp phòng bệnh chỉ ra các mức lắng đọng protein tau nằm trong giới hạn bình thường, các lần quét PET khác có thể được thực hiện cách nhau các khoảng thời gian từ sáu tháng đến 10 năm, và tốt hơn, từ 1 đến 5 năm, như trước đây, hoặc tương ứng với sự xuất hiện của các dấu hiệu và triệu chứng của bệnh do protein tau hoặc chứng suy giảm nhận thức nhẹ. Bằng cách kết hợp kỹ thuật quét phòng bệnh với việc sử dụng liệu pháp miễn dịch hướng đến tau nếu và khi mức lắng đọng protein tau trên mức bình thường được phát hiện, các mức lắng đọng protein tau có thể được làm giảm xuống, hoặc gần hơn với, các mức bình thường, hoặc ít nhất là được ức chế không tăng thêm, và bệnh nhân này có thể duy trì tình trạng không mắc bệnh do protein tau trong khoảng thời gian dài hơn so với khi không nhận được kỹ thuật quét phòng bệnh và liệu pháp miễn dịch hướng tới tau (*ví dụ*, ít nhất 5, 10, 15 hoặc 20 năm, hoặc trong suốt cuộc đời còn lại của bệnh nhân).

Các mức lắng đọng protein tau bình thường có thể được xác định bằng lượng đám rối thần kinh hoặc thể vùi tau trong não của mẫu đại diện của các cá thể trong quần thể chung mà chưa được chẩn đoán mắc bệnh do protein tau cụ thể (*ví dụ*, bệnh Alzheimer) và không được xem là có nguy cơ phát triển bệnh này tăng (*ví dụ*, mẫu đại diện của các cá thể không mắc bệnh dưới 50 tuổi). Ngoài ra, mức bình thường có thể được nhận biết ở bệnh nhân đơn lẻ nếu tín hiệu PET theo các phương pháp này trong một vùng của não trong đó các lắng đọng protein tau được biết là có phát triển không khác biệt (trong khoảng chính xác của phép đo) với tín hiệu từ một vùng của não trong đó được biết là các lắng đọng này bình thường không phát triển. Mức gia tăng ở cá thể có thể được nhận biết bằng cách so

sánh với các mức bình thường (ví dụ, giá trị trung bình cao nhất và phương sai của độ lệch chuẩn) hoặc đơn giản từ tín hiệu tăng vượt quá sai số thử nghiệm trong một vùng của não liên quan đến các lắng đọng protein tau so với vùng không được biết là có liên quan đến các lắng đọng. Với mục đích so sánh các mức lắng đọng protein tau ở cá thể và quần thể, các lắng đọng protein tau tốt hơn, nên được xác định trong (các) vùng não giống nhau, các vùng này bao gồm ít nhất một vùng trong đó các lắng đọng protein tau liên quan đến bệnh do protein tau cụ thể (ví dụ, bệnh Alzheimer) được biết là tạo thành. Bệnh nhân có mức lắng đọng protein tau tăng là ứng viên để bắt đầu liệu pháp miễn dịch.

Sau khi bắt đầu liệu pháp miễn dịch, sự giảm mức lắng đọng protein tau có thể được thấy đầu tiên như là dấu hiệu cho thấy việc điều trị đang có tác dụng mong muốn. Sự giảm được quan sát thấy có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1 đến 100%, 1 đến 50%, hoặc 1 đến 25% trị số đường cơ sở. Các tác dụng này có thể được đo trong một hoặc nhiều vùng của não trong đó các lắng đọng được biết là tạo ra hoặc có thể được đo từ trị số trung bình của các vùng này. Tác dụng chung của việc điều trị có thể được tính gần đúng bằng cách cộng tỷ lệ phần trăm giảm so với đường cơ sở với sự tăng các lắng đọng protein tau mà nếu không sẽ xảy ra ở bệnh nhân không được điều trị trung bình.

Sự duy trì các lắng đọng protein tau ở mức gần như hằng định hoặc ngay cả sự tăng nhẹ các lắng đọng protein tau cũng có thể là dấu hiệu về sự đáp ứng với điều trị dù là đáp ứng dưới mức tối ưu. Các đáp ứng này có thể được so sánh với sự thay đổi theo thời gian của các mức lắng đọng protein tau ở bệnh nhân mắc bệnh do protein tau cụ thể (ví dụ, bệnh Alzheimer) mà không nhận được điều trị, để xác định liệu pháp miễn dịch này có tác dụng trong việc ức chế sự tăng thêm các lắng đọng protein tau hay không.

Việc theo dõi các thay đổi ở các lắng đọng protein tau cho phép điều chỉnh liệu pháp miễn dịch hoặc phác đồ điều trị khác đáp ứng với việc điều trị này. Việc theo dõi bằng PET cung cấp chỉ báo về bản chất và mức độ của đáp ứng với phương pháp điều trị. Sau đó có thể quyết định có điều chỉnh phương pháp điều trị hay không và nếu muốn, phương pháp điều trị có thể được điều chỉnh tương ứng với việc theo dõi bằng PET. Do đó việc theo dõi bằng PET cho phép liệu pháp miễn dịch hướng tới tau hoặc phác đồ điều trị khác được điều chỉnh trước khi các chất đánh dấu sinh học khác, MRI hoặc các biện pháp theo kinh nghiệm đáp ứng theo cách phát hiện được. Thay đổi đáng kể có nghĩa là việc so sánh trị số của một tham số sau điều trị so với nền cung cấp một số bằng chứng cho thấy việc điều trị có hoặc

không gây ra tác dụng có lợi. Trong một số trường hợp, sự thay đổi các trị số của một tham số ở chính bệnh nhân cung cấp bằng chứng cho thấy việc điều trị có hoặc không gây ra tác dụng có lợi. Trong các trường hợp khác, sự thay đổi của các trị số, nếu có, ở bệnh nhân, được so sánh với sự thay đổi của các trị số, nếu có, ở quần thể bệnh nhân đối chứng đại diện không trải qua liệu pháp miễn dịch. Sự khác biệt về đáp ứng ở một bệnh nhân cụ thể so với đáp ứng bình thường ở bệnh nhân đối chứng (ví dụ, trị số trung bình cộng phương sai của độ lệch chuẩn) cũng có thể cung cấp bằng chứng là phác đồ liệu pháp miễn dịch này đang đạt được hoặc không đạt được tác dụng có lợi ở bệnh nhân.

Ở một số bệnh nhân, việc theo dõi chỉ ra sự giảm phát hiện được của các lắng đọng protein tau nhưng mức lắng đọng protein tau này vẫn trên mức bình thường. Ở các bệnh nhân này, nếu không có tác dụng phụ không chấp nhận được, phác đồ điều trị này có thể được tiếp tục như vậy hoặc thậm chí được gia tăng về tần số sử dụng và/hoặc liều nếu vẫn chưa phải ở liều được đề nghị cao nhất.

Nếu việc theo dõi chỉ ra các mức lắng đọng protein tau ở bệnh nhân đã được làm giảm đến các mức lắng đọng protein tau bình thường hoặc gần như bình thường, phác đồ liệu pháp miễn dịch có thể được điều chỉnh từ liều cảm ứng (nghĩa là, làm giảm các mức lắng đọng protein tau) đến liều duy trì (nghĩa là, duy trì các lắng đọng protein tau ở mức gần như hằng định). Phác đồ này có thể được tác động bằng cách làm giảm liều và hoặc tần số sử dụng liệu pháp miễn dịch.

Ở các bệnh nhân khác, việc theo dõi có thể chỉ ra là liệu pháp miễn dịch đang có một số tác dụng có lợi nhưng là tác dụng dưới mức tối ưu. Tác dụng tối ưu có thể được xác định là tỷ lệ phần trăm giảm mức lắng đọng protein tau trong khoảng nửa trên hoặc điểm tứ phân vị của sự thay đổi về các lắng đọng protein tau (được đo hoặc được tính trên toàn bộ não hoặc (các) vùng đại diện của não, trong đó đã biết là tạo ra các lắng đọng protein tau) xảy ra ở mẫu đại diện của các bệnh nhân mắc bệnh do protein tau đang điều trị bằng liệu pháp miễn dịch ở thời điểm đã cho sau khi bắt đầu liệu pháp. Bệnh nhân trải qua sự giảm nhẹ hơn hoặc bệnh nhân có các lắng đọng protein tau vẫn duy trì hằng định hoặc thậm chí là tăng, nhưng ở mức độ thấp hơn so với được dự kiến khi không có liệu pháp miễn dịch (ví dụ, như được suy luận từ nhóm đối chứng gồm các bệnh nhân không được sử dụng liệu pháp miễn dịch) có thể được phân loại là có đáp ứng tích cực nhưng dưới mức tối ưu. Các bệnh nhân này có thể tùy ý là đối tượng để điều chỉnh phác đồ trong đó liều và/hoặc

tần số sử dụng của một chất được gia tăng.

Ở một số bệnh nhân, các lắng đọng protein tau có thể gia tăng theo cách tương tự hoặc mạnh hơn so với lắng đọng tau ở bệnh nhân không nhận được liệu pháp miễn dịch. Nếu sự tăng này vẫn tiếp tục trong một khoảng thời gian, như 18 tháng hoặc 2 năm, thậm chí cả sau khi tăng tần số hoặc liều hoạt chất bất kỳ, liệu pháp miễn dịch có thể, nếu muốn, được dừng lại để thay thế bằng các phương pháp điều trị khác.

Phần mô tả trên đây về việc chẩn đoán, theo dõi và điều chỉnh việc điều trị các bệnh bị gây ra bởi protein tau đã được tập trung nhiều vào việc sử dụng kỹ thuật quét PET. Tuy nhiên, kỹ thuật khác bất kỳ để quan sát và/hoặc đo các lắng đọng protein tau mà thích hợp với việc sử dụng các kháng thể tau theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, hoặc 7G6 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc được ngụ ý trang) có thể được sử dụng thay cho kỹ thuật quét PET để thực hiện các phương pháp này.

Cũng được đề xuất là các phương pháp phát hiện đáp ứng miễn dịch kháng tau ở bệnh nhân mắc bệnh hoặc dễ nhiễm bệnh liên quan đến tau. Các phương pháp này có thể được sử dụng để theo dõi liệu trình điều trị phòng ngừa và chữa bệnh bằng các chất được đề xuất ở đây. Protein kháng thể sau khi gây miễn dịch thụ động thường thể hiện đỉnh tức thời của nồng độ kháng thể sau đó giảm theo hàm số mũ. Nếu không có liều bổ sung, sự suy giảm này đạt tới mức nồng độ trước điều trị trong khoảng vài ngày đến vài tháng tùy theo thời gian bán thải của kháng thể được sử dụng. Ví dụ, thời gian bán thải của một số kháng thể của người là khoảng 20 ngày.

Trong một số phương pháp, phép đo đường cơ sở của kháng thể với tau ở đối tượng này được thực hiện trước khi sử dụng, phép đo thứ hai được thực hiện ngay sau đó để xác định mức nồng độ kháng thể đỉnh, và một hoặc nhiều phép đo khác được thực hiện cách quãng để theo dõi sự giảm nồng độ kháng thể. Khi mức nồng độ kháng thể đã giảm đến đường cơ sở hoặc tỷ lệ phần trăm xác định trước của đỉnh trừ đi đường cơ sở (ví dụ, 50%, 25% hoặc 10%), việc sử dụng liều kháng thể khác được thực hiện. Trong một số phương pháp, đỉnh hoặc các mức nồng độ đo được tiếp theo trừ nền được so sánh với các mức nồng độ tham chiếu được xác định trước đó để thiết lập phác đồ điều trị phòng ngừa hoặc chữa bệnh có lợi ở các đối tượng khác. Nếu mức nồng độ kháng thể đo được là thấp hơn đáng kể so với mức nồng độ tham chiếu (ví dụ, thấp hơn so với giá trị trung bình trừ một hoặc tốt hơn, là hai độ lệch chuẩn của giá trị tham chiếu trong quần thể bao gồm các đối tượng

được lợi từ phương pháp điều trị) việc sử dụng một liều kháng thể bổ sung được chỉ định.

Cũng được đề xuất là các phương pháp phát hiện tau ở đối tượng, ví dụ, bằng cách đo tau trong mẫu từ đối tượng hoặc bằng cách chụp ảnh *in vivo* tau ở đối tượng. Các phương pháp này là hữu ích để chẩn đoán hoặc xác nhận chẩn đoán các bệnh gây ra bởi tau, hoặc khả năng bị mắc bệnh này. Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng trên các đối tượng không có triệu chứng. Sự có mặt của tau chỉ ra khả năng dễ bị mắc bệnh có triệu chứng trong tương lai. Các phương pháp này cũng là hữu ích để theo dõi sự tiến triển của bệnh và/hoặc đáp ứng với việc điều trị ở các đối tượng đã được chẩn đoán trước đó là mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

Các mẫu sinh học thu được từ đối tượng mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc nguy cơ mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) có thể được cho tiếp xúc với các kháng thể được mô tả ở đây để đánh giá sự có mặt của tau. Ví dụ, các mức tau ở các đối tượng này có thể được so sánh với các mức thể hiện ở đối tượng khỏe mạnh. Ngoài ra, các mức nồng độ tau ở đối tượng nhận được điều trị cho bệnh này có thể được so sánh với mức nồng độ tau của đối tượng không được điều trị cho bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C,

bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Một số thử nghiệm này bao gồm sinh thiết mô thu được từ các đối tượng này. Các thử nghiệm ELISA cũng có thể là các phương pháp hữu ích, ví dụ, để đánh giá tau trong mẫu lỏng.

VII. Kit

Sáng chế đề xuất thêm kit (ví dụ, đồ bao gói) chứa kháng thể được mô tả ở đây và các nguyên liệu liên quan, chẳng hạn như các hướng dẫn cho việc sử dụng (ví dụ, tờ hướng dẫn sử dụng). Các hướng dẫn sử dụng có thể bao gồm, ví dụ, hướng dẫn để sử dụng kháng thể và tùy ý một hoặc nhiều chất bổ sung. Các đồ bao gói chứa kháng thể có thể là các liều đơn vị, các gói gộp (ví dụ, gói nhiều liều), hoặc các liều dưới đơn vị.

Tờ hướng dẫn sử dụng dùng để chỉ hướng dẫn thường nằm trong các gói thương mại của dược phẩm mà chứa thông tin về các chỉ định, cách sử dụng, liều, đường sử dụng, chống chỉ định và/hoặc các khuyến cáo liên quan đến việc sử dụng các dược phẩm này

Kit có thể còn bao gồm đồ bao gói thứ hai chứa dung dịch đệm được dụng, như nước kìm khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó cũng có thể chứa các nguyên liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và bởi người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm và xylanh.

VIII. Các ứng dụng khác

Các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện tau hoặc các đoạn của nó, trong trường hợp chẩn đoán hoặc điều trị lâm sàng hoặc trong nghiên cứu. Ví dụ, các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của tau trong mẫu sinh học như là dấu hiệu chỉ ra rằng mẫu sinh học này chứa lắng đọng tau. Sự gắn kết của các kháng thể này với mẫu sinh học có thể được so sánh với khả năng gắn kết của các kháng thể với mẫu đối chứng. Mẫu đối chứng này và mẫu sinh học này có thể chứa các tế bào có cùng nguồn gốc mô. Các mẫu đối chứng và các mẫu sinh học có thể thu được từ cùng một cá thể hoặc nhiều cá thể khác nhau và tại cùng một thời điểm hoặc vào nhiều thời điểm khác nhau. Nếu muốn,

nhiều mẫu sinh học và nhiều mẫu đối chứng được đánh giá vào nhiều thời điểm để bảo vệ chống lại sự biến đổi ngẫu nhiên không phụ thuộc vào các sự khác biệt giữa các mẫu này. Sau đó so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa (các) mẫu sinh học và (các) mẫu đối chứng này để xác định sự gắn kết của kháng thể (*nghĩa là*, sự có mặt của tau) với (các) mẫu sinh học được gia tăng, giảm đi hay giữ nguyên so với sự gắn kết của kháng thể với (các) mẫu đối chứng. Sự gắn kết của kháng thể với (các) mẫu sinh học tăng lên so với (các) mẫu đối chứng chỉ ra sự có mặt của tau trong (các) mẫu sinh học này. Trong một số trường hợp, sự gắn kết của kháng thể tăng có ý nghĩa thống kê. Tùy ý, sự gắn kết của kháng thể với mẫu sinh học cao hơn ít nhất là 1,5 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 10 lần, 20 lần, hoặc 100 lần so với sự gắn kết của kháng thể này với mẫu đối chứng.

Ngoài ra, các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của tau trong mẫu sinh học để theo dõi và đánh giá hiệu quả của dược chất đang được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Mẫu sinh học từ bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) được đánh giá để xây dựng đường cơ sở cho sự gắn kết của kháng thể với mẫu này (*nghĩa là*, đường cơ sở về sự có mặt của tau trong mẫu này) trước khi bắt đầu liệu pháp với dược chất. Trong một số trường hợp, nhiều mẫu sinh học của bệnh nhân được đánh giá tại nhiều thời điểm để xây dựng cả đường cơ sở và đo biến đổi ngẫu nhiên không phụ thuộc vào điều trị. Sau đó dược chất

được sử dụng theo phác đồ. Phác đồ này có thể bao gồm nhiều lần sử dụng dược chất này trong một khoảng thời gian. Tùy ý, sự gắn kết của các kháng thể (*nghĩa là, sự có mặt của tau*) được đánh giá vào nhiều thời điểm trong nhiều mẫu sinh học của bệnh nhân, để xây dựng phép đo biến đổi ngẫu nhiên và thể hiện xu hướng đáp ứng với liệu pháp miễn dịch. Sau đó nhiều đánh giá khác nhau về khả năng gắn kết của kháng thể với mẫu sinh học được so sánh. Nếu chỉ có hai đánh giá được thực hiện, việc so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa hai đánh giá này để xác định sự gắn kết của kháng thể (*nghĩa là, sự có mặt của tau*) đã tăng, giảm hay giữ nguyên giữa hai đánh giá này. Nếu nhiều hơn hai phép đo được thực hiện, các phép đo này có thể được phân tích theo dòng thời gian bắt đầu từ trước khi điều trị bằng dược chất và tiếp tục xuyên suốt thời gian điều trị. Ở các bệnh nhân mà sự gắn kết kháng thể với mẫu sinh học giảm (*nghĩa là, sự có mặt của tau*), có thể kết luận là dược chất là hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) ở bệnh nhân. Sự giảm gắn kết của kháng thể có thể có ý nghĩa thống kê. Tùy ý, sự gắn kết giảm ít nhất là 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 100%. Việc đánh giá sự gắn kết kháng thể có thể được thực hiện kết hợp với việc đánh giá các dấu hiệu và triệu chứng khác của bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, hội chứng parkinson, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng làm thuốc thử nghiên cứu cho nghiên cứu trong phòng thí nghiệm để phát hiện tau, hoặc các đoạn của nó. Trong các ứng dụng

này, các kháng thể có thể được đánh dấu bằng các phân tử huỳnh quang, các phân tử được đánh dấu spin, enzym, hoặc các đồng vị phóng xạ, và có thể được cung cấp dưới dạng kit với tất cả các thuốc thử cần thiết để thực hiện thử nghiệm phát hiện. Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để tinh chế tau, hoặc các đối tác gắn kết của tau, ví dụ, bằng sắc ký ái lực.

Tất cả các patent lưu trữ, các website, các công bố khác, các số truy cập và các tài liệu tương tự được trích dẫn trên đây hoặc dưới đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả các mục đích ở mức độ giống như thể từng tài liệu này được chỉ ra cụ thể và riêng biệt để được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Nếu nhiều dạng khác nhau của một trình tự đi kèm theo một số truy cập ở nhiều thời điểm khác nhau, dạng đi kèm theo số truy cập này tại ngày nộp đơn hiệu lực được dự định. Ngày nộp đơn hiệu lực nghĩa là ngày trước ngày nộp đơn thực sự hoặc ngày nộp đơn ưu tiên viện dẫn đến số truy cập này nếu áp dụng được. Tương tự, nếu nhiều bản khác nhau của một công bố, website hoặc tương tự được công bố ở nhiều thời điểm khác nhau, bản được công bố gần nhất vào ngày nộp đơn hiệu lực của đơn này được dự định, trừ khi có quy định khác. Dấu hiệu, bước, yếu tố, phương án hoặc khía cạnh bất kỳ của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với dấu hiệu, bước, yếu tố, phương án hoặc khía cạnh bất kỳ khác, trừ khi có quy định khác. Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và lấy ví dụ nhằm mục đích rõ ràng và dễ hiểu, rõ ràng là một số thay đổi và cải biến có thể được thực hiện trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Xác định các kháng thể đơn dòng tau

Các kháng thể đơn dòng kháng tau được tạo ra như sau. Các lần gây miễn dịch được thực hiện với tau người 383 a.a. gắn đuôi His đầu cùng N tái tổ hợp (4R0N), chứa đột biến P301S [kháng nguyên A] hoặc tau người 383 a.a. tái tổ hợp (4R0N), chứa đột biến P301S, thiếu đuôi His đầu cùng N [kháng nguyên B]. Các kháng nguyên được nhũ hóa trong tá được RIBI.

Chuột Balb/c cái năm tuần tuổi được gây miễn dịch trong màng bụng bằng 25µg kháng nguyên A vào ngày 0, và 10µg kháng nguyên A vào mỗi ngày 7, 14, 21, 27, 34, 48, 55, và 62. Chuột được gây miễn dịch bằng 10µg kháng nguyên B vào các ngày 76 và 90. Vào các ngày 43 và 98, chuột được lấy máu và được đo hiệu giá kháng kháng nguyên A;

vào ngày 101 các động vật có hiệu giá cao nhất được tăng cường với liều gây miễn dịch cuối cùng là 50µg kháng nguyên B, được phân phối $\frac{1}{2}$ trong màng bụng và $\frac{1}{2}$ trong tĩnh mạch. Các thể lai dung hợp được sàng lọc bằng ELISA kháng cả hai kháng nguyên,).

Ví dụ 2. Kháng thể đơn dòng chuột gắn kết với tau trong thử nghiệm ELISA

Phương pháp: ELISA gián tiếp: Các đĩa polystyren 96 giếng được phủ bằng kháng thể bắt giữ kháng 6xHis (Fig.1A) hoặc đa dòng kháng tau (Dako #A0024, Fig.1B) được tạo huyền phù trong 1xPBS trong 2 giờ ở RT hoặc 16 giờ ở 4°C. Lớp phủ được loại bỏ, và các đĩa được phong bế trong 1 giờ với 1% BSA trong 1xPBS, sau đó ủ với tau người tái tổ hợp, với (Fig.1A) hoặc không cùng với (Fig.1B) đuôi polyhistidin ở đầu cùng N của protein này. Sau khi rửa, các đĩa được ủ với các kháng thể đã chỉ định, được rửa và được ủ với kháng thể thứ cấp dê kháng chuột được liên hợp HRP. Các đĩa được phát triển với TMB, và A₄₅₀ được đo với máy đọc đĩa.

ELISA bánh kẹp: Các đĩa polystyren 96 giếng được phủ bằng các kháng thể kháng chuột trong 1xPBS trong 2 giờ ở RT hoặc 16 giờ ở 4°C. Lớp phủ được loại bỏ, và các đĩa được phong bế trong 1 giờ với 1% BSA trong 1xPBS. Đĩa này được ủ tiếp với các kháng thể đã chỉ định ở các nồng độ giống nhau, được pha loãng trong 0,1% BSA trong 1xPBS. Các đĩa được xử lý liên tục với tau người, kháng thể đa dòng thử kháng tau (Dako #A0024), và kháng thể dê kháng thử được liên hợp HRP, tất cả được pha loãng trong 0,1% BSA trong PBS và việc rửa được thực hiện giữa mỗi bước. Streptavidin-HRP được bổ sung vào, các đĩa được phát triển với TMB, và A₄₅₀ được đo với máy đọc đĩa. Xem Fig.1C.

Các kết quả: Panen chứa kháng thể sản sinh bởi tế bào lai được thử nghiệm về khả năng gắn kết với tau qua nhiều phương thức ELISA khác nhau. Sự phát hiện tau được xác nhận bằng cách sử dụng phương thức gián tiếp, sử dụng protein tau được bất động bởi đuôi polyhistidin được dung hợp đầu cùng N của nó (Fig.1A). Sự gắn kết với protein tự nhiên, không gắn đuôi cũng được xác nhận (Fig.1B). Để đánh giá ái lực dung dịch của nhiều kháng thể khác nhau, phương thức ELISA bánh kẹp được sử dụng, trong đó các kháng thể tế bào lai đã thử nghiệm được sử dụng làm chất phản ứng bắt giữ (Fig.1C).

Ví dụ 3. Ái lực của các kháng thể đơn dòng chuột với tau

Phương pháp: Phân tích SPR được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 để xác định động học liên kết của kháng thể chuột với tau người tái tổ hợp. Để chuẩn bị bề

mặt cảm biến, kháng thể kháng chuột (GE Life Sciences) được bắt động trên chip cảm biến CM5 nhờ phản ứng tạo cặp amin, và kháng thể bị bắt giữ ở mức đảm bảo sự gắn kết tối đa là 50 RU. Nhiều nồng độ khác nhau của tau tái tổ hợp nằm trong khoảng từ 10-0,14 nM được đi qua phôi tử đã bị bắt giữ ở tốc độ dòng là 50 μ L/phút trong đệm chạy (HBS + 0,05% P-20, BSA 1 mg/mL), để kết hợp 180 giây và phân ly 900 giây. Dữ liệu được tham chiếu hai lần đến cả bộ cảm biến không liên quan không chứa phôi tử kháng thể, và nồng độ chất phân tích 0 nM để tính toán sự phân ly của phôi tử từ gốc bắt giữ. Sau đó dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng mô hình chỉnh hợp chung 1:1.

Kết quả: Nhiều kháng thể chuột được chọn dựa vào hoạt động của chúng trong bộ thử nghiệm ELISA, và ái lực gắn kết của chúng được đánh giá bằng SPR. Các kháng thể được thử nghiệm theo các bộ song song, và tốc độ liên hợp và phân ly liên kết của chúng được đo. Các ái lực liên kết được thể hiện trong Fig.2.

Ví dụ 4. Các kháng thể chuột đơn dòng ngăn cản sự gắn kết của tau người với bề mặt của tế bào noron đã được làm bất tử.

Phương pháp: Tác dụng ức chế sự gắn kết Tau với các tế bào u nguyên bào thần kinh B103 bằng các kháng thể đơn dòng kháng Tau

1. Các tế bào B103 đã được tạo huyền phù lại trong PBS ở mật độ 5×10^5 tế bào/mL. Đĩa 50 μ L huyền phù tế bào mỗi giếng trong đĩa Liên Kết Cao MSD. Bước này tạo ra 25K tế bào/giếng. Đặt đĩa này và để cho các tế bào gắn kết ở 37°C, CO₂ 5%, trong 2 giờ.

2. Sau khi gắn kết tế bào, loại bỏ PBS khỏi các giếng bằng cách lộn ngược đĩa và vỗ nhẹ để loại bỏ chất đệm dư. Bổ sung 50 μ L chất phong bế A MSD 3% trong PBS hoặc chất đệm phong bế thích hợp khác vào mỗi giếng và ủ đĩa ở RT trong 1 giờ mà không lắc.

3. Trong bước phong bế đĩa này, ủ đồng thời Tau và các kháng thể kháng Tau như sau:

a. Bắt đầu với kháng thể kháng Tau ở 2 mg/mL và pha loãng thành dãy trong PBS, 1:2, cho 7 dung dịch pha loãng bổ sung.

b. Pha loãng Tau đến 20 nM trong PBS. Nồng độ Tau sẽ là hằng định trong mỗi giếng.

c. Trộn Tau và kháng thể kháng Tau, 1:1, cho nồng độ Tau cuối cùng là 10 nM và nồng độ khởi đầu của kháng thể kháng Tau là 1 mg/mL.

d. Ủ hỗn hợp này trong xấp xỉ 1 giờ ở RT kèm theo lắc (600 vòng/phút).

4. Sau khi phong bế đĩa, bước 2, loại bỏ chất đệm phong bế khỏi các giếng bằng cách lật ngược đĩa và vỗ nhẹ và rửa đĩa 2x với PBS bằng cách sử dụng pipet nhiều kênh. Đảm bảo là đệm dư được loại bỏ hoàn toàn. Làm lạnh các tế bào đã được phủ thành lớp mỏng đến 4°C trước khi bổ sung các phức hợp Tau: kháng-Tau.

5. Bổ sung 50µL phức hợp đã làm lạnh, bước 3, vào các tế bào đã được phủ thành lớp mỏng và ủ trên đá trong 30 phút.

6. Rửa đĩa 2x với PBS đông lạnh như đã mô tả trước đây.

7. Bổ sung 50µL 16B5. SULFO-TAG vào mỗi giếng để phát hiện Tau đã gắn kết bề mặt tế bào. Ủ trong 30 phút trên đá.

8. Rửa đĩa 2x bằng PBS được làm đông lạnh một lần nữa như được mô tả trên đây.

9. Bổ sung 150 µL mỗi giếng 1X đệm đọc T không có chất hoạt động bề mặt (được pha loãng trong H₂O) và đọc ngay trên thiết bị MSD SECTOR™ 600. Tránh đưa bong bóng vào khi bổ sung đệm đọc.

10. Báo cáo về các tín hiệu MSD so với nồng độ của kháng thể kháng Tau.

Kháng thể được thử nghiệm là kháng thể kháng tau 3D6, 16G7, 3H9, 4C5, 5G8, và đối chứng isotyp.

Các kết quả:

Tín hiệu kháng tau Sulfo Tag giảm dần xảy ra với kháng thể thử nghiệm tăng dần chỉ ra tác dụng phong bế chức năng sự gắn kết tau với bề mặt tế bào neuron. Không có tác dụng phong bế nào được quan sát thấy với đối chứng isotyp, 16G7, hoặc 3H9. Các lượng tăng dần của hoạt tính phong bế chức năng được quan sát thấy với 4C5, 5G8, và 3D6. Xem Fig.3.

Ví dụ 5. 3D6 và 5G8 bắt giữ miễn dịch tau từ mô mắc bệnh của người.

Phương pháp: Các phân đoạn protein hòa tan hàm lượng muối cao được điều chế đến 1 mg/ml. Đối với mỗi kết tủa miễn dịch, 200 µg mẫu được sử dụng. 10µg kháng thể đã chỉ định (đối chứng isotyp, kháng thể kháng tau 3D6, hoặc 5G8) được bổ sung vào chế phẩm mẫu có hàm lượng muối cao, và được ủ trong 2 giờ. Sau đó các hạt từ protein G được bổ sung vào các hỗn hợp, và được ủ thêm một giờ nữa để bắt giữ phức hợp kháng thể/kháng

nguyên. Các mẫu được rửa kỹ bằng 1xPBS, và các hạt được luộc trong đệm mẫu khử/biến tính để giải phóng các protein bị bắt giữ. Các mẫu thu được được phân tích bằng SDS-PAGE và phân tích thẩm tách Tây được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng tau (Dako, #A0024).

Các kết quả: Như được thể hiện trong Fig.4, kháng thể kháng tau 3D6 và 5G8 gây kết tủa miễn dịch tau từ mô bị bệnh Alzheimer. Các phân đoạn hòa tan hàm lượng muối cao được kết tủa miễn dịch với kháng thể đã chỉ định, và được phát hiện với kháng thể đa dòng kháng tau hướng tới vùng riêng biệt của phân tử tau từ các vị trí gắn kết cho 3D6 và 5G8. Cả 5G8 và 3D6 đều bắt giữ tau từ phân đoạn này. Đầu vào (mẫu hòa tan có hàm lượng muối cao) được thể hiện ở bên phải.

Ví dụ 6. Thiết kế các kháng thể 5G8 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu hoặc kháng thể cho để làm tương thích với người là kháng thể chuột 5G8. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của m5G8 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:9. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của m5G8 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:10. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 tổ hợp Kabat/Chothia chuỗi nặng được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:11-13. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 Kabat chuỗi nhẹ được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:14-16. Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ phần này.

Các CDR của 5G8 VH và VL được nhận diện bằng cách sử dụng quy tắc nhận diện CDR dựa trên trình tự của Martin (Martin ACR. (2010)). Trong: Kontermann R và Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Đức: Springer International Publishing AG.). Kappa biến đổi (Vk) của 5G8 thuộc phân nhóm 2 Vk chuột mà tương ứng với phân nhóm 2 Vk người và chuỗi nặng biến đổi (Vh) thuộc phân nhóm 2c VH chuột mà tương ứng với phân nhóm 1 VH người [Kabat E. A., và đồng tác giả, (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Xuất bản lần thứ 5. Công bố NIH số 91-3242]. CDR-L1 Kabat 16 gốc là tương tự với lớp chính tắc Chothia 4, CDR-L2 Kabat 7 gốc thuộc lớp chính tắc Chothia 1, CDR-L3 Kabat 9 gốc là tương tự với lớp chính tắc Chothia 1 trong Vk [Martin A.C, và Thornton J.M. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:800-15.]. CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia 10 gốc là tương tự với lớp chính tắc Chothia 1, CDR-H2 tổ hợp Kabat/Chothia 17 gốc là tương tự với lớp chính tắc Chothia 2 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 tổ hợp Kabat/Chothia không có các lớp chính tắc.

[0004] Các trình tự của 5G8 VH và VL được sử dụng để truy vấn cơ sở dữ liệu kháng thể được chọn của phần mềm BioLuminate (Schrödinger, LLC; Zhu K, và đồng tác giả, (2014) *Proteins*. 82(8):1646–1655) cho các protein có trình tự axit amin tương tự và các cấu trúc đã biết. Cấu trúc của kháng thể kháng thể đậm đặc của chuột tương đồng cao 3F4 (PDB ID: 1CR9; 1CR9_H; SEQ ID NO:27 và 1CR9_L; SEQ ID NO:30), được phát hiện bởi Kascak, và đồng tác giả ((1987) *J Virol*. 61(12):3688-93) và được giải trình tự bởi Kanyo, và đồng tác giả ((1999). *J Mol Biol*. 293(4):855-63.), có độ phân giải là 2,9 Å, được chọn để làm khuôn xây dựng mô hình 5G8 trong BioLuminate. Truy vấn thêm cơ sở dữ liệu BioLuminate cho các kháng thể có nguồn gốc người đã phát hiện các khung của 5G8 VH và VL có chung mức độ tương đồng trình tự cao với các vùng tương ứng của vùng VH và VL của aDabi-Fab2b Fab kháng dabigatran được làm tương thích với người (số truy cập VH 4YHM_H); số truy cập VL 4YHM_L), được thiết kế bởi Schiele, và đồng tác giả ((2015) *MAbs*. 7(5):871-80.). Các miền biến đổi của 5G8 và aDabi-Fab2b cũng có chung độ dài giống nhau đối với các vòng CDR-H1, H2, L1, L2, và L3. Do đó, các vùng khung của aDabi-Fab2b VH (số truy cập 4YHM_H; SEQ ID NO:28) và VL (số truy cập 4YHM_L; SEQ ID NO:31) được chọn làm trình tự nhận cho các CDR của 5G8.

Các trình tự biến đổi chuỗi nặng và nhẹ thu được từ quá trình làm tương thích kháng thể với người được sắp xếp thẳng hàng tiếp với các trình tự dòng mầm của người bằng cách sử dụng công cụ IMGT Domain GapAlign để đánh giá tính người của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được chỉ ra bởi hướng dẫn của hội đồng INN WHO. (WHO-INN: Tên chung quốc tế (International nonproprietary names: INN) cho các hợp chất sinh học và công nghệ sinh học (tổng quan) (Internet) 2014. Có trên: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Các gốc được thay đổi để bắt cặp với trình tự dòng mầm của người tương ứng, nếu có thể, để làm tăng tính người. Đối với các biến thể VL_v5 và VL_v6 được làm tương thích với người, các đột biến được đưa vào để làm cho các trình tự tương đồng hơn với gen dòng mầm của người IGKV2-29 (số truy cập A2NJV5.2; SEQ ID NO:32). Đối với biến thể VH_v7 và VH_v8 được làm tương thích với người, các đột biến được đưa vào để làm cho các trình tự này tương đồng hơn với gen dòng mầm của người IGHV1-46 (số truy cập P01743.2; SEQ ID NO:29).

Các trình tự axit amin chứa khung aDabi-Fab2b và 5G8 CDR được ký hiệu là hu5G8-VH_v1 và hu5G8-VL_v1. Các dạng bổ sung của hu5G8-VH và hu5G8-VL được

thiết kế để cho phép đánh giá nhiều gốc khung khác nhau về sự tham gia của chúng vào liên kết kháng nguyên và khả năng gây miễn dịch. Các vị trí được xem xét để gây đột biến bao gồm các vị trí mà:

- xác định các cấu hình CDR chính tắc (được tóm tắt trong Martin 2010)
- nằm trong vùng Vecnê (Foote J và Winter G. (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol.* 224(2):487-99),
- khu trú vào mặt phân cách miền VH/VL (được tóm tắt trong Léger OJP và Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanization by CDR grafting. Trong: Shepherd P và Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press),
- dễ xảy ra các biến đổi sau dịch mã, như glycosyl hóa hoặc pyroglutamin hóa,
- bị chiếm bởi các gốc được dự đoán là xung đột với các CDR, theo mô hình của 5G8 CDR được ghép lên các khung aDabi-Fab2b, hoặc
- bị chiếm bởi các gốc hiếm trong số các kháng thể người được giải trình tự, tại đó gốc 5G8 mẹ của chuột hoặc một số gốc khác phổ biến hơn nhiều.

8 biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và 6 biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị khác nhau của các đột biến thể 8 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7, và hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:33-40, tương ứng) và hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5, và hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:41-46, tương ứng). (Bảng 4 và 3). Các thiết kế Vk và Vh được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên các khung người đã chọn, được thể hiện trong các Bảng 6 và 7, tương ứng. Các vùng được in đậm trong Bảng 6 và 7 thể hiện các CDR như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia. Dấu “.” trong các cột trong Bảng 6 cho hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5, và hu5G8-VL_v6 chỉ ra là axit amin ở vị trí đã chỉ ra là giống với axit amin trong hu5G8-VL_v1. Dấu “.” trong các cột ở Bảng 7 cho hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7, và hu5G8-VH_v8 chỉ ra là axit amin ở vị trí đã chỉ ra là giống với axit amin trong hu5G8-

VH_v1. Dấu “-” trong các cột ở Bảng 6 và 7 chỉ ra không có gốc nào ở vị trí được chỉ ra. SEQ ID NO:33-40 và SEQ ID NO:41-46 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong Bảng 8. Axit amin ở các vị trí trong hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7, và hu5G8-VH_v8 được liệt kê trong Bảng 9. Axit amin ở các vị trí trong hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5, và hu5G8-VL_v6 được liệt kê trong Bảng 10. Tỷ lệ phần trăm tính người cho các chuỗi VH được làm tương thích với người hu5G8-VH_v1, hu5G8-VH_v2, hu5G8-VH_v3, hu5G8-VH_v4, hu5G8-VH_v5, hu5G8-VH_v6, hu5G8-VH_v7, và hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:33-40, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương đồng IGHV1-46, và cho các chuỗi VL được làm tương thích với người hu5G8-VL_v1, hu5G8-VL_v2, hu5G8-VL_v3, hu5G8-VL_v4, hu5G8-VL_v5, và hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:41-46, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương đồng IGKV2-29, được chỉ ra trong Bảng 11.

Bảng 6

<u>Gốc tuyến tính #</u>	<u>Gốc Kabat #</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>VL 5G8 của chuột (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 dòng mầm số truy cập # A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
1	1	Fr1	D	D	D	D	.	.	.	.	.
2	2	Fr1	V	I	I	I	V	V	V	.	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.
4	4	Fr1	M	M	M	M	.	.	.	.	.
5	5	Fr1	T	T	T	T	.	.	.	.	.
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
7	7	Fr1	T	T	T	T	.	.	S	.	.

<u>Gốc tuyến tính #</u>	<u>Gốc Kabat #</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>VL 5G8 của chuột (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 dòng mầm số truy cập # A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L(SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
8	8	Fr1	P	P	P	P	.	.	.	.	.
9	9	Fr1	L	L	L	L	.	.	.	.	.
10	10	Fr1	T	S	S	S	.	.	.	.	.
11	11	Fr1	L	L	L	L	.	.	.	.	.
12	12	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
13	13	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.
14	14	Fr1	T	T	T	T	.	.	.	.	.
15	15	Fr1	I	P	P	P	.	.	.	.	.
16	16	Fr1	G	G	G	G	.	.	.	.	.
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	E	.	.
18	18	Fr1	P	P	P	P	.	.	.	.	.
19	19	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.
20	20	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
21	21	Fr1	I	I	I	I	.	.	.	.	.
22	22	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
23	23	Fr1	C	C	C	C	.	.	.	.	.
24	24	CDR-L1	K	K	R	K	.	.	.	.	.
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính #</u>	<u>Gốc Kabat #</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>VL 5G8 của chuột (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 dòng mầm số truy cập # A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Trình tự nhân aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L(SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
29	27B	CDR-L1	L	L	I	L	.	.	.	.	.
30	27C	CDR-L1	L	L	V	L	.	.	.	.	.
31	27D	CDR-L1	D	H	H	D	.	.	.	.	.
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	.	.	.	.	.
33	27F	CDR-L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	28	CDR-L1	D	D	D	D	.	.	.	.	.
35	29	CDR-L1	G	G	G	G	.	.	.	.	.
36	30	CDR-L1	K	K	N	K	.	.	.	.	.
37	31	CDR-L1	T	T	I	T	.	.	.	.	.
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
39	33	CDR-L1	L	L	L	L	.	.	.	.	.
40	34	CDR-L1	N	Y	E	N	.	.	.	.	.
41	35	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.
42	36	Fr2	L	Y	Y	Y	L	L	L	.	L
43	37	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
45	39	Fr2	R	K	K	K	.	.	.	.	.
46	40	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.
47	41	Fr2	G	G	G	G	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính #</u>	<u>Gốc Kabat #</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>VL 5G8 của chuột (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 dòng mầm số truy cập # A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Trình tự nhân aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L(SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
49	43	Fr2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
50	44	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.
51	45	Fr2	K	Q	K	K	.	.	.	Q	Q
52	46	Fr2	R	L	L	L	R	R	R	.	R
53	47	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.
54	48	Fr2	I	I	I	I	.	.	.	.	.
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
56	50	CDR-L2	L	E	K	L	.	.	.	.	.
57	51	CDR-L2	V	V	V	V	.	.	.	.	.
58	52	CDR-L2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
59	53	CDR-L2	K	S	Y	K	.	.	.	.	.
60	54	CDR-L2	L	R	R	L	.	.	.	.	.
61	55	CDR-L2	D	F	F	D	.	.	.	.	.
62	56	CDR-L2	S	S	S	S	.	.	.	.	.
63	57	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
64	58	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
65	59	Fr3	P	P	P	P	.	.	.	.	.
66	60	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.
67	61	Fr3	R	R	R	R	.	.	.	.	.
68	62	Fr3	F	F	F	F	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính #</u>	<u>Gốc Kabat #</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>VL 5G8 của chuột (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 dòng mầm số truy cập # A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L(SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
69	63	Fr3	T	S	S	S	.	.	.	.	.
70	64	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
71	65	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.
72	66	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
73	67	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.
74	68	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
75	69	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.
76	70	Fr3	D	D	G	G	.	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	.	.	.	.	.
78	72	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.
79	73	Fr3	L	L	L	L	.	.	.	.	.
80	74	Fr3	K	K	K	K	.	.	.	.	.
81	75	Fr3	I	I	I	I	.	.	.	.	.
82	76	Fr3	R	S	S	S	.	.	.	.	.
83	77	Fr3	R	R	R	R	.	.	.	.	.
84	78	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.
85	79	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.
86	80	Fr3	A	A	A	A	.	.	.	.	.
87	81	Fr3	E	E	E	E	.	.	.	.	.
88	82	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.
89	83	Fr3	L	V	V	V	.	.	.	.	.
90	84	Fr3	G	G	G	G	.	.	.	.	.
91	85	Fr3	V	V	V	V	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính #</u>	<u>Gốc Kabat #</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>VL 5G8 của chuỗi (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 dòng mầm số truy cập # A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L(SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.
94	88	Fr3	C	C	C	C	.	.	.	.	.
95	89	CDR-L3	W	M	F	W	.	.	.	.	.
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.
97	91	CDR-L3	G	-	A	G	.	.	.	.	.
98	92	CDR-L3	T	-	S	T	.	.	.	.	.
99	93	CDR-L3	L	-	H	L	.	.	.	.	.
100	94	CDR-L3	F	-	V	F	.	.	.	.	.
101	95	CDR-L3	P	-	P	P	.	.	.	.	.
102	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	96	CDR-L3	Y	G	Y	Y	.	.	.	.	.
109	97	CDR-L3	T	I	T	T	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính #</u>	<u>Gốc Kabat #</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>VL 5G8 của chuỗi (SEQ ID NO:8)</u>	<u>IGKV2-29 dòng mầm số truy cập # A2NJV5.2 (SEQ ID NO:32)</u>	<u>Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L (SEQ ID NO:31)</u>	<u>hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)</u>	<u>hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)</u>	<u>hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)</u>	<u>hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)</u>	<u>hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)</u>	<u>hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)</u>
110	98	Fr4	F	H	F	F	.	.	.	.	.
111	99	Fr4	G	L	G	G	.	.	.	.	.
112	100	Fr4	G	P	G	G	.	.	.	.	.
113	101	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.
114	102	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.
115	103	Fr4	K		K	K	.	.	.	.	.
116	104	Fr4	L		L	L	.	.	.	.	.
117	105	Fr4	E		E	E	.	.	.	.	.
118	106	Fr4	I		I	I	.	.	.	.	.
119	106 A	Fr4	-		-	-	-	-	-	-	-
120	107	Fr4	K		K	K	.	.	.	.	.

Bảng 7

<u>Gốc tuyến tính</u>	<u>Gốc Kabat</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>5G8 VH chuỗi (SEQ ID NO:7)</u>	<u>IGHV1-46 dòng mầm số truy cập # P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q	.	E	E	E	E	.	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
4	4	Fr1	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
5	5	Fr1	Q	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
7	7	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
8	8	Fr1	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
9	9	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
10	10	Fr1	E	E	E	E	.	.	.	.	.	.	.
11	11	Fr1	L	V	V	V	.	.	.	L	L	.	.
12	12	Fr1	V	K	K	K	.	.	.	V	V	.	.
13	13	Fr1	R	K	K	K	.	.	.	.	.	.	.
14	14	Fr1	S	P	P	P	.	.	.	.	.	.	.
15	15	Fr1	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
16	16	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
17	17	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
18	18	Fr1	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
19	19	Fr1	R	K	K	K	.	.	.	R	R	.	.
20	20	Fr1	L	V	V	V	.	.	.	L	L	.	.
21	21	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
22	22	Fr1	C	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.
23	23	Fr1	T	K	K	K	.	.	.	.	A	.	.

<u>Gốc tuyến tính</u>	<u>Gốc Kabat</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>5G8 VH chuột (SEQ ID NO:7)</u>	<u>IGHV1-46 dòng mầm số truy cập # P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
24	24	Fr1	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
25	25	Fr1	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
27	27	CDR-H1	F	Y	Y	F	.	.	.	.	.	.	.
28	28	CDR-H1	N	T	T	N	.	.	.	.	.	.	.
29	29	CDR-H1	I	F	F	I	.	.	.	.	.	.	.
30	30	CDR-H1	K	T	T	K	.	.	.	.	.	.	.
31	31	CDR-H1	D	S	D	D	.	.	.	.	.	.	.
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
34	34	CDR-H1	M	M	M	M	.	.	.	.	.	.	.
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	.	.	.	.	.	.	.
36	35 A	CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	35 B	CDR-H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	36	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.	.	.
39	37	Fr2	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.	.
40	38	Fr2	R	R	R	R	.	.	.	.	.	.	.
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
42	40	Fr2	R	A	A	A	.	.	.	.	.	.	.
43	41	Fr2	P	P	P	P	.	.	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính</u>	<u>Gốc Kabat</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>5G8 VH chuột (SEQ ID NO:7)</u>	<u>IGHV1-46 dòng mầm số truy cập # P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
44	42	Fr2	E	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
45	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
46	44	Fr2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
47	45	Fr2	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.	.
48	46	Fr2	E	E	E	E	.	.	D	D	D	.	D
49	47	Fr2	W	W	W	W	.	.	.	.	.	.	.
50	48	Fr2	I	M	M	M	I	I	I	I	I	.	I
51	49	Fr2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
52	50	CDR -H2	W	I	E	W	.	.	.	.	.	.	.
53	51	CDR -H2	I	I	T	I	.	.	.	.	.	.	.
54	52	CDR -H2	D	N	N	D	.	.	.	.	.	.	.
55	52 A	CDR -H2	P	P	P	P	.	.	.	.	.	.	.
56	52 B	CDR -H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	52 C	CDR -H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	53	CDR -H2	E	S	R	E	.	.	.	.	.	.	.
59	54	CDR -H2	N	G	N	N	.	.	.	.	.	.	.
60	55	CDR -H2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
61	56	CDR -H2	D	S	G	D	.	.	.	.	.	.	.
62	57	CDR -H2	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
63	58	CDR -H2	V	S	T	V	.	.	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính</u>	<u>Gốc Kabat</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>5G8 VH chuột (SEQ ID NO:7)</u>	<u>IGHV1-46 dòng mầm số truy cập # P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
65	60	CDR-H2	A	A	N	A	.	.	.	.	.	.	.
66	61	CDR-H2	P	Q	E	P	.	.	.	.	.	.	.
67	62	CDR-H2	K	K	K	K	.	.	.	.	.	.	.
68	63	CDR-H2	F	F	F	F	.	.	.	.	.	.	.
69	64	CDR-H2	Q	Q	K	Q	.	.	.	.	.	.	.
70	65	CDR-H2	G	G	G	G	.	.	.	.	.	.	.
71	66	Fr3	K	R	K	K	.	.	.	.	.	R	R
72	67	Fr3	A	V	A	A	.	.	.	.	.	V	V
73	68	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
74	69	Fr3	M	M	M	M	.	.	.	.	.	.	.
75	70	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
76	71	Fr3	S	R	R	R	S	S	S	S	S	.	S
77	72	Fr3	D	D	D	D	.	.	.	.	.	.	.
78	73	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
79	74	Fr3	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.	.
80	75	Fr3	S	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
81	76	Fr3	N	S	S	S	.	.	.	N	N	.	.
82	77	Fr3	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.
83	78	Fr3	A	V	A	A	.	.	.	.	.	V	V
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.	.
85	80	Fr3	L	M	M	M	.	.	.	L	L	.	.

<u>Gốc tuyến tính</u>													
<u>Gốc Kabat</u>													
<u>FR hoặc CDR</u>													
<u>5G8 VH chuột (SEQ ID NO:7)</u>													
<u>IGHV1-46 dòng mầm số truy cập # P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>													
<u>Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>													
<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>													
<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>													
<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>													
<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>													
<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>													
<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>													
<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>													
<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>													
86	81	Fr3	H	E	E	E	E	.	.	.	.	.	.
87	82	Fr3	L	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.
88	82 A	Fr3	S	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.
89	82 B	Fr3	S	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.
90	82 C	Fr3	L	L	L	L	L	.	.	.	.	.	.
91	83	Fr3	T	R	R	R	R	.	.	.	.	.	.
92	84	Fr3	S	S	S	S	S	.	.	.	.	.	.
93	85	Fr3	E	E	E	E	E	.	.	.	.	.	.
94	86	Fr3	D	D	D	D	D	.	.	.	.	.	.
95	87	Fr3	T	T	T	T	T	.	.	.	.	.	.
96	88	Fr3	A	A	A	A	A	.	.	.	.	.	.
97	89	Fr3	V	V	V	V	V	.	.	.	.	.	.
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	.	.	.	.	.	.
100	92	Fr3	C	C	C	C	C	.	.	.	.	.	.
101	93	Fr3	S	A	T	T	S	S	S	S	S	A	S
102	94	Fr3	P	R	I	I	P	P	P	P	P	R	P
103	95	CDR -H3	L		G	L	.	.	.	.	.	.	.
104	96	CDR -H3	-		T	-	-	-	-	-	-	-	-
105	97	CDR -H3	-		S	-	-	-	-	-	-	-	-
106	98	CDR -H3	-		G	-	-	-	-	-	-	-	-
107	99	CDR -H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-	-

<u>Gốc tuyến tính</u>														
<u>Gốc Kabat</u>														
<u>FR hoặc CDR</u>														
5G8 VH chuột (SEQ ID NO:7)														
IGHV1-46 dòng mầm số truy cập # P01743. 2(SEQ ID NO:29)														
Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)														
hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)														
hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)														
hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)														
hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)														
hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)														
hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)														
hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)														
hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)														
108	100	CDR-H3	-		D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	100A	CDR-H3	-		Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	100B	CDR-H3	-		F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	100C	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112	100D	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	100E	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	100F	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	100G	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	100H	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	100I	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	100J	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	100K	CDR-H3	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	101	CDR-H3	D		D	D	.	.	.	.	.	.	.	.
121	102	CDR-H3	F		Y	F	.	.	.	.	.	.	.	.

<u>Gốc tuyến tính</u>	<u>Gốc Kabat</u>	<u>FR hoặc CDR</u>	<u>5G8 VH chuột (SEQ ID NO:7)</u>	<u>IGHV1-46 dòng mầm số truy cập # P01743.2(SEQ ID NO:29)</u>	<u>Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)</u>	<u>hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)</u>	<u>hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)</u>	<u>hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)</u>	<u>hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)</u>	<u>hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)</u>	<u>hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)</u>	<u>hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)</u>	<u>hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)</u>
122	10 3	Fr4	W		W	W	.	.	.	.	.	.	.
123	10 4	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.	.	.
124	10 5	Fr4	Q		Q	Q	.	.	.	.	.	.	.
125	10 6	Fr4	G		G	G	.	.	.	.	.	.	.
126	10 7	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.	.	.
127	10 8	Fr4	T		L	L	.	.	.	.	.	.	.
128	10 9	Fr4	L		V	V	.	.	.	.	.	.	.
129	11 0	Fr4	T		T	T	.	.	.	.	.	.	.
130	11 1	Fr4	V		V	V	.	.	.	.	.	.	.
131	11 2	Fr4	S		S	S	.	.	.	.	.	.	.
132	11 3	Fr4	S		S	S	.	.	.	.	.	.	.

Bảng 8

Các đột biến ngược V_H , V_L và các đột biến khác cho 5G8 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	Không
hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H46, H48, H71, H93, H94
hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H11, H12, H19, H20, H46, H48, H71, H76, H80, H93, H94
hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93, H94
hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H66, H67, H78, H93, H94
hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)	Trình tự nhận số truy cập # 4YHM_H aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	H1, H46, H48, H66, H67, H71, H78, H93, H94
hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL Acc. 4YHM_L # (SEQ ID NO:31)	không
hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L (SEQ ID NO:31)	L2, L36, L46

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL Acc. #4YHM_L (SEQ ID NO:31)	L2, L36, L46, L70
hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L (SEQ ID NO:31)	L2, L7, L17, L36, L46, L70
hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L (SEQ ID NO:31)	L45, L70
hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)	Trình tự nhận aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L (SEQ ID NO:31)	L2, L36, L45, L46, L70

Bảng 9

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nặng của các kháng thể 5G8 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhân số truy cập # 4YHM_H_aDabi-Fab2b-VH (SEQ ID NO:28)	5G8 VH chuột (SEQ ID NO:7)	hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)
H1	Q	E	Q	Q	E	E	E	E	Q	E
H11	V	L	V	V	V	V	L	L	V	V
H12	K	V	K	K	K	K	V	V	K	K
H19	K	R	K	K	K	K	R	R	K	K
H20	V	L	V	V	V	V	L	L	V	V
H23	K	T	K	K	K	K	K	A	K	K
H46	E	E	E	E	E	D	D	D	E	D
H48	M	I	M	I	I	I	I	I	M	I
H66	K	K	K	K	K	K	K	K	R	R
H67	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V
H71	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
H76	S	N	S	S	S	S	N	N	S	S
H78	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V
H80	M	L	M	M	M	M	L	L	M	M
H93	T	S	T	S	S	S	S	S	A	S
H94	I	P	I	P	P	P	P	P	R	P

Bảng 10

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nhẹ của các kháng thể 5G8 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhân aDabi-Fab2b-VL số truy cập # 4YHM_L (SEQ ID NO:31)	VL 5G8 của chuột (SEQ ID NO:8)	hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)
L2	I	V	I	V	V	V	I	V
L7	T	T	T	T	T	S	T	T
L17	Q	Q	Q	Q	Q	E	Q	Q
L36	Y	L	Y	L	L	L	Y	L
L45	K	K	K	K	K	K	Q	Q
L46	L	R	L	R	R	R	L	R
L70	G	D	G	G	D	D	D	D

Bảng 11

Tỷ lệ phần trăm tính người của chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể 5G8 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	% Tính người
hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)	84,4%
hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)	81,4%
hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)	80,4%
hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)	79,4%
hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)	73,2%
hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)	72,2%

hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)	87,8%
hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)	82,5%
hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)	88,0%
hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)	85,0%
hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)	86,0%
hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)	84,0%
hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)	90,0%
hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)	87,0%

Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc lớp Chothia, vecnê, hoặc mặt phân cách/gói khác nhau giữa trình tự nhận của chuột và trình tự nhận của người là các ứng viên cho đột biến thể. Các ví dụ về các gốc chính tắc lớp Chothia bao gồm các gốc Kabat L2, L27B, L27C, L34, L94, H29, H71, và H94 trong Bảng 3 và 4. Ví dụ về các gốc vecnê bao gồm các gốc Kabat L2, L36, L46, H27, H28, H29, H30, H48, H71, H78, H93, và H94 trong Bảng 3 và 4. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/gói (VH+VL) bao gồm các gốc Kabat L34, L36, L46, L89, L91, H93, và H95, trong Bảng 3 và 4.

Lý do để lựa chọn các vị trí này được chỉ ra trong Bảng 6 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm ứng viên cho sự thể là như sau.

L2 (I2V) là đột biến ngược của một gốc của gốc chính tắc và vecnê.

L7 (T2S) là đột biến từ gốc (T), mà là hiếm ở người ở vị trí này, thành gốc phổ biến nhất (S).

L17 (Q17E) là đột biến từ gốc (Q), mà là hiếm ở người ở vị trí, này thành gốc phổ biến nhất (E).

L36 (Y36L) là đột biến ngược của gốc vecnê và mặt phân cách.

L45 (K45Q) là đột biến thành gốc IGKV2-29 dòng mầm.

L46 (G46R) là đột biến ngược của gốc vecnê và mặt phân cách.

L70 (G70D) là đột biến ngược và là đột biến thành gốc IGKV2-29 dòng mầm. D thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

Cơ sở cho các biến thể được làm tương thích với người như được chỉ ra trong Bảng 6 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ là như sau.

Hu5G8-VL_v1 bao gồm vòng CDR-L1, L2, và L3 của 5G8-VL được ghép lên khung của aDabi-Fab2b-VL.

Hu5G8-VL_v2 khôi phục tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí quan trọng để xác định các lớp chính tắc Chothia, là một phần của vùng Vecnê, hoặc nằm ở mặt phân cách miền VH/VL. Vị trí Kabat 2 xác định cấu hình chính tắc Chothia của CDR-L1; các vị trí Kabat 2, 36, và 46 là một phần của vùng Vecnê; và các vị trí Kabat 36 và 46 còn khu trú vào mặt phân cách VH/VL. *hu5G8-VL_v2* kết hợp các đột biến ngược I2V, Y36L, và L46R, để cho phép đánh giá sự tham gia của các vị trí này vào ái lực gắn kết kháng nguyên và khả năng gây miễn dịch.

Hu5G8-VL_v3 là giống với *hu5G8-VL-v2*, và khôi phục thêm tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí mà tại đó axit amin 5G8-VL mẹ của chuột là phổ biến cao hơn trong các kháng thể người được giải trình tự so với gốc aDabi-Fab2b-VL. Ở vị trí Kabat 70, gốc 5G8-VL là phổ biến hơn trong các kháng thể người so với gốc aDabi-Fab2b-VL. *Hu5G8-VL_v3* kết hợp đột biến ngược G70D, mà phục hồi gốc khung 5G8-VL mẹ trong khi làm tăng tính người của trình tự này.

Hu5G8-VL_v4 là giống với *hu5G8-VL-v3*, nhưng kết hợp thêm các đột biến thể ở các vị trí khung mà tại đó gốc không phải của aDabi-Fab2b-VL cũng như 5G8-VL là phổ biến nhất trong số các kháng thể người được giải trình tự. Ở vị trí Kabat 7, gốc phổ biến nhất là S, mà không có mặt trong aDabi-Fab2b-VL (T) hoặc 5G8-VL (T); và ở vị trí Kabat 17, gốc phổ biến nhất là E, mà không có mặt trong aDabi-Fab2b-VL (Q) hoặc 5G8-VL (Q). *Hu5G8-VL_v4* kết hợp các đột biến T7S và Q17E, để làm tăng tính người của trình tự này.

Hu5G8-VL_v5 bao gồm các vòng CDR-L1, L2, và L3 của 5G8-VL được ghép lên khung của aDabi-Fab2b-VL, như là *hu5G8-VL_v1*, và kết hợp thêm các đột biến khung làm cho trình tự này tương đồng hơn với gen dòng mầm biến đổi kappa globulin miễn dịch người cụ thể. Khung của aDabi-Fab2b-VL, và do đó của *hu5G8-VL_v1*, có chung mức độ tương đồng trình tự cao với gen dòng mầm của người IGKV2-29, với các khác biệt ở các vị trí Kabat 45 và 70. *Hu5G8-VL_v5* chứa các đột biến K45Q và G70D, như là một chiến lược khác để làm tăng tính người của trình tự này.

Hu5G8-VL_v6 chứa các đột biến của *hu5G8-VL-v5*, và kết hợp thêm các đột biến được đưa vào trong *hu5G8-VL-v2*, khôi phục tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí quan

trọng để xác định các lớp chính tắc Chothia, là một phần của vùng Vecnê, hoặc khu trú vào mặt phân cách miền VH/VL (các đột biến ngược I2V, Y36L, và L46R).

Lý do để lựa chọn các vị trí được chỉ ra trong Bảng 7 trong vùng biến đổi chuỗi nặng làm ứng viên cho sự thể là như sau.

H1 (Q1E) là đột biến ngược và là đột biến làm tăng độ ổn định để làm giảm khả năng tạo thành pyroglutamat. (Liu, 2011, trên đây). S

H11 (V11L) là đột biến ngược. L thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H12 (K12V) là đột biến ngược. V thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H19 (K19R) là đột biến ngược. R thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H20 (V20L) là đột biến ngược. L thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H23 (K23A) là đột biến thành gốc thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H46 (E46D) là đột biến bảo tồn. E46 được dự đoán là xung đột với K62 của CDR-H2.

H48 (M48I) là đột biến ngược trong vùng vecnê. I thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H66 (K66R) là đột biến thành gốc dòng mầm IGHV1-46. K là hiếm ở người ở vị trí này. R là phổ biến nhất ở vị trí này.

H67 (A67V) là đột biến thành gốc dòng mầm IGHV1-46. A là hiếm ở người ở vị trí này. V là phổ biến nhất ở vị trí này.

H71 (R71S) là đột biến ngược của gốc chính tắc và vecnê.

H76 (S76N) là đột biến ngược. N thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H78 (A78V) là đột biến thành gốc dòng mầm IGHV1-46.

H80 (M80L) là đột biến ngược. L thường xuất hiện ở người ở vị trí này.

H93 (T93S hoặc T93A) T93S là đột biến ngược của gốc vecnê và mặt phân cách. T93A là đột biến thành gốc dòng mầm IGHV1-46. T và S là hiếm ở vị trí này ở người. A là phổ biến nhất ở vị trí này ở người.

H94 (I94P hoặc I94R) I94P là đột biến ngược của gốc chính tắc và vecnê. I94R là

đột biến thành gốc dòng mầm IGHV1-46. I và P là hiếm ở người ở vị trí này. P là phổ biến nhất ở vị trí này ở người.

Cơ sở cho các biến thể được làm tương thích với người như được chỉ ra trong Bảng 7 trong vùng biến đổi chuỗi nặng là như sau.

Hu5G8-VH_v1 bao gồm vòng CDR-H1, H2, và H3 của 5G8-VH được ghép lên khung của aDabi-Fab2b-VH.

Hu5G8-VH_v2 khôi phục tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí quan trọng để xác định các lớp chính tắc Chothia, là một phần của vùng Vecnê, hoặc nằm ở mặt phân cách miền VH/VL. Các vị trí Kabat 71 và 94 lần lượt xác định cấu hình chính tắc Chothia của CDR-H2 và CDR-H1; các vị trí Kabat 48, 71, 93, và 94 là một phần của vùng Vecnê; và vị trí Kabat 93 nằm ở mặt phân cách miền VH/VL. *Hu5G8-VH_v2* kết hợp các đột biến ngược M48I, R71S, T93S, và I94P, để cho phép đánh giá sự tham gia của các vị trí này vào ái lực gắn kết kháng nguyên và khả năng gây miễn dịch.

Hu5G8-VH_v3 chứa các đột biến ngược của *hu5G8-VH-v2*, và khôi phục thêm đột biến thể khung ở vị trí Kabat 1. Ở đầu cùng N của các protein, cả E và Q đều được biết là tạo vòng tự phát để tạo ra pyroglutamat; tuy nhiên, sự chuyển hóa từ E xảy ra chậm hơn so với từ Q (Liu YD, và đồng tác giả, (2011) *J Biol Chem.* 286(13): 11211-7. ; Schilling S, và đồng tác giả, (2008) *Biol Chem.* 389(8):983-91.). *Hu5G8-VH-v3* kết hợp đột biến ngược Q1E, để làm giảm phản ứng pyroglutamin hóa.

Hu5G8-VH_v4 chứa các đột biến ngược của *hu5G8-VH-v3*, và kết hợp thêm các đột biến của các gốc khung mà được dự đoán bởi BioLuminate là xung đột với các CDR. Trên cơ sở các tương tác van der Waals, E ở vị trí Kabat 46 được dự đoán là xung đột với K ở vị trí Kabat 62 của CDR-H2. *Hu5G8-VH_v4* kết hợp đột biến bảo tồn E46D.

Hu5G8-VH_v5 chứa các đột biến của *hu5G8-VH-v4*, và khôi phục thêm tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí mà tại đó axit amin 5G8-VH mẹ của chuột có tính phổ biến cao hơn trong các kháng thể người được giải trình tự so với gốc aDabi-Fab2b-VH. Ở các vị trí Kabat 11, 12, 19, 20, 76, và 80, gốc 5G8-VH là phổ biến hơn trong các kháng thể người so với gốc aDabi-Fab2b-VH. *Hu5G8-VH_v5* kết hợp các đột biến ngược V11L, K12V, K19R, V20L, S76N, và M80L, mà phục hồi gốc khung 5G8-VH mẹ trong khi làm tăng tính người của trình tự này.

Hu5G8-VH_v6 chứa các đột biến của *hu5G8-VH-v5*, và kết hợp thêm các đột biến thể ở các vị trí khung mà tại đó gốc không phải của *aDabi-Fab2b-VH* cũng như *5G8-VH* là phổ biến nhất trong số các kháng thể người được giải trình tự. Ở vị trí Kabat 23, gốc phổ biến nhất là A, không có mặt ở *aDabi-Fab2b-VH* (K) hoặc *5G8-VH* (T). *Hu5G8-VH_v6* kết hợp đột biến K23A, để làm tăng tính người của trình tự này. Trong *hu5G8-VH_v6*, các vị trí Kabat sau đây không được gây đột biến thành gốc phổ biến nhất do vị trí của chúng trong hoặc gần mặt phân cách hoặc vùng Vecnê:

- vị trí 66: R là phổ biến nhất; *aDabi-Fab2b-VH* (K) và *5G8-VH* (K);
- vị trí 67: V là phổ biến nhất; *aDabi-Fab2b-VH* (A) và *5G8-VH* (A);
- vị trí 93: A là phổ biến nhất; *aDabi-Fab2b-VH* (T) và *5G8-VH* (S); và
- vị trí 94: R là phổ biến nhất; *aDabi-Fab2b-VH* (I) và *5G8-VH* (P).

Hu5G8-VH_v7 bao gồm các vòng CDR-H1, H2, và H3 của *5G8-VH* được ghép lên khung của *aDabi-Fab2b-VH*, như là *hu5G8-VH_v1*, và kết hợp thêm các đột biến khung làm cho trình tự này tương đồng hơn với gen *dòng mầm* chuỗi nặng biến đổi globulin miễn dịch người cụ thể. Khung của *aDabi-Fab2b-VH*, và do đó của *hu5G8-VH_v1*, có chung mức độ tương đồng trình tự cao với gen *dòng mầm* của người IGHV1-46, với các khác biệt ở các vị trí Kabat 66, 67, 78, 93 và 94. *Hu5G8-VH_v7* chứa các đột biến K66R, A67V, A78V, T93A, và I94R, như là một chiến lược khác để làm tăng tính người của trình tự này.

Hu5G8-VH_v8 chứa các đột biến của *hu5G8-VH-v7*, và kết hợp thêm các đột biến được đưa vào trong *hu5G8-VH-v2*, 3, và 4,...

- khôi phục tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí quan trọng để xác định các lớp chính tắc Chothia, là một phần của vùng Vecnê, hoặc nằm ở mặt phân cách miền VH/VL (các đột biến ngược M48I, R71S, A93S, và R94P),
- khôi phục đột biến thể khung ở vị trí Kabat 1 để làm giảm phản ứng pyroglutamin hóa (đột biến ngược Q1E), và
- kết hợp các đột biến của các gốc khung mà được dự đoán bởi BioLuminate là xung đột với các CDR (đột biến bảo tồn E46D).

Các trình tự được làm tương thích với người được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình PCR hai bước cho phép đưa vào nhiều đột biến, đột biến mất đoạn, và các đột biến

gắn xen bằng cách sử dụng kỹ thuật gây đột biến định hướng điểm QuikChange [Wang, W. và Malcolm, B. A. (1999) BioTechniques 26:680-682).

Vùng biến đổi chuỗi nặng

> 5G8-VH (SEQ ID NO:7)

EVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYIMHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYAPKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCSPLDFWGQGTTL
TVSS

>3F4-VH số truy cập 1CR9_H (SEQ ID NO:27)

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGNSEYAPRFQGKATMTADTLSTAYLQLSSLTSEDVAVYYCNADLHDYWGQG
TTLTVSS

>aDabi-Fab2b-VH số truy cập 4YHM_H (SEQ ID NO:28)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGET
NPRNGGTTYNEKFKGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTIGTSGYDY
FDYWGQGTLLTVSS

>IGHV1-46 số truy cập P01743.2 (SEQ ID NO:29)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWMGIIN
PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR

> hu5G8-VH_v1 (SEQ ID NO:33)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTVYAPKFQGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTILDFWGQG
TLTVSS

> hu5G8-VH_v2 (SEQ ID NO:34)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWIGWID
PENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGT
LTVSS

> hu5G8-VH_v3 (SEQ ID NO:35)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYIMHWVRQAPGQGLEWIGWIDP

ENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

> hu5G8-VH_v4 (SEQ ID NO:36)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVWRQAPGQGLDWIGWID
PENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

> hu5G8-VH_v5 (SEQ ID NO:37)

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCKASGFNIKDYMHVWRQAPGQGLDWIGWIDP
ENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSED TAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

> hu5G8-VH_v6 (SEQ ID NO:38)

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCAASGFNIKDYMHVWRQAPGQGLDWIGWIDP
ENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSED TAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

> hu5G8-VH_v7 (SEQ ID NO:39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVWRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTVYAPKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARLDFWGQ
GTLVTVSS

> hu5G8-VH_v8 (SEQ ID NO:40)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVWRQAPGQGLDWIGWID
PENGDTVYAPKFQGRVTMTSDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ Kappa

>5G8-VL(SEQ ID NO:8)

DVVM TQTPLT LSVTIGQPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLV
SKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLG VYYCWQGTLFPYTFGGGTKLEI
K

>3F4-VL số truy cập 1CR9_L (SEQ ID NO:30)

DVVMQTPTLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLIWVFQRPQGQSPKRLIFLVS
KRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPHTVGGGGTKLEI
A

>aDabi-Fab2b-VL số truy cập 4YHM_L (SEQ ID NO:31)

DIVMTQTPTLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSDGNIYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
YRFSGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPYTFGGGGTKLEIK

>IGKV2-29 số truy cập A2NVJ5.2 (SEQ ID NO:32)

DIVMTQTPTLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEV
SSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP

> hu5G8-VL_v1 (SEQ ID NO:41)

DIVMTQTPTLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPKLLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEI
K

> hu5G8-VL_v2 (SEQ ID NO:42)

DVVMQTPTLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKL
EIK

> hu5G8-VL_v3 (SEQ ID NO:43)

DVVMQTPTLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKL
EIK

> hu5G8-VL_v4 (SEQ ID NO:44)

DVVMQTQSPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKL
EIK

> hu5G8-VL_v5 (SEQ ID NO:45)

DIVMTQTPTLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGGTKLEI

K

> hu5G8-VL_v6 (SEQ ID NO:46)

DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLWLLQKPGQSPQRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLPYTFGGGTKL
EIK

Ví dụ 7. Thiết kế các kháng thể 6A10 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu để làm cho kháng thể đơn dòng 6A10 tương thích với người là kháng thể chuột 6A10. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của 6A10 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:63. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của 6A10 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:64. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 tổ hợp Kabat/Chothia chuỗi nặng được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:65-67. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 Kabat chuỗi nhẹ được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:68-70. Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ phần này.

Kappa biến đổi (Vk) của 6A10 thuộc phân nhóm 2 Kabat chuột mà tương ứng với phân nhóm 3 Kabat người và chuỗi nặng biến đổi (Vh) thuộc phân nhóm 2c Kabat chuột mà tương ứng với phân nhóm 1 Kabat người [Kabat E.A., và đồng tác giả, (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, xuất bản lần thứ năm. Công bố NIH số 91-3242.]. CDR-L1 16 gốc thuộc lớp chính tắc 4, CDR-L2 7 gốc thuộc lớp 1, CDR-L3 9 gốc thuộc lớp 1 trong Vk [Martin A.C. và Thornton J.M. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:800-815.]. CDR-H1 10 gốc thuộc lớp 1, CDR-H2 17 gốc thuộc lớp 1 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 không có các lớp chính tắc.

Các gốc ở mặt phân cách giữa các miền Vk và Vh là các gốc thường được tìm thấy, ngoại trừ 93T trong chuỗi nặng thường là alanin; do đó, gốc này được phân tích là đích cho đột biến ngược. Tương tự, 36L trong Vk thường là Y hoặc F và 46R thường là L do đó, các gốc này cũng được phân tích cho đột biến ngược.

Việc tìm kiếm được thực hiện trên các trình tự protein trong cơ sở dữ liệu PDB [Deshpande N. và đồng tác giả, (2005) *Nucleic Acids Res.* 33:D233-D237.] để tìm ra các cấu trúc sẽ cung cấp mô hình cấu trúc thô của 6A10. Cấu trúc tinh thể của Fab kháng thể [pdb mã 1CR9; SEQ ID NO:30] [Kanyo Z.F. và đồng tác giả, (1999) *J. Mol. Biol.* 293:855-863.] được sử dụng cho cấu trúc Vk vì nó có độ phân giải tốt (2,0Å) và tương đồng toàn

bộ trình tự với 6A10 Vk, giữ lại các cấu trúc chính tắc giống như vậy cho các vòng này. Cùng một cấu trúc [pdb mã 1CR9; SEQ ID NO:27] được sử dụng cho cấu trúc Vh vì nó có sự tương đồng toàn bộ trình tự tốt và độ phân giải tốt thích hợp (2,0Å). Ngoài ra, các CDR-H1 và H2 có cùng các cấu trúc chính tắc với 6A10 Vh. Phần mềm Bioluminate được sử dụng để lập mô hình cấu trúc thô của 6A10. Phần mềm này được chuyển giao quyền sử dụng từ Schrodinger Inc.

Việc tìm kiếm cơ sở dữ liệu trình tự protein không dư thừa từ NCBI cho phép lựa chọn các khung người thích hợp để ghép các CDR chuột vào đó. Đối với Vk, vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa người có số truy cập # ABC66863[SEQ ID NO:83; Shriner, A.K., và đồng tác giả, (2016) 24:7159-7166] được chọn. Vùng này có cùng các lớp chính tắc cho CDR-L1 và L2. Nó là một thành viên của phân nhóm kappa Kabat người 3. Đối với Vh, vùng biến đổi chuỗi nặng người có số truy cập# ACR16112 [SEQ ID NO:81; Williams, J.V và đồng tác giả, (2009) Mol. Immunol. 47:407-414] được chọn, nó có cùng các lớp chính tắc. Nó là thành viên của phân nhóm nặng Kabat của người 1.

3 biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và 3 biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị khác nhau của các đột biến thể, hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2, và hu6A10-VH_v3, (SEQ ID NO:85-87, tương ứng) và hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2, và hu6A10-VL_v3, (SEQ ID NO:88-90, tương ứng). (Bảng 12 và 13). Các thiết kế VL và VH được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên các khung người đã chọn, được thể hiện trong các Bảng 12 và 13, tương ứng. Các vùng được in đậm trong Bảng 12 và 13 thể hiện các CDR như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia. Dấu “-” trong các cột ở Bảng 12 và 13 chỉ ra không có gốc nào ở vị trí được chỉ ra. SEQ ID NO:85-87 và SEQ ID NO:88-90 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong Bảng 14. Các axit amin ở các vị trí trong hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2, và hu6A10-VH_v3 được liệt kê trong Bảng 15. Các axit amin ở các vị trí trong hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2, và hu6A10-VL_v3 được liệt kê trong Bảng 16. Tỷ lệ phần trăm tính người cho các chuỗi VH được làm tương thích với người hu6A10-VH_v1, hu6A10-VH_v2, và hu6A10-VH_v3, (SEQ ID NO:85-87, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:82), và cho các chuỗi VL được làm tương thích với người hu6A10-VL_v1, hu6A10-VL_v2, và hu6A10-VL_v3 (SEQ ID

NO:88-90, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84), được thể hiện trong Bảng 17.

Bảng 12

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	6A10 VL của chuột (SEQ ID NO:64)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P	P	P	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	6A10 VL của chuỗi (SEQ ID NO:64)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	R	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L1	L	V	L	L	L
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	S
33	27F	CDR-L1	-	-	-	-	-
34	28	CDR-L1	D	D	D	D	D
35	29	CDR-L1	G	G	G	G	G
36	30	CDR-L1	K	N	K	K	K
37	31	CDR-L1	T	T	T	T	T
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L1	L	L	L	L	L
40	34	CDR-L1	N	N	N	N	N
41	35	Fr2	W	W	W	W	W
42	36	Fr2	L	F	F	F	F
43	37	Fr2	L	Q	Q	Q	Q
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	R	R	R	R	R
46	40	Fr2	P	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat # FR hoặc CDR	6A10 VL của chuỗi (SEQ ID NO:64)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
49	43 Fr2	S	S	S	S	S
50	44 Fr2	P	P	P	P	P
51	45 Fr2	K	R	R	R	R
52	46 Fr2	R	R	R	L	L
53	47 Fr2	L	L	L	L	L
54	48 Fr2	I	I	I	I	I
55	49 Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
56	50 CDR-L2	L	K	L	L	L
57	51 CDR-L2	V	V	V	V	V
58	52 CDR-L2	S	S	S	S	S
59	53 CDR-L2	K	N	K	K	K
60	54 CDR-L2	L	R	L	L	L
61	55 CDR-L2	D	D	D	D	D
62	56 CDR-L2	S	S	S	S	S
63	57 Fr3	G	G	G	G	G
64	58 Fr3	V	V	V	V	V
65	59 Fr3	P	P	P	P	P
66	60 Fr3	D	D	D	D	D
67	61 Fr3	R	R	R	R	R
68	62 Fr3	F	F	F	F	F
69	63 Fr3	T	S	S	S	S
70	64 Fr3	G	G	G	G	G
71	65 Fr3	S	S	S	S	S
72	66 Fr3	G	G	G	G	G
73	67 Fr3	S	S	S	S	S

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	6A10 VL của chuỗi (SEQ ID NO:64)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
74	68	Fr3	G	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T	T
76	70	Fr3	D	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G	G
91	85	Fr3	V	V	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	W	M	W	W	W
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	G	G	G	G
98	92	CDR-L3	T	T	T	T	T
99	93	CDR-L3	H	H	H	H	H

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	6A10 VL của chuột (SEQ ID NO:64)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
100	94	CDR-L3	F	R	F	F	F
101	95	CDR-L3	P	P	P	P	P
102	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-
103	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-
104	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-
105	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-
106	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-
107	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-
108	96	CDR-L3	Y	L	Y	Y	Y
109	97	CDR-L3	T	T	T	T	T
110	98	Fr4	F	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G	G
112	100	Fr4	G	G	G	G	G
113	101	Fr4	G	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V	V
117	105	Fr4	E	E	E	E	E
118	106	Fr4	I	I	I	I	I
119	106A	Fr4	-	-	-	-	-
120	107	Fr4	K	K	K	K	K

Bảng 13

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	6A10 VH chuỗi (SEQ ID NO:63)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
6	6	Fr1	Q	E	E	E	E
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	S	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	G
17	17	Fr1	S	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	V	V	V
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	T	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	6A10 VH chuột (SEQ ID NO:63)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	L	Y	L	L	L
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	T	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	G	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	M	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H
36	35A	CDR-H1	-	-			
37	35B	CDR-H1	-	-			
38	36	Fr2	W	W	W	W	W
39	37	Fr2	V	V	V	V	V
40	38	Fr2	K	R	R	R	R
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2	R	A	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P	P
44	42	Fr2	E	G	G	G	G
45	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
46	44	Fr2	G	G	G	G	G
47	45	Fr2	L	L	L	L	L
48	46	Fr2	E	E	E	E	E

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat # FR hoặc CDR	6A10 VH chuột (SEQ ID NO:63)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
49	47 Fr2	W	W	W	W	W
50	48 Fr2	I	M	M	I	I
51	49 Fr2	G	G	G	G	G
52	50 CDR-H2	W	W	W	W	W
53	51 CDR-H2	I	I	I	I	I
54	52 CDR-H2	D	N	D	D	D
55	52A CDR-H2	P	P	P	P	P
56	52B CDR-H2	-	-			
57	52C CDR-H2	-	-			
58	53 CDR-H2	E	N	E	E	E
59	54 CDR-H2	N	S	N	N	N
60	55 CDR-H2	D	G	D	D	D
61	56 CDR-H2	D	D	D	D	D
62	57 CDR-H2	T	T	T	T	T
63	58 CDR-H2	E	N	E	E	E
64	59 CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y
65	60 CDR-H2	A	A	A	A	A
66	61 CDR-H2	P	Q	P	P	P
67	62 CDR-H2	K	K	K	K	K
68	63 CDR-H2	F	F	F	F	F
69	64 CDR-H2	Q	Q	Q	Q	Q
70	65 CDR-H2	G	G	G	G	G
71	66 Fr3	R	R	R	R	R
72	67 Fr3	A	V	V	V	V

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat # FR hoặc CDR	6A10 VH chuột (SEQ ID NO:63)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
73	68 Fr3	T	T	T	T	T
74	69 Fr3	L	T	T	T	I
75	70 Fr3	T	T	T	T	T
76	71 Fr3	T	R	R	R	R
77	72 Fr3	D	D	D	D	D
78	73 Fr3	T	T	T	T	T
79	74 Fr3	S	S	S	S	S
80	75 Fr3	S	I	I	I	I
81	76 Fr3	N	S	S	S	S
82	77 Fr3	T	T	T	T	T
83	78 Fr3	A	A	A	A	A
84	79 Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
85	80 Fr3	L	M	M	M	L
86	81 Fr3	Q	E	E	E	E
87	82 Fr3	L	L	L	L	L
88	82A Fr3	S	S	S	S	S
89	82B Fr3	S	R	R	R	R
90	82C Fr3	L	L	L	L	L
91	83 Fr3	T	R	R	R	R
92	84 Fr3	S	S	S	S	S
93	85 Fr3	E	D	D	D	D
94	86 Fr3	D	D	D	D	D
95	87 Fr3	T	T	T	T	T

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat # FR hoặc CDR	6A10 VH chuột (SEQ ID NO:63)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
96	88 Fr3	A	A	A	A	A
97	89 Fr3	V	V	V	V	V
98	90 Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
99	91 Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
100	92 Fr3	C	C	C	C	C
101	93 Fr3	T	A	A	A	A
102	94 Fr3	P	R	R	R	R
103	95 CDR-H3	L	L	L	L	L
104	96 CDR-H3	–	A	–	–	
105	97 CDR-H3	–	A	–	–	
106	98 CDR-H3	–	R	–	–	
107	99 CDR-H3	–	P	–	–	
108	100 CDR-H3	–	L	–	–	
109	100A CDR-H3	–		–	–	
110	100B CDR-H3	–		–	–	
111	100C CDR-H3	–		–	–	
112	100D CDR-H3	–		–	–	
113	100E CDR-H3	–	–	–	–	
114	100F CDR-H3	–	–	–	–	
115	100G CDR-H3	–	–	–	–	
116	100H CDR-H3	–	–	–	–	
s 117	100I CDR-H3	–	–	–	–	
118	100J CDR-H3	–	–	–	–	

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	6A10 VH chuột (SEQ ID NO:63)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
119	100K	CDR-H3	-	-	-	-	
120	101	CDR-H3	D	D	D	D	D
121	102	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y
122	103	Fr4	W	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	L	L	L	L
128	109	Fr4	V	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S	S

Bảng 14

Các đột biến ngược V_H, V_L và các đột biến khác cho 6A10 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	Không
hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	H48
hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	H16, H48, H69, H80
hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	Không
hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	L46
hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	L12, L17, L46

Bảng 15

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nặng của các kháng thể 6A10 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận số truy cập# ACR16112 (SEQ ID NO:81)	6A10 VH chuột (SEQ ID NO:63)	hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)
H16	A	A	A	A	G
H48	M	I	M	I	I
H69	T	L	T	T	I
H80	M	L	M	M	L

Bảng 16

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nhẹ của các kháng thể 6A10 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận số truy cập# ABC66863 (SEQ ID NO:83)	6A10 VL của chuột (SEQ ID NO:64)	hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)
L12	P	S	P	P	S
L17	Q	Q	Q	Q	E
L46	R	R	R	L	L

Bảng 17

Tỷ lệ phần trăm tính người của chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể 6A10 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	% Tính người
hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	83,7%
hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	82,7%
hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)	80,6%
hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)	90,0%
hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)	89,0%
hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)	87,0%

Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc lớp Chothia, gốc vecnê, hoặc gốc ở mặt phân cách/gói khác nhau giữa các trình tự nhận của chuột và người là các ứng viên cho sự thế. Ví dụ về các gốc chính tắc lớp Chothia bao gồm các gốc Kabat H48 và H93 trong Bảng 12 và 13. Ví dụ về các gốc vecnê bao gồm các gốc Kabat trong Bảng 12 và 13. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/gói (VH+VL) bao gồm các gốc Kabat H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, và L98, trong Bảng 12 và 13.

Lý do để lựa chọn các vị trí này được chỉ ra trong Bảng 12 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm ứng viên cho sự thế là như sau.

R46L: Đây là gốc mặt phân cách và thường là L

P12S: P là hiếm trong khung người ở vị trí này, S là phổ biến

Q17E: Q là hiếm trong khung người ở vị trí này, E là phổ biến

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

vùng trưởng thành của trình tự axit amin m6A10VL (SEQ ID NO:64)

DVVM TQTPL T LSV TIGQPASISCKSSQSL LDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLV
SKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEI
K

Trình tự nhận 6A10 VL số truy cập #ABC66863 (SEQ ID NO:83)

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKV
 SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHRPLTFGGGKVEI
 K

>3F4-VL số truy cập 1CR9_L (SEQ ID NO:30)

DVVMQTQTPLSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLIWVFQRPQGSPKRLIFLVS
 KRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFHPTVGGGKLEI
 A

>IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYK
 VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPLTFGGGKVK
 EIK

>hu6A10-VL_v1 (SEQ ID NO:88)

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
 SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGKVEIK

>hu6A10-VL_v2 (SEQ ID NO:89)

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLV
 SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGKVEIK

>hu6A10-VL_v3 (SEQ ID NO:90)

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLV
 SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFGGGKVEIK

Lý do để lựa chọn các vị trí này được chỉ ra trong Bảng 13 trong vùng biến đổi chuỗi nặng làm ứng viên cho sự thể là như sau.

M48I: Đây là gốc chính tắc/tương tác CDR, được gây đột biến ngược để bảo tồn tương tác CDR.

A16G: Ala là hiếm trong khung người ở vị trí này, Gly là phổ biến

T69I: Thr là hiếm ở vị trí này, Ile là phổ biến

M80L: Mặc dù Met là phổ biến, Leu là phổ biến nhất ở vị trí này

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

vùng trưởng thành của trình tự axit amin m6A10VH (SEQ ID NO:63)

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NDDTEYAPKFQGRATLT TDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTPLDYWGQGTSV
TVSS

Trình tự nhận 6A10 VH số truy cập # ACR16112 (SEQ ID NO:84)

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWI
NPNSGDTNYAQKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARLAARPLD
YWGQGTLVTVSS

>3F4-VH số truy cập 1CR9_H (SEQ ID NO:27)

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYIQWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGNSEYAPRFQGKATMTADT LSN TAYLQLSSLTSEDTAVYYCNADLHDYWGQG
TTLTVSS

>IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:82)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWI
NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARSRRGY
DFWSGSPEDYWGQGTLVTVSS

>hu6A10-VH_v1 (SEQ ID NO:85)

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENDDTEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARLDYWGQGTL
VTVSS

>hu6A10-VH_v2 (SEQ ID NO:86)

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDP
ENDDTEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCARLDYWGQGTL
VTVSS

>hu6A10-VH_v3 (SEQ ID NO:87)

QVQLQESGAEVKKPGGSVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDP
ENDDTEYAPKFQGRVTITRDTSISTAYLELSR LRSDDTAVYYCARLDYWGQGTL
VTVSS

Ví dụ 8. Thiết kế các kháng thể 8A4 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu để làm cho kháng thể đơn dòng 8A4 tương thích với người là kháng thể chuột 8A4. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của 8A4 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:91. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của 8A4 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:92. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 tổ hợp Kabat/Chothia chuỗi nặng được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:93-95. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 Kabat chuỗi nhẹ được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:96-98. Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ phần này.

Sắp xếp thẳng hàng các trình tự vùng biến đổi của 8A4 với các trình tự liên ứng của vùng biến đổi kháng thể từ Kabat, và *đồng tác giả* (Kabat EA, Wu TT, Foeller C, Perry HM, Gottesman KS. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (xuất bản lần thứ 5). Bethesda, MD: National Institutes of Health) chỉ ra rằng vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 8A4 thuộc phân nhóm VH chuột 2c, mà tương ứng với phân nhóm VH người 1. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) kappa của 8A4 thuộc phân nhóm Vk chuột 2, mà tương ứng với phân nhóm Vk người 2.

Các CDR của 8A4 VH và VL được nhận diện bằng cách sử dụng quy tắc nhận diện CDR dựa trên trình tự của Martin (Martin ACR. (2010) Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains. Trong: Kontermann R và Dübel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Đức: Springer International Publishing AG.) Sau đó các CDR được phân vào các lớp chính tắc Chothia bằng cách sử dụng phần tổng hợp các gốc quan trọng được thể hiện trong Bảng 3.5 của Martin:

CDR-H1 bao gồm 10 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 1.

CDR-H2 bao gồm 17 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 2.

CDR-H3 bao gồm 3 axit amin; không có lớp nào cho CDR-H3.

CDR-L1 bao gồm 16 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 4.

CDR-L2 bao gồm 7 axit amin và thuộc lớp chính tắc Chothia 1.

CDR-L3 bao gồm 9 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 1.

Các gốc ở mặt phân cách giữa các miền Vk và Vh là các gốc thường được tìm thấy, ngoại trừ 93S trong chuỗi nặng thường là alanin; do đó, gốc này được phân tích là đích cho

đột biến ngược. Tương tự, 36L trong vk thường là Y hoặc F do đó, gốc này cũng được phân tích cho các đột biến ngược. Ngoài ra, CDR3 chuỗi nhẹ có gốc xystein chưa bắt cặp.

Việc tìm kiếm được thực hiện trên các trình tự protein trong cơ sở dữ liệu PDB [Deshpande N. và đồng tác giả, (2005) *Nucleic Acids Res.* 33:D233-D237.] để tìm ra các cấu trúc sẽ cung cấp mô hình cấu trúc thô của 8A4. Cấu trúc tinh thể của fab kháng thể (pdb mã 3JAU; SEQ ID NO:111) [Ye X, và đồng tác giả, (2016) *PLoS Pathog.*] được sử dụng cho cấu trúc Vk vì nó có độ phân giải tốt (4,8Å) và sự tương đồng toàn bộ trình tự với 8A4 Vk giữ được các cấu trúc chính tắc giống như vậy cho các vòng này. Cùng một cấu trúc {pdb mã 3JAU; SEQ ID NO:109} cũng được sử dụng cho cấu trúc Vh vì nó có sự tương đồng toàn bộ trình tự tốt và độ phân giải tốt thích hợp (4,8Å). Ngoài ra, các CDR-H1 và H2 có cùng các cấu trúc chính tắc với 8A4 VH. Phần mềm Bioluminate được sử dụng để lập mô hình cấu trúc thô của 8A4. Phần mềm này được chuyển giao quyền sử dụng từ Schrodinger Inc.

Việc tìm kiếm cơ sở dữ liệu trình tự protein không dư thừa từ NCBI cho phép lựa chọn các khung người thích hợp để ghép các CDR chuột vào đó. Đối với Vk, vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa người có số truy cập# ABA26100[SEQ ID NO:112; Rabquer, .B.J., và đồng tác giả, 2016; Differential variable gene usage between pneumococcal polysaccharide specific B cells isolated 5-10 days and 4-6 weeks post-vaccination. *Unpublished*] được chọn. Vùng này có cùng các lớp chính tắc cho CDR-L1 và L2 với 8A4 VL của chuột. Nó là một thành viên của phân nhóm kappa Kabat người 2. Đối với Vh, vùng biến đổi chuỗi nặng người có số truy cập# ADU57742 [SEQ ID NO:110; Lantto, J., và đồng tác giả, 2011 *J. Virol.* 85:1820-1833] được chọn; nó có cùng các lớp chính tắc với 8A4 VH của chuột. Nó là thành viên của phân nhóm nặng Kabat của người 1.

3 biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và 3 biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị khác nhau của các đột biến thể, hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2, và hu8A4-VH_v3, (SEQ ID NO:113-115 tương ứng) và hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2, và hu8A4-VL_v3, (SEQ ID NO:116-118, tương ứng). (Bảng 18 và 19). Các thiết kế VL và VH được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên các khung người đã chọn, được thể hiện trong các Bảng 18 và 19, tương ứng. Các vùng được in đậm trong Bảng 18 và 19 thể hiện các CDR như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia. Dấu “-”

trong các cột ở Bảng 18 và 19 chỉ ra không có gốc nào ở vị trí được chỉ ra. SEQ ID NO:113-115 và SEQ ID NO:116-118 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong Bảng 20. Các axit amin ở các vị trí trong hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2, và hu8A4-VH_v3 được liệt kê trong Bảng 21. Các axit amin ở các vị trí trong hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2, và hu8A4-VL_v3 được liệt kê trong Bảng 22. Tỷ lệ phần trăm tính người đối với các chuỗi VH được làm tương thích với người hu8A4-VH_v1, hu8A4-VH_v2, và hu8A4-VH_v3, (SEQ ID NO:113-115, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:82), và cho các chuỗi VL được làm tương thích với người hu8A4-VL_v1, hu8A4-VL_v2, và hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:116-118, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84), được thể hiện trong Bảng 23.

Bảng 18

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VL chuỗi (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận có số truy cập #ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	I	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	S	S	S	S
13	13	Fr1	V	V	V	V	V

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VL chuỗi (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận có số truy cập #ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	Hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	Hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
14	14	Fr1	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	E	E
18	18	Fr1	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	R	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L1	L	V	L	L	L
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S	S

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VL chuỗi (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận có số truy cập #ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
		L1					
	27F	CDR-L1	-	-			
33	28	CDR-L1	D	D	D	D	D
34	29	CDR-L1	G	G	G	G	G
35	30	CDR-L1	K	S	K	K	K
36	31	CDR-L1	T	T	T	T	T
37	32	CDR-L1	Y	W	Y	Y	Y
38	33	CDR-L1	L	L	L	L	L
39	34	CDR-L1	N	N	N	N	N
40	35	Fr2	W	W	W	W	W
41	36	Fr2	L	F	F	F	L
42	37	Fr2	L	Q	Q	Q	Q
43	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
44	39	Fr2	R	R	R	R	R
45	40	Fr2	P	P	P	P	P
46	41	Fr2	G	G	G	G	G
47	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
48	43	Fr2	S	S	S	S	S
49	44	Fr2	P	P	P	P	P

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VL chuột (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận có số truy cập #ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
50	45	Fr2	K	R	R	R	R
51	46	Fr2	R	R	R	R	R
52	47	Fr2	L	L	L	L	L
53	48	Fr2	I	I	I	I	I
54	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
55	50	CDR-L2	L	D	L	L	L
56	51	CDR-L2	V	V	V	V	V
57	52	CDR-L2	S	S	S	S	S
58	53	CDR-L2	K	T	K	K	K
59	54	CDR-L2	L	R	L	L	L
60	55	CDR-L2	D	D	D	D	D
61	56	CDR-L2	S	S	S	S	S
62	57	Fr3	G	G	G	G	G
63	58	Fr3	V	V	V	V	V
64	59	Fr3	P	P	P	P	P
65	60	Fr3	D	D	D	D	D
66	61	Fr3	R	R	R	R	R
67	62	Fr3	F	F	F	F	F
68	63	Fr3	T	S	S	S	S
69	64	Fr3	G	G	G	G	G

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VL chuỗi (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận có số truy cập #ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	Hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	Hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
70	65	Fr3	S	S	S	S	S
71	66	Fr3	G	G	G	G	G
72	67	Fr3	S	S	S	S	S
73	68	Fr3	G	G	G	G	G
74	69	Fr3	T	T	T	T	T
75	70	Fr3	D	D	D	D	D
76	71	Fr3	F	F	F	F	F
77	72	Fr3	T	T	T	T	T
78	73	Fr3	L	L	L	L	L
79	74	Fr3	K	K	K	K	K
80	75	Fr3	I	I	I	I	I
81	76	Fr3	S	S	S	S	S
82	77	Fr3	R	R	R	R	R
83	78	Fr3	V	V	V	V	V
84	79	Fr3	E	E	E	E	E
85	80	Fr3	A	A	A	A	A
86	81	Fr3	E	E	E	E	E
87	82	Fr3	D	D	D	D	D
88	83	Fr3	L	V	V	V	V
89	84	Fr3	G	G	G	G	G
90	85	Fr3	V	V	V	V	V
91	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
92	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
93	88	Fr3	C	C	C	C	C
94	89	CDR-L3	W	M	W	W	W

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VL chuột (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận có số truy cập #ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
95	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
96	91	CDR-L3	G	F	G	G	G
97	92	CDR-L3	T	I	T	T	T
98	93	CDR-L3	H	D	H	H	H
99	94	CDR-L3	F	W	F	F	F
100	95	CDR-L3	P	P	P	P	P
	95A	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95B	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95C	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95D	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95E	CDR-L3	-	-	-	-	-
	95F	CDR-L3	-	-	-	-	-
101	96	CDR-L3	C	H	C	C	C
102	97	CDR-L3	T	T	T	T	T

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VL chuột (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận có số truy cập #ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu u8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu u8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
		L3					
103	98	Fr4	F	F	F	F	F
104	99	Fr4	G	G	G	G	G
105	100	Fr4	G	Q	Q	Q	Q
106	101	Fr4	G	G	G	G	G
107	102	Fr4	T	T	T	T	T
108	103	Fr4	K	K	K	K	K
109	104	Fr4	L	L	L	L	L
110	105	Fr4	E	E	E	E	E
111	106	Fr4	I	I	I	I	I
	106A	Fr4	-	-	-	-	-
112	107	Fr4	K	K	K	K	K

Bảng 19

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuỗi (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	K	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	S	S	G	G
17	17	Fr1	L	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	V	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K	K

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuột (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
24	24	Fr1	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	G	F	F	F
28	28	CDR-H1	N	T	N	N	N
29	29	CDR-H1	I	F	I	I	I
30	30	CDR-H1	K	S	K	K	K
31	31	CDR-H1	D	S	D	D	D
32	32	CDR-H1	Y	N	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	P	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	I	V	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	S	H	H	H
	35A	CDR-H1	-	-	-	-	-
	35B	CDR-	-	-	-	-	-

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuột (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
		H1					
36	36	Fr2	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	M	M	I
49	49	Fr2	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	G	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	D	I	D	D	D
53	52A	CDR-H2	P	P	P	P	P
	52B	CDR-H2	-	-	-	-	-

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuột (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
	52C	CDR-H2	-	-	-	-	-
54	53	CDR-H2	E	F	E	E	E
55	54	CDR-H2	N	A	N	N	N
56	55	CDR-H2	G	Q	G	G	G
57	56	CDR-H2	D	K	D	D	D
58	57	CDR-H2	T	V	T	T	T
59	58	CDR-H2	V	L	V	V	V
60	59	CDR-H2	Y	G	Y	Y	Y
61	60	CDR-H2	D	A	D	D	D
62	61	CDR-H2	P	Q	P	P	P
63	62	CDR-H2	Q	R	Q	Q	Q
64	63	CDR-H2	F	V	F	F	F
65	64	CDR-H2	Q	R	Q	Q	Q

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuột (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
		H2					
66	65	CDR-H2	D	D	D	D	D
67	66	Fr3	K	R	R	R	R
68	67	Fr3	A	I	I	I	A
69	68	Fr3	N	N	N	T	T
70	69	Fr3	I	I	I	I	I
71	70	Fr3	T	T	T	T	T
72	71	Fr3	A	A	A	A	A
73	72	Fr3	D	D	D	D	D
74	73	Fr3	T	T	T	T	T
75	74	Fr3	S	S	S	S	S
76	75	Fr3	S	T	T	T	T
77	76	Fr3	N	S	S	S	S
78	77	Fr3	T	T	T	T	T
79	78	Fr3	A	A	A	A	A
80	79	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
81	80	Fr3	L	M	M	M	M
82	81	Fr3	Q	E	E	E	E
83	82	Fr3	L	L	L	L	L
84	82A	Fr3	S	S	S	S	S
85	82B	Fr3	S	G	G	G	G
86	82C	Fr3	L	L	L	L	L
87	83	Fr3	T	R	R	R	R
88	84	Fr3	S	S	S	S	S

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuột (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
89	85	Fr3	E	D	D	D	E
90	86	Fr3	G	D	D	D	D
91	87	Fr3	T	T	T	T	T
92	88	Fr3	A	A	A	A	A
93	89	Fr3	V	V	V	V	V
94	90	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
95	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
96	92	Fr3	C	C	C	C	C
97	93	Fr3	S	A	S	S	A
98	94	Fr3	T	T	T	T	T
99	95	CDR-H3	L	G	L	L	L
	96	CDR-H3	-	Q	-	-	-
	97	CDR-H3	-	Q	-	-	-
	98	CDR-H3	-	L	-	-	-
	99	CDR-H3	-	Y	-	-	-
	100	CDR-H3	-	S	-	-	-
	100A	CDR-H3	-	L	-	-	-
	100B	CDR-	-		-	-	-

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuỗi (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
		H3					
	100C	CDR-H3	-		-	-	-
	100D	CDR-H3	-		-	-	-
	100E	CDR-H3	-		-	-	-
	100F	CDR-H3	-		-	-	-
	100G	CDR-H3	-		-	-	-
	100H	CDR-H3	-		-	-	-
	100I	CDR-H3	-		-	-	-
	100J	CDR-H3	-		-	-	-
	100K	CDR-H3	-		-	-	-
100	101	CDR-H3	D	H	D	D	D
101	102	CDR-H3	F	Y	F	F	F
102	103	Fr4	W	W	W	W	W
103	104	Fr4	G	G	G	G	G

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	8A4 VH chuỗi (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận có số truy cập # ADU57742 (SEQ ID NO:110)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
104	105	Fr4	Q	Q	Q	Q	Q
105	106	Fr4	G	G	G	G	G
106	107	Fr4	T	T	T	T	T
107	108	Fr4	T	L	L	L	L
108	109	Fr4	L	V	V	V	V
109	110	Fr4	T	T	T	T	T
110	111	Fr4	V	V	V	V	V
111	112	Fr4	S	S	S	S	S
112	113	Fr4	S	S	S	S	S

Bảng 20

Các đột biến ngược V_H , V_L và các đột biến khác cho 8A4 được làm tương thích với người

Biến thể V_H hoặc V_L	Trình tự nhận exon V_H hoặc V_L	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	Trình tự nhận số truy cập# ADU57742 (SEQ ID NO:110)	H93
hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	Trình tự nhận số truy cập# ADU57742 (SEQ ID NO:110)	H12, H16, H20, H68, H93
hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)	Trình tự nhận số truy cập# ADU57742 (SEQ ID NO:110)	H12, H16, H20, H48, H67, H68, H85

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	Trình tự nhận có số truy cập # ABA26100 (SEQ ID NO:112)	Không
hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	Trình tự nhận có số truy cập # ABA26100 (SEQ ID NO:112)	L17
hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)	Trình tự nhận có số truy cập # ABA26100 (SEQ ID NO:112)	L2, L17, L36

Bảng 21

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nặng của các kháng thể 8A4 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận số truy cập# ADU57742 (SEQ ID NO:110)	8A4 VH chuột (SEQ ID NO:91)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
H12	K	V	K	V	V
H16	S	A	S	G	G
H20	V	L	V	L	L
H48	M	I	M	M	I

Góc Kabat #	Trình tự nhận số truy cập# ADU57742 (SEQ ID NO:110)	8A4 VH chuột (SEQ ID NO:91)	hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)
H67	I	A	I	I	A
H68	N	N	N	T	T
H85	D	E	D	D	E
H93	A	S	S	S	A

Bảng 22

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nhẹ của các kháng thể 8A4 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận có số truy cập# ABA26100 (SEQ ID NO:112)	8A4 VL của chuột (SEQ ID NO:92)	hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)
L2	I	V	I	I	V
L17	Q	Q	Q	E	E
L36	F	L	F	F	L

Bảng 23

Tỷ lệ phần trăm tính người của chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể 8A4 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	% Tính người
hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)	75,3%
hu8A4-VH_v2 (SEQ ID NO:114)	75,3%
hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)	75,3%
hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)	89%
hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)	88%
hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)	88%

Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc lớp Chothia, gốc vecnê, hoặc gốc ở mặt phân cách/gói khác nhau giữa các trình tự nhận của chuột và người là các ứng viên cho sự thể. Ví dụ về các gốc chính tắc lớp Chothia bao gồm các gốc Kabat H24, H26, H29, H34, H54, H55, H71, H94, L2, L25, L27B, L27C, L29, L33, L34, L71, L90, L94, L95, và L97 trong các Bảng 18 và 19 và y. Ví dụ về các gốc vecnê bao gồm các gốc Kabat H2, H27, H28, H29, H30, H47, H48, H49, H67, H69, H71, H73, H78, H93, H94, H103, L2, L4, L35, L36, L46, L47, L48, L49, L64, L66, L68, L69, L71, và L98, trong Bảng 18 và 19. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/gói (VH+VL) bao gồm các gốc Kabat H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, và L98 trong Bảng 18 và 19.

Lý do để lựa chọn các vị trí được chỉ ra trong Bảng 18 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm ứng viên cho sự thể là như sau.

I2V là đột biến ngược của gốc chính tắc và Vecnê.

Q17E là đột biến dựa trên tần số vì Q là hiếm trong khung người ở vị trí này và E là phổ biến nhất.

F36L là đột biến ngược của gốc mặt phân cách và Vecnê.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

vùng trưởng thành của 8A4VL chuột (SEQ ID NO:92)

DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPCTFGGGTKLEI
K

3JAUVL (SEQ ID NO:111)

DVLMQTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADLVGVYYCYQGSHVPYTFGGGTKL
EIK

ABA26100 (SEQ ID NO:112)

DVMTSSSVTGASSCRSSSVYSDGSTWNWRGSRRYDVSTRDSGVDRSGSGSGTDT
KSRVADVGVYYCMTDWTGGTKK

IGKV2-30*02(SEQ ID NO:84)

DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEI
K

hu8A4-VL_v1 (SEQ ID NO:116)

DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKLEI
K

hu8A4-VL_v2 (SEQ ID NO:117)

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRL
IYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGT
KLEIK

hu8A4-VL_v3 (SEQ ID NO:118)

DVVMQTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKL
EIK

Lý do để lựa chọn các vị trí này được chỉ ra trong Bảng 19 trong vùng biến đổi chuỗi

nặng làm ứng viên cho sự thể là như sau.

K12V là đột biến ngược và đột biến dựa trên tần số vì V là phổ biến ở vị trí này trong các khung người.

S16G là đột biến dựa trên tần số vì G là phổ biến nhất ở vị trí này.

V20L là đột biến ngược và đột biến dựa trên tần số vì L là phổ biến nhất ở vị trí này.

M48I là đột biến ngược của gốc Vecnê.

I67A là đột biến ngược của gốc Vecnê.

N68T là đột biến dựa trên tần số vì T là phổ biến nhất ở vị trí này.

D85E là đột biến dựa trên tần số vì E là phổ biến nhất ở vị trí này trong các khung người. A93S là đột biến ngược trong hu8A4-VHv1 và hu8A4VH-v2 của gốc Vecnê và mặt phân cách để bảo tồn sự đóng gói CDR. Trong hu8A4VH-v3, vị trí Kabat là A vì A là phổ biến nhất ở vị trí này và S là hiếm.

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

Vùng trưởng thành của 8A4 VH của chuột (SEQ ID NO:91)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCSTLDFWGQGTTL
TVSS

3JAU VH (SEQ ID NO:109)

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGKIDPA
NGNTKYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCANSNYWFDY
WGQGTTLTVSS

ADU57742 (SEQ ID NO:110)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSNPVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPF
AQKVLGAQRVRDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCATGQQLYSLHY
WGQGTLLTVSS

IGHV1-2*02(SEQ ID NO:82)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENGDTVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGTLL

VTVSS

hu8A4-VH_v1 (SEQ ID NO:113)

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENGDTVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGTL
VTVSS

hu8A4-VH_v2: (SEQ ID NO:114)

QVQLQQSGAEVVKPGGSVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENGDTVYDPQFQDRITITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGTL
VTVSS

hu8A4-VH_v3 (SEQ ID NO:115)

QVQLQQSGAEVVKPGGSVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPQFQDRATITADTSTSTAYMELSGLRSEDTAVYYCATLDFWGQGTLV
TVSS

Ví dụ 9. Thiết kế các kháng thể 7G6 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu để làm cho kháng thể đơn dòng 7G6 tương thích với người là kháng thể chuột 7G6. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của 7G6 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:119. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của 7G6 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:120. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 tổ hợp Kabat/Chothia chuỗi nặng được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:121-123. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 Kabat chuỗi nhẹ được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:124-126. Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ phần này.

Sắp xếp thẳng hàng các trình tự vùng biến đổi của 7G6 với các trình tự liên ứng của vùng biến đổi kháng thể từ Kabat, và *đồng tác giả* [Kabat EA, Wu TT, Perry H, Gottesman K, Foeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, xuất bản lần thứ năm. Công bố NIH số 91-3242] chỉ ra rằng vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 7G6 thuộc phân nhóm VH chuột 2c, mà tương ứng với phân nhóm VH người 1. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) kappa của 7G6 thuộc phân nhóm Vk chuột 2, mà tương ứng với phân nhóm Vk người 2.

Các CDR của 7G6 VH và VL được nhận diện bằng cách sử dụng quy tắc nhận diện

CDR dựa trên trình tự của Martin [Martin AC, Thornton JM. (1996) Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modeling and application to antibodies. J Mol Biol. 263:800-15.]. Sau đó các CDR được phân vào các lớp chính tắc Chothia bằng cách sử dụng phân tổng hợp các góc quan trọng được thể hiện trong Bảng 3.5 của Martin:

CDR-H1 bao gồm 7 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 1.

CDR-H2 bao gồm 6 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 2.

CDR-H3 bao gồm 3 axit amin; không có lớp nào cho CDR-H3.

CDR-L1 bao gồm 16 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 4.

CDR-L2 bao gồm 7 axit amin và thuộc lớp chính tắc Chothia 1.

CDR-L3 bao gồm 9 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 1.

Cơ sở làm tương thích với người cho miễn biến đổi globulin miễn dịch 7G6

Kháng thể chuột Prothema-7G6 (sau đây chỉ gọi là 7G6) được làm tương thích với người theo khuôn kháng thể nhận của người được ký hiệu là 3U0T [La Porte, S. L., và đồng tác giả, (2012) J. Mol. Biol. 421:525-536] trong Ngân hàng dữ liệu protein RCSB. Khuôn kháng thể này được nhận diện bằng cách tìm kiếm sự tương đồng trình tự đặc hiệu kháng thể, được giới hạn ở các góc miễn biến đổi VL (1-110) và VH (1-114). Tìm kiếm tương đồng sử dụng phần mềm Schrodinger BioLuminate, phiên bản 3.1, phát hành 2018-1. Phần mềm này so sánh trình tự kháng thể đích (7G6) với cơ sở dữ liệu được lựa chọn Schrodinger của các trình tự miễn biến đổi người và chuột mà các cấu trúc tinh thể protein chất lượng cao đã được công bố cho nó.

Chọn khuôn kháng thể người

Kháng thể khuôn 3U0T [3U0T_VH SEQ ID NO:127; 3U0T_VL SEQ ID NO:138] có độ phân giải 2,5 Angstrom, được nhận diện trong nhóm gồm một số kháng thể người có tỷ lệ tương đồng hoặc tương đồng trình tự axit amin cao hơn 80% với 7G6 ở các miễn biến đổi VH và VL tương ứng và cũng có cấu trúc tinh thể có độ phân giải thấp hơn 3,0 Angstroms. Một số kháng thể khác trong nhóm này bao gồm (theo mã PDB): 4YVG, 6BOG, 4KY1, 5TZZ, 4HCR, và 5K9O. 3U0T được chọn vì sự tương đồng trình tự cao với 7G6 ở các vị trí trên mặt phân cách VH/VL như được đánh số bởi Kabat. VH

[35,37,39,45,47,89,91,93] và VL[44,45,46,47,48,49]. Trong số các gốc ở mặt phân cách này 7G6 và 3U0T chỉ khác nhau ở VL-45 (R so với K) và VH-93 (T so với A). Sự tương đồng chung sự tương đồng miền biến đổi trong các vùng khung được xác định theo Chothia nằm trong Bảng 24. (Khung Chothia, ngược lại với Kabat, kết thúc CDR-H2 ở vị trí 58).

Bảng 24

Sự tương đồng trình tự giữa các miền biến đổi 7G6 và 3U0T

Vùng chức năng	Tổng số các gốc khung	Tương đồng	Tương đồng	Khác biệt
VL	81	7	6	5
VH	89	62	13	14

Axit amin tương đồng được phân nhóm theo độ phân cực và điện tích, tính thơm, tính kỵ nước, hoặc thể tích và hình dạng, ví dụ (I,L,M,V), (S,T), (F,Y), (E,Q,D,N). VL có tỷ lệ tương đồng hoặc tương đồng lớn hơn 93% trong khung và VH có tỷ lệ tương đồng hoặc tương đồng lớn hơn 84% trong khung. Việc kiểm tra thêm xác định được tính tương đồng cao cho chuỗi nhẹ rất dài CDR-1. Trong số 20 gốc, 17 gốc giống nhau và 2 gốc khác nhau, (D,Y) ở VL-7D và (G,A) ở VL-29. Cấu trúc tinh thể cho 3U0T do đó cung cấp tham chiếu tốt cho hình dạng của CDR L-1.

Các khác biệt điển hình giữa 7G6 và 3U0T là:

Gốc 89-W trong VL của 7G6. Gốc này nằm trong mặt phân cách VL/VH, tại đó nó thay thế F từ 3U0T. Việc tạo mô hình cấu trúc ban đầu với BioLuminate Antibody Prediction tạo ra các cấu trúc trong đó W89 có một trong hai chất đồng phân quay chuỗi bên. $\text{Ch1} = 0$ hoặc 90° . Đồng phân quay $\text{Ch1} = 0$ đặt W89 vuông góc với mặt phân cách VL/VH. Ở vị trí này, W89 tham gia vào nền của túi liên kết kháng nguyên và có khả năng tiếp xúc van der Waals với cả CDR-H3 (cụ thể là Leu-95 trong VH) và một số gốc được bảo tồn mà nếu không các gốc này sẽ tạo thành mặt phân cách VL/VH. Đồng phân quay $\text{Ch1} = 180^\circ$ hướng chuỗi bên Tryptophan song song với mặt phân cách VH/VL; sau đó nó không có tiếp xúc với CDR-H3 nhưng có các tiếp xúc van der Waals với một số gốc được bảo tồn khác mà tạo thành mặt phân cách VH/VL. Các biến thể được làm tương thích với người điển hình của 7G6 VL sử dụng hướng $\text{ch1} = 0$ của Trp. Sáng chế cũng đề xuất đột biến của các axit amin khung khác mà có tiếp xúc van der Waals với W89 ở $\text{ch1} = 90^\circ$

nhưng không phải $ch1=0$.

Xystin được bảo tồn cao ở Kabat 92H gần như có ở khắp nơi trong các nếp gấp của globulin miễn dịch, vì nó tạo thành cầu nối disulfua với Cys 22-Hvy được bảo tồn tương đương đứng trước CDR H1. Tuy nhiên, trong trình tự 7G6, cầu nối disulfua này của VH bị gãy bởi đột biến 94 Cys thành 94 Ser. Việc tạo mô hình cấu trúc ban đầu với BioLuminate chỉ ra các góc khung có sự biến dạng nhỏ do cầu nối disulfua bị thiếu. Tuy nhiên, liên kết disulfua bị gãy không mang lại tính linh động nhiều hơn cho khung peptit ở Ser-94-hvy. Các biến thể được làm tương thích với người điển hình của 7G6 VH bắt đầu CDR-H3 ở Ser-92 hơn là Ser-94.

Ngay cả với sự kéo dài thêm hai gốc này, CDR H3 của kháng thể 7G6 chỉ có 6 gốc axit amin: STSLDF. Sự ngắn gọn của CDR H3 mở ra túi liên kết kháng nguyên và cũng tạo ra buồng cho đồng phân quay W89 $ch1=0$ miền VL chuỗi nhẹ điển hình được nén dựa vào chuỗi nặng.

Các điểm nóng cho các đột biến của trình tự nhận của người 3U0T là các điểm trong đó góc khung khác với trình tự chuột VÀ góc khung này cũng có khả năng cao nhất tạo thành các tiếp xúc van der Waals với các chất đồng phân quay của chuỗi nhẹ W89. Các vị trí này bao gồm: Chuỗi nặng 50W ở vị trí khởi đầu của CDR2 và các đột biến hồi biến điển hình ở chuỗi nhẹ 36 (F thành L), 37(Q thành L), 45(R thành K) và 100 (Q thành G). Trong một phương án, gốc 50W của chuột được sử dụng trong chuỗi nặng vì nó là một phần của CDR-H2.

2 biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và 8 biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị khác nhau của các đột biến thể, hu7G6-VH_v1 và hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:139-140, tương ứng) và hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7, và hu7G6-VL_v8, (SEQ ID NO:141-148, tương ứng). (Bảng 25 và 26). Các thiết kế VL và VH được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên các khung người đã chọn, được thể hiện trong các Bảng 25 và 26, tương ứng. Các vùng được in đậm trong Bảng 25 và 26 thể hiện các CDR như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia. Dấu “-” trong các cột ở Bảng 25 và 26 chỉ ra không có gốc nào ở vị trí được chỉ ra. SEQ ID NO:139-140 và SEQ ID NO:141-148 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong Bảng 27. Axit

amin ở các vị trí trong hu7G6-VH_v1 và hu7G6-VH_v2 được liệt kê trong Bảng 28. Axit amin ở các vị trí trong hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7, và hu7G6-VL_v8 được liệt kê trong Bảng 29. Tỷ lệ phần trăm tính người cho các chuỗi VH được làm tương thích với người hu7G6-VH_v1, và hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:139-140, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:149), và cho các chuỗi VL được làm tương thích với người hu7G6-VL_v1, hu7G6-VL_v2, hu7G6-VL_v3, hu7G6-VL_v4, hu7G6-VL_v5, hu7G6-VL_v6, hu7G6-VL_v7, và hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:141-148, tương ứng) đối với gen dòng mầm của người tương đương IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84), được chỉ ra trong Bảng 30.

Bảng 25

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VL chuỗi (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VL chuỗi (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
15	15	Fr1	I	L	L	L	L	L	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
18	18	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
30	27C	CDR-L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VL chuỗi (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
		L1										
31	27D	CDR-D L1	Y	D	D	D	D	D	D	D	D	D
32	27E	CDR-S L1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	27F	CDR- L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	28	CDR-D L1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
35	29	CDR-G L1	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
36	30	CDR-K L1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
37	31	CDR-T L1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
38	32	CDR-Y L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L L1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
40	34	CDR-N L1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
41	35	Fr2 W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
42	36	Fr2 L	F	F	F	L	L	F	L	F	L	L

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VL chuỗi (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
43	37	Fr2	L	Q	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
46	40	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
49	43	Fr2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	R	R	R	R	R	K	K	R	R
52	46	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
53	47	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
54	48	Fr2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
56	50	CDR-L2	L	Q	L	L	L	L	L	L	L	L
57	51	CDR-L2	V	I	V	V	V	V	V	V	V	V
58	52	CDR-L2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
59	53	CDR-L2	K	R	K	K	K	K	K	K	K	K

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VL chuỗi (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
60	54	CDR-L2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
61	55	CDR-D2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
62	56	CDR-S2	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S
63	57	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
69	63	Fr3	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
70	64	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72	66	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
76	70	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VL chuỗi (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
81	75	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
91	85	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
94	88	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	W	L	W	W	W	W	W	W	W	W
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
98	92	CDR-L3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR 7G6 VL chuỗi (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
99	93	CDR- L3 H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
100	94	CDR- L3 F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F
101	95	CDR- L3 P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
102	95A	CDR- L3 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	95B	CDR- L3 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	95C	CDR- L3 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	95D	CDR- L3 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	95E	CDR- L3 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	95F	CDR- L3 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	96	CDR- L3 Y	V	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
109	97	CDR- L3 T	L	T	T	T	T	T	T	T	T
110	98	Fr4 F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VL chuột (SEQ ID NO:120)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
111	99	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
112	100	Fr4	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	G	G
113	101	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	R	K	K	K	K	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
117	105	Fr4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
118	106	Fr4	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
119	106 A	Fr4	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
120	107	Fr4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Bảng 26

Góc tuyến tính #	Góc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
1	1	Fr1	E	Q	Q	Q
2	2	Fr1	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A	A	A
10	10	Fr1	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	V	V
13	13	Fr1	R	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A
17	17	Fr1	L	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR 7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
23	23	Fr1 K	K	K	K
24	24	Fr1 A	A	A	A
25	25	Fr1 S	S	S	S
26	26	CDR-H1 G	G	G	G
27	27	CDR-H1 F	Y	F	F
28	28	CDR-H1 N	Y	N	N
29	29	CDR-H1 I	T	I	I
30	30	CDR-H1 K	E	K	K
31	31	CDR-H1 D	A	D	D
32	32	CDR-H1 Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1 Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1 I	I	I	I
35	35	CDR-H1 H	H	H	H

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR 7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
36	35A	CDR-H1 -	-	-	-
37	35B	CDR-H1 -	-	-	-
38	36	Fr2 W	W	W	W
39	37	Fr2 V	V	V	V
40	38	Fr2 K	R	R	K
41	39	Fr2 Q	Q	Q	Q
42	40	Fr2 R	A	A	A
43	41	Fr2 P	P	P	P
44	42	Fr2 E	G	G	G
45	43	Fr2 Q	Q	Q	Q
46	44	Fr2 G	G	G	G
47	45	Fr2 L	L	L	L
48	46	Fr2 E	E	E	E
49	47	Fr2 W	W	W	W
50	48	Fr2 I	M	M	M
51	49	Fr2 G	G	G	G

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR 7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
52	50	CDR-H2 W	R	W	W
53	51	CDR-H2 I	I	I	I
54	52	CDR-H2 D	D	D	D
55	52A	CDR-H2 P	P	P	P
56	52B	CDR-H2			
57	52C	CDR-H2			
58	53	CDR-H2 E	A	E	E
59	54	CDR-H2 N	T	N	N
60	55	CDR-H2 G	G	G	G
61	56	CDR-H2 E	N	E	E
62	57	CDR-H2 T	T	T	T
63	58	CDR-H2 V	K	V	V

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR 7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
		H2			
64	59	CDR- H2 Y	Y	Y	Y
65	60	CDR- H2 D	A	D	D
66	61	CDR- H2 P	P	P	P
67	62	CDR- H2 K	R	K	K
68	63	CDR- H2 F	L	F	F
69	64	CDR- H2 Q	Q	Q	Q
70	65	CDR- H2 G	D	G	G
71	66	Fr3 K	R	R	R
72	67	Fr3 A	V	V	V
73	68	Fr3 S	T	T	T
74	69	Fr3 I	M	I	I
75	70	Fr3 T	T	T	T
76	71	Fr3 S	R	R	R
77	72	Fr3 D	D	D	D

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
78	73	Fr3	T	T	T	T
79	74	Fr3	S	S	S	S
80	75	Fr3	S	T	T	T
81	76	Fr3	N	S	N	N
82	77	Fr3	T	T	T	T
83	78	Fr3	A	V	A	A
84	79	Fr3	Y	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	M	L	L
86	81	Fr3	Q	E	Q	Q
87	82	Fr3	L	L	L	L
88	82A	Fr3	R	S	S	S
89	82B	Fr3	S	S	S	S
90	82C	Fr3	L	L	L	L
91	83	Fr3	T	R	R	R
92	84	Fr3	S	S	S	S
93	85	Fr3	E	E	E	E
94	86	Fr3	D	D	D	D
95	87	Fr3	T	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A
97	89	Fr3	V	V	V	V
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR 7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
99	91	Fr3	Y	Y	Y
100	92	Fr3	S	C	S
101	93	Fr3	T	A	T
102	94	Fr3	S	S	S
103	95	CDR-H3	L	L	L
104	96	CDR-H3	-	Y	-
105	97	CDR-H3	-	S	-
106	98	CDR-H3	-	L	-
107	99	CDR-H3	-	P	-
108	100	CDR-H3	-	-	-
109	100A	CDR-H3	-	-	-
110	100B	CDR-H3	-	-	-
111	100C	CDR-H3	-	-	-

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR 7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
		H3			
112	100D	CDR- H3 -	-	-	-
113	100E	CDR- H3 -	-	-	-
114	100F	CDR- H3 -	-	-	-
115	100G	CDR- H3 -	-	-	-
116	100H	CDR- H3 -	-	-	-
s 117	100I	CDR- H3 -	-	-	-
118	100J	CDR- H3 -	-	-	-
119	100K	CDR- H3 -	-	-	-
120	101	CDR- H3 D	V	D	D
121	102	CDR- H3 F	Y	F	F
122	103	Fr4 W	W	W	W

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
123	104	Fr4	G	G	G	G
124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	T	T	T
128	109	Fr4	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S

Bảng 27

Các đột biến ngược V_H, V_L và các đột biến khác cho 7G6 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	H12, H20, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	H12, H20, H38, H69, H76, H78, H80, H81, H92, H93
hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L103
hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L37, L103
hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L36, L103
hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L36, L37, L103
hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L45, L103
hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L36, L37, L45, L103
hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L100, L103
hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	L12, L36, L37, L100, L103

Bảng 28

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nặng của các kháng thể 7G6 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)	7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)	hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)
H12	K	V	V	V
H20	V	L	L	L
H38	R	K	R	K
H69	M	I	I	I
H76	S	N	N	N
H78	V	A	A	A
H80	M	L	L	L
H81	E	Q	Q	Q
H92	C	S	S	S
H93	A	T	T	T

Bảng 29

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nhẹ của các kháng thể 7G6 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận có số truy cập # PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)	7G6 VL của chuột (SEQ ID NO:119)	hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)
L12	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L36	F	L	F	F	L	L	F	L	F	L
L37	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L	Q	L
L45	R	K	R	R	R	R	K	K	R	R
L100	Q	G	Q	Q	Q	Q	Q	Q	G	G
L103	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Bảng 30

Tỷ lệ phần trăm tính người của chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể 7G6 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	% Tính người
hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)	77,9%
hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)	76,8%
hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)	89,0%
hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)	88,0%
hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)	88,0%
hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)	87,0%
hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)	88,0%
hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)	86,0%
hu7G6-VL_v7 (SEQ ID NO:147)	89,0%
hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)	87,0%

Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc lớp Chothia, gốc vecnê, hoặc gốc ở mặt phân cách/gói khác nhau giữa các trình tự nhận của chuột và người là các ứng viên cho sự thế. Ví dụ về các gốc chính tắc lớp Chothia bao gồm gốc Kabat L2 trong Bảng 25 và 26. Ví dụ về các gốc vecnê bao gồm các gốc Kabat H66, H67, H69, và L49 trong Bảng 25 và 26. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/gói (VH+VL) bao gồm các gốc Kabat H35, H37, H39, H45, H47, H93, H95, H97, H103, L34, L36, L39, L44, L45, L46, L87, L89, L91, L96, và L98, trong Bảng 25 và 26.

Lý do để lựa chọn các vị trí này được chỉ ra trong Bảng 25 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm ứng viên cho sự thế là như sau.

P12S là đột biến dựa trên tần số vì P là hiếm trong khung người ở vị trí này.

F36L là đột biến ngược của gốc ở mặt phân cách.

Q37L: Dựa trên mô hình cấu trúc Leu có thể có khả năng cản trở W89 (VL) và VH CDR-H3 95Leu, do đó đột biến ngược được kiểm tra.

R45K là đột biến ngược của gốc ở mặt phân cách.

Q100G: Q có thể có khả năng cản trở W89 (VL), do đó, đột biến ngược Q100G

được kiểm tra.

R103K là đột biến dựa trên tần số vì R là hiếm trong khung người ở vị trí này.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

mAb7G6 VL của chuột (SEQ ID NO:120)

DVVMQTQTPLTLSVTIGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLLIYL
VSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKL
EIKR

Trình tự nhận VL người PDB 3U0T_VL (SEQ ID NO:138)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWFQQRPQGQSPRRLIYQI
SRLDPGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHYPVLFGQGTRLEI
KR

Trình tự dòng mầm của người IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:84)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPQGQSPRRLIYK
VSNRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPLTFGGGGTKV
EIK

hu7G6-VL_v1 (SEQ ID NO:141)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWFQQRPQGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKL
EIKR

hu7G6-VL_v2 (SEQ ID NO:142)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWFLQRPQGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKL
EIKR

hu7G6-VL_v3 (SEQ ID NO:143)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLDSDGKTYLNWLQRPQGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKL
EIKR

hu7G6-VL_v4 (SEQ ID NO:144)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNLWLLQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKL
EIKR

hu7G6-VL_v5 (SEQ ID NO:145)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNLWFQQRPGQSPKRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKL
EIKR

hu7G6-VL_v6 (SEQ ID NO:146)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNLWLLQRPGQSPKRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKL
EIKR

hu7G6-VL_v7: (SEQ ID NO:147)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNLWFQQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKL
EIKR

hu7G6-VL_v8 (SEQ ID NO:148)

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNLWLLQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKL
EIKR

Lý do để lựa chọn các vị trí này được chỉ ra trong Bảng 26 trong vùng biến đổi chuỗi nặng làm ứng viên cho sự thể là như sau.

K12V là đột biến ngược dựa trên tần số vì V được tìm thấy thường xuyên hơn so với K ở vị trí này.

V20L là đột biến ngược dựa trên tần số vì L được tìm thấy thường xuyên hơn so với V ở vị trí này.

R38K: mô hình cấu trúc dự đoán là Arg có thể cản trở Tyr91 và có thể có khả năng là gốc làm ổn định, nhưng cũng sẽ kiểm tra Lys như là đột biến ngược.

M69I là đột biến ngược dựa trên tần số vì I được tìm thấy thường xuyên hơn so với M ở vị trí này trong các khung người và ở gần với CDR-H2.

S76N là đột biến ngược dựa trên tần số vì N được tìm thấy thường xuyên hơn so với S ở vị trí này trong khung người.

V78A là đột biến ngược dựa trên tần số vì A được tìm thấy thường xuyên hơn so với V ở vị trí này trong khung người.

M80L là đột biến ngược dựa trên tần số vì L được tìm thấy thường xuyên hơn so với M ở vị trí này trong khung người.

E81Q là đột biến ngược dựa trên tần số vì Q được tìm thấy thường xuyên hơn so với E ở vị trí này trong khung người.

C92S: Trong trình tự chuột, Ser có mặt. Bình thường Cys ở vị trí này tạo thành liên kết disulfua nhưng liên kết đó bị gãy ở chuột có khả năng tạo ra tính linh động. Để bảo tồn tính linh động vòng CDR, bảo tồn Ser ở vị trí này bằng cách tạo ra đột biến ngược C92S.

A93T là đột biến ngược của gốc mặt phân cách.

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

mAb7G6 VH chuột (SEQ ID NO:119)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGETVYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDVAVYYSTSLDFWGQGTSVT
VSS

Trình tự nhận VH của người DB 3U0T_VH (SEQ ID NO:137)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYYTEAYYIHWVRQAPGQGLEWMGRID
PATGNTKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCASLYSLPVYW
GQGTTVTVSS

trình tự dòng mầm của người IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:149)

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGETVYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSEDVAVYYSTSLDFWGQGTSVT
VSS

hu7G6-VH_v1 (SEQ ID NO:139)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENGETVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDVAVYYSTSLDFWGQGTTV

TVSS

hu7G6-VH_v2 (SEQ ID NO:140)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQAPGQGLEWMGWIDP
ENGETVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDVAVYYSTSLDFWGQGTTV
TVSS

Ví dụ 10 Lập bản đồ epitop của 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 và 3D6

Các peptit được biotin hóa gồi lên nhau mở rộng chiều dài của đồng dạng tau 4R0N (383 axit amin) được gắn vào các giếng của đĩa ELISA được phủ streptavidin. Đĩa được rửa và phong bế, và các dạng của chuột của kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 và 3D6 được sử dụng. Sau khi rửa, kháng thể kháng chuột được liên hợp peroxidaza cây cải ngựa được phủ lên đĩa, sau đó xử lý bằng OPD (o-phenylendiamin dihydroclorua) để hiện màu. Đĩa được đọc ở độ hấp thụ 450 nm, với nền từ các giếng loại bỏ kháng thể sơ cấp được sử dụng làm phép trừ mẫu trắng. Đối với các kháng thể 5G8, 6A10, 8A4, 7G6 và 3D6, sự liên kết dương được phát hiện với các peptit kéo dài qua các axit amin 199-213 và 262-276 của SEQ ID NO:3. Các peptit này tương ứng với các axit amin 257-271 và 315-329 trong protein tau người 4R2N có độ dài đầy đủ.

Danh mục trình tự

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGI
GDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPG
QKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP
PTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLKSVTSKCGSLGNI
HHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENA
KAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSA
SLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGT

GSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPK
SGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAP
VPMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVP
GGGSVQIVYKPVDL SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIG
SLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLN
VSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-6 (tau người 4R0N) (SEQ ID NO:3)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGIGD
TPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK
GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPT
REPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGK
VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDL SKVTSKCGSLGNIH
HKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAK
QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGI
GDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPG
QKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP
PTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGG
KVQIVYKPVDL SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLD
NITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNVS
TGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGT
GSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPK
SGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAP
VPMPDLKNVSKSIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDL SKVTSKCGSLGNIHHK

GGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKT
DHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEEAGIGD
TPSLEDEAAGHVTTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK
GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT
REPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
VQIVYKPVLDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNI
THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHLNSVSSTG
SIDMVDSPQLATLADEVSAKQGL

SEQ ID NO:7; Trình tự axit amin 5G8 VH của chuột không có peptit tín hiệu

EVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYMHVVRQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYAPKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSSLTSEDVAVYYCSPLDFWGQGTTL
TVSS

SEQ ID NO:8; Trình tự axit amin VL 5G8 của chuột không có peptit tín hiệu

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLV
SKLDGVPDRFTGSGSGDFTLTKIRRVEAEDLGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEI
KR

SEQ ID NO:9: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin 5G8 VH của chuột có peptit tín hiệu

ATGAAATGCAGCTGGGTCATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTATAGGAATCAA
TTCAGAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGTCAGGGGCC
TCAGTCAGGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGGACTACTATAT
GCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATT
GATCCTGAGAATGGTGATACTGTATATGCCCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCA
CTATGACTTCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGCCTG
ACATCTGAAGACACTGCCGTCTATTACTGTAGCCCCCTTGACTTCTGGGGCCA
AGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:10: Trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin VL 5G8 của chuột có peptit tín hiệu:

ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTACTCTGGATTTCGGGAAAC
CAACGGTGATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTG
GACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGAT
GGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC
GCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACT
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCCGCAGAGTGGAGGCTG
AGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACTTTTTCCGTACACGTTT
GGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:11: HCDR-1 tổ hợp Kabat/Chothia 5G8 của chuột

GFNIKDYMH

SEQ ID NO:12: HCDR-2 Kabat 5G8 của chuột

WIDPENGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO:13: HCDR-3 Kabat 5G8 của chuột

LDF

SEQ ID NO:14: LCDR-1 Kabat 5G8 của chuột

KSSQSL LDSDGKTYLN

SEQ ID NO:15: LCDR-2 Kabat 5G8 của chuột

LVSKLDS

SEQ ID NO:16: LCDR-3 Kabat 5G8 của chuột

WQGTLPYT

SEQ ID NO:17 HCDR-1 Kabat 5G8 của chuột

DYYMH

SEQ ID NO:18 HCDR-1 Chothia 5G8 của chuột

GFNIKDY

SEQ ID NO:19 HCDR-1 Contact 5G8 của chuột

KDYYMH

SEQ ID NO:20 HCDR-2 Chothia 5G8 của chuột

DPENGD

SEQ ID NO:21 HCDR-2 AbM 5G8 của chuột

WIDPENGD TV

SEQ ID NO:22 HCDR-2 Contact 5G8 của chuột

WIGWIDPENGD TV

SEQ ID NO:23 HCDR-3 Contact 5G8 của chuột

SPLD

SEQ ID NO:24 LCDR-1 Contact 5G8 của chuột

KTYLNWL

SEQ ID NO:25 LCDR-2 Contact 5G8 của chuột

RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:26 LCDR-3 Contact 5G8 của chuột

WQGTLFPY

SEQ ID NO:27 >3F4-VH

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYIYWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGNSEYAPRFQGKATMTADTLSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCNADLHDYWGQG
TTLTVSS

SEQ ID NO:28 >aDabi-Fab2b-VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHVVRQAPGQGLEWMGET
NPRNGGTTYNEKFKGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTIGTSGYDY
FDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:29 >IGHV1-46

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGIIN
PSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR

SEQ ID NO:30 >3F4-VL

DVVM TQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLIWVFQRP GQSPKRLIFLVS
KRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPHTVGGG TKLEI

A

SEQ ID NO:31 >aDabi-Fab2b-VL

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSIVHSDGNIYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
YRFSGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:32 >IGKV2-29

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQLLIYEV
SSRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP

SEQ ID NO:33 > hu5G8-VH_v1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTVYAPKFQGKATMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTILDFWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO:34 > hu5G8-VH_v2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLEWIGWID
PENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:35 hu5G8-VH_v3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLEWIGWIDP
ENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:36 > hu5G8-VH_v4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLDWIGWID
PENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:37 > hu5G8-VH_v5

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCKASGFNIKDYMHVVRQAPGQGLDWIGWIDP
ENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDVAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:38 > hu5G8-VH_v6

EVQLVQSGAELVKPGASVRLSCAASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWIDP
ENGDTVYAPKFQGKATMTSDTSTNTAYLELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:39 > hu5G8-VH_v7

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLEWMGWI
DPENGDTVYAPKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARLDFWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO:40 > hu5G8-VH_v8

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFNIKDYMHWRQAPGQGLDWIGWID
PENGDTVYAPKFQGRVTMTSDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCSPLDFWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO:41 > hu5G8-VL_v1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLSDSGKTYLNWYLQKPGQSPKLLIYLV
SKLD SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGG
TKLEIK

SEQ ID NO:42 > hu5G8-VL_v2

DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLSDSGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLV
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGG
TKLEIK

SEQ ID NO:43 > hu5G8-VL_v3

DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLSDSGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLV
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGG
TKLEIK

SEQ ID NO:44 > hu5G8-VL_v4

DVVMQTQSPLSLSVTPGEPASISCKSSQSLLSDSGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLV
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTGFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGG
TKLEIK

SEQ ID NO:45 > hu5G8-VL_v5

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLWYLYQKPGQSPQLLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEI
K

SEQ ID NO:46 > hu5G8-VL_v6

DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLWLLQKPGQSPQRLLIYL
VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTLFPYTFGGGKLEI
EIK

SEQ ID NO:47 > Trình tự axit amin 5G8 VH của chuột có peptit tín hiệu

MKCSWVIFFLMAVVIGINSEVQLQQSGAELVRSGASVRLSCTASGFNIKDYMH
WVRQRPEQGLEWIGWIDPENGDVYAPKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSSTSE
DTAVYYCSPLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:48 > trình tự axit amin 5G8 VL của chuột có peptit tín hiệu

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK
TYLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLGV
YYCWQGTLFPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:49 >: trình tự axit amin m6A10VH:

MKCSWVIFFLMAVVIGINSEVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYIH
WVKQRPEQGLEWIGWIDPENDDTEYAPKFQGRATLTDDTSSNTAYLQLSSLTSE
DTAVYYCTPLDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:50 : trình tự axit amin m6A10VL:

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK
TYLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV
YYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:51 : trình tự axit amin m7G6VH:

MKCSWVIFFLMAVVTVGNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIH
WVKQRPEQGLEWIGWIDPENGETVYDPKFQGKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSED
TAVYYSTSLDFWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:52 trình tự axit amin m7G6VL:

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVMTQTPLTLSTIGQPASISCKSTQSLLDSDGK
 TYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV
 YYCWQGTGTHFPYTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:53 trình tự axit amin m8A4VH:

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIYH
 WVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSE
 GTAVYYCSTLDFWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:54 trình tự axit amin m8A4VL:

MMSPAQFLFLLVLWNRETNGDVVMTQTPLTLSTIGQPASISCKSSQSLLDSDGK
 TYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV
 YYCWQGTGTHFPCTFGGGKLEIKR

SEQ ID NO:55; Trình tự axit amin 3D6 VH của chuột:

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIYLHWVRQRPEQGLEWIGWIDPE
 NGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTTL
 TVSS

SEQ ID NO:56; HCDR1 Kabat/Chothia 3D6 của chuột:

GFNIKDYIYLH

SEQ ID NO:57; HCDR2 Kabat 3D6 của chuột:

WIDPENGDTVYDPKFQG

SEQ ID NO:58; HCDR3 Kabat 3D6 của chuột:

LDF

SEQ ID NO:59; trình tự axit amin 3D6 VL của chuột:

DVVMTQTPLTLSTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLV
 SKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTGTHFPYTFGGGKLEI
 KR

SEQ ID NO:60; LCDR1 Kabat 3D6 của chuột:

KSSQSLLDSDGKTYLN

SEQ ID NO:61 ; LCDR2 Kabat 3D6 của chuột:

LVSKLDS

SEQ ID NO:62 ; LCDR3 Kabat 3D6 của chuột:

WQGTHFPYT

SEQ ID NO:63 vùng trưởng thành của trình tự axit amin m6A10VH:

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NDDTEYAPKFQGRATLT TDTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTPLDYWGQGTSV
TVSS

SEQ ID NO:64 : vùng trưởng thành của trình tự axit amin m6A10VL:

DVVM TQTPLT LSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRP GQSPKRLIYLV
SKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYYCWQGTHFPYTFGGG GTKLEI
K

SEQ ID NO:65 CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia 6A10 của chuột:

GLNIKDYYIH

SEQ ID NO:66 CDR-H2 Kabat 6A10 của chuột:

WIDPENDDTEYAPKFQG

SEQ ID NO:67 CDR-H3 Kabat 6A10 của chuột:

LDY

SEQ ID NO:68 CDR-L1 Kabat 6A10 của chuột:

KSSQSLLDSDGKTYLN

SEQ ID NO:69 CDR-L2 Kabat 6A10 của chuột:

LVSKLDS

SEQ ID NO:70 CDR-L3 Kabat 6A10 của chuột:

WQGTHFPYT

SEQ ID NO:71 CDR-H1 Kabat 6A10 của chuột:

DYYIH

SEQ ID NO:72 CDR-H1 Chothia 6A10 của chuột:

GLNIKDY

SEQ ID NO:73 CDR-H1 Contact 6A10 của chuột:

KDYIIH

SEQ ID NO:74 CDR-H2 Chothia 6A10 của chuột:

DPENDD

SEQ ID NO:75 CDR-H2 AbM 6A10 của chuột:

WIDPENDDTE

SEQ ID NO:76 CDR-H2 Contact 6A10 của chuột:

WIGWIDPENDDTE

SEQ ID NO:77 CDR-H3 Contact 6A10 của chuột:

TPLD

SEQ ID NO:78 CDR-L1 Contact 6A10 của chuột:

KTYLNWL

SEQ ID NO:79 CDR-L2 Contact 6A10 của chuột:

RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:80 CDR-L3 Contact 6A10 của chuột:

WQGTHFPY

SEQ ID NO:81 Trình tự nhận VH 6A10 số truy cập # ACR16112:

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
NPNSGDTNYAQKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLAARPLD
YWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:82 trình tự dòng mầm của người IGHV1-2*02:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSRRGY
DFWSGSPEDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:83 Trình tự nhận 6A10 VL số truy cập # ABC66863:

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKV
SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHRPLTFGGGKVEI
K

SEQ ID NO:84 trình tự dòng mầm của người IGKV2-30*02:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYK
VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPLTFGGGKVEI
EIK

SEQ ID NO:85 hu6A10-VH_v1:

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENDDTEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO:86 hu6A10-VH_v2:

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDP
ENDDTEYAPKFQGRVTTTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO:87 hu6A10-VH_v3:

QVQLQESGAEVKKPGGSVKVSCASGLNIKDYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDP
ENDDTEYAPKFQGRVTITRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVYYCARLDYWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO:88 hu6A10-VL_v1:

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGKVEI
K

SEQ ID NO:89 hu6A10-VL_v2:

DIVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRLLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGKVEI
K

SEQ ID NO:90 hu6A10-VL_v3:

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNW FQQRPGQSPRLLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKVEI
K

SEQ ID NO:91 vùng trưởng thành của 8A4VH của chuột:

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPQFQDKANITADTSSNTAYLQLSSLTSEGTAVYYCSTLDFWGQGTTL
TVSS

SEQ ID NO:92 vùng trưởng thành của 8A4VL của chuột:

DVVMQTQPTLTLSTIGQPASISCKSSQSLLDS DGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLV
SKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPCTFGGG TKLEI
K

SEQ ID NO:93 CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia 8A4 của chuột:

GFNIKDYIHW

SEQ ID NO:94 CDR-H2 Kabat 8A4 của chuột:

WIDPENGDTVYDPQFQD

SEQ ID NO:95 CDR-H3 Kabat 8A4 của chuột:

LDF

SEQ ID NO:96 CDR-L1 Kabat 8A4 của chuột:

KSSQSLLDS DGKTYLN

SEQ ID NO:97 CDR-L2 Kabat 8A4 của chuột:

LVSKLDS

SEQ ID NO:98 CDR-L3 Kabat 8A4 của chuột:

WQGTHFPCT

SEQ ID NO:99 CDR-H1 Kabat 8A4 của chuột:

DYYIHW

SEQ ID NO:100 CDR-H1 Chothia 8A4 của chuột:

GFNIKDY

SEQ ID NO:101 CDR-H1 Contact 8A4 của chuột:

KDYIYIH

SEQ ID NO:102 CDR-H2 Chothia 8A4 của chuột:

DPENGD

SEQ ID NO:103 CDR-H2 AbM 8A4 của chuột:

WIDPENGDTV

SEQ ID NO:104 CDR-H2 Contact 8A4 của chuột:

WIGWIDPENGDTV

SEQ ID NO:105 CDR-H3 Contact 8A4 của chuột:

STLD

SEQ ID NO:106 CDR-L1 Contact 8A4 của chuột:

KTYLNWL

SEQ ID NO:107 CDR-L2 Contact 8A4 của chuột:

RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:108 CDR-L3 Contact 8A4 của chuột:

WQGTHFPC

SEQ ID NO:109 3JAU VH:

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGKIDPA
NGNTKYDPKFQDKATITADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCANSNYWFDY
WGQGTTLVSS

SEQ ID NO:110 ADU57742:

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSNPVSWVRQAPGQGLEWMGGIIPF
AQKVLGAQRVRDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCATGQQLYSLHY
WGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO:111 3JAU VL:

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDVGVYYCYQGSHVPYTFGGGTKL
EIK

SEQ ID NO:112 ABA26100:

DVMTSSSVTGASSCRSSSVYSDGSTWNWRGSRRYDVSTRDSGVDRSGSGSGTDT
KSRVADVGVYYCMTDWTGGTKK

SEQ ID NO:113 hu8A4-VH_v1:

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENGDTVYDPQFQDRINITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO:114 hu8A4-VH_v2:

QVQLQQSGAEVVKPGGSVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP
ENGDTVYDPQFQDRITITADTSTSTAYMELSGLRSDDTAVYYCSTLDFWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO:115 hu8A4-VH_v3:

QVQLQQSGAEVVKPGGSVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWIGWIDPE
NGDTVYDPQFQDRATITADTSTSTAYMELSGLRSEDVAVYYCATLDFWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO:116 hu8A4-VL_v1:

DIVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQG
TKLEIK

SEQ ID NO:117 hu8A4-VL_v2:

DIVMTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQG
TKLEIK

SEQ ID NO:118 hu8A4-VL_v3:

DVVMQTQSPLSLSVTLGEPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLV

VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPCTFGQGTKL
EIK

SEQ ID NO:119 VH mAb7G6 của chuột:

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGETVYDPKFKQKASITSDTSSNTAYLQRLSLTSEDTAVYYSTSLDFWGQGTSVT
VSS

SEQ ID NO:120 VL mAb7G6 của chuột:

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNLWLLQRPGQSPKRLIYL
VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKL
EIKR

SEQ ID NO:121 CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia 7G6 của chuột:

GFNIKDYIIH

SEQ ID NO:122 CDR-H2 Kabat 7G6 của chuột:

WIDPENGETVYDPKFKQ

SEQ ID NO:123 CDR-H3 Kabat 7G6 của chuột:

LDF

SEQ ID NO:124 CDR-L1 Kabat 7G6 của chuột:

KSTQSLLDSDGKTYLN

SEQ ID NO:125 CDR-L2 Kabat 7G6 của chuột:

LVSKLDS

SEQ ID NO:126 CDR-L3 Kabat 7G6 của chuột:

WQGTHFPYT

SEQ ID NO:127 CDR-H1 Kabat 7G6 của chuột:

DYYIH

SEQ ID NO:128 CDR-H1 Chothia 7G6 của chuột:

GFNIKDY

SEQ ID NO:129 CDR-H1 Contact 7G6 của chuột:

KDYYIH

SEQ ID NO:130 CDR-H2 Chothia 7G6 của chuột:

DPENGE

SEQ ID NO:131 CDR-H2 AbM 7G6 của chuột:

WIDPENGETV

SEQ ID NO:132 CDR-H2 Contact 7G6 của chuột:

WIGWIDPENGETV

SEQ ID NO:133 CDR-H3 Contact 7G6 của chuột:

TSLD

SEQ ID NO:134 CDR-L1 Contact 7G6 của chuột:

KTYLNWL

SEQ ID NO:135 CDR-L2 Contact 7G6 của chuột:

RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:136 CDR-L3 Contact 7G6 của chuột:

WQGTHFPY

SEQ ID NO:137 Trình tự nhận VH của người DB 3U0T_VH:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYYTEAYYIHWVRQAPGQGLEWMGRID
PATGNTKYAPRLQDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCASLYSLPVYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:138 Trình tự nhận VL của người PDB 3U0T_VL:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLYSDAKTYLNWVFQQRPGQSPRRLIYQI
SRLDPGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHYPVLFGQGTRLEI
KR

SEQ ID NO:139 hu7G6-VH_v1:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVRQAPGQGLEWMGWIDP

ENGETVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTTV
TVSS

SEQ ID NO:140 hu7G6-VH_v2:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQAPGQGLEWMGWIDP
ENGETVYDPKFQGRVTITRDTSTNTAYLQLSSLRSEDТАVYYSTSLDFWGQGTTV
TVSS

SEQ ID NO:141 hu7G6-VL_v1:

DVVMТQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGТKL
EIKR

SEQ ID NO:142 hu7G6-VL_v2:

DVVMТQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFLQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGТKL
EIKR

SEQ ID NO:143 hu7G6-VL_v3:

DVVMТQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGТKL
EIKR

SEQ ID NO:144 hu7G6-VL_v4:

DVVMТQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGТKL
EIKR

SEQ ID NO:145 hu7G6-VL_v5:

DVVMТQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPKRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGТKL
EIKR

SEQ ID NO:146 hu7G6-VL_v6:

DVVMТQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYL

VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKL
EIKR

SEQ ID NO:147 hu7G6-VL_v7:

DVVM TQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDS DGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKL
EIKR

SEQ ID NO:148 hu7G6-VL_v8:

DVVM TQSPLSLSVTLGQPASISCKSTQSLLDS DGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYL
VSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKL
EIKR

SEQ ID NO:149 trình tự dòng mầm của người IGHV1-69-2*01

EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIHWVKQRPEQGLEWIGWIDPE
NGETVYDPKFQ GKASITSDTSSNTAYLQLRSLTSED TAVYYSTSLDFWGQGTSVT
VSS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết với tau người, bao gồm:

ba chuỗi nặng CDR có trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 và ba chuỗi nhẹ CDR có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8; hoặc

ba chuỗi nặng CDR có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55 và ba chuỗi nhẹ CDR có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59.

2. Kháng thể theo điểm 1, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm ba CDR chuỗi nặng được xác định theo Kabat là SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:12, và SEQ ID NO:13, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ được xác định theo Kabat là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14 đến SEQ ID NO: 16.

3. Kháng thể theo điểm 2, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người.

4. Kháng thể theo điểm 3, trong đó các vị trí H1, H11, H12, H19, H20, H23, H46, H48, H71, H76, H80, H93, và H94 trong vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người lần lượt bị chiếm bởi E, L, V, R, L, A, D, I, S, N, L, S, và P; và/hoặc trong đó các vị trí L2, L7, L17, L36, L46, L70 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người lần lượt bị chiếm bởi V, S, E, L, R, và D.

5. Kháng thể theo điểm 3, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33 đến SEQ ID NO: 40 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41 đến SEQ ID NO: 46.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 là kháng thể nguyên vẹn.

7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 là một đoạn gắn kết.

8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng.

9. Kháng thể theo điểm 8, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng thuộc isotyp IgG1.
10. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này thuộc isotyp IgG2 hoặc IgG4 của người.
11. Dược phẩm chứa kháng thể như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 và chất mang dược dụng.
12. Axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, hoặc vector biểu hiện tái tổ hợp bao gồm axit nucleic, hoặc tế bào chủ được biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp.
13. Phương pháp in vitro để làm cho kháng thể chuột tương thích với người, phương pháp này bao gồm các bước:
- (a) chọn một hoặc nhiều kháng thể nhận;
 - (b) xác định các gốc axit amin của kháng thể chuột cần được giữ lại;
 - (c) tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nặng kháng thể chuột và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nhẹ kháng thể chuột; và
 - (d) biểu hiện các axit nucleic này trong tế bào chủ để sản sinh ra kháng thể được làm tương thích với người;
- trong đó kháng thể chuột này khác biệt ở chỗ:
- vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:8; hoặc
- vùng biến đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 59.

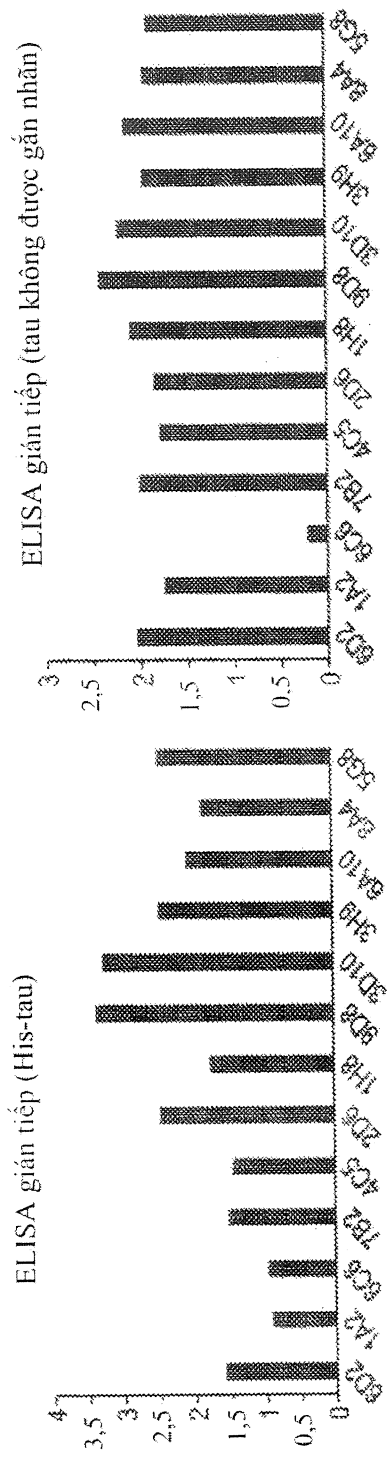


FIG. 1A

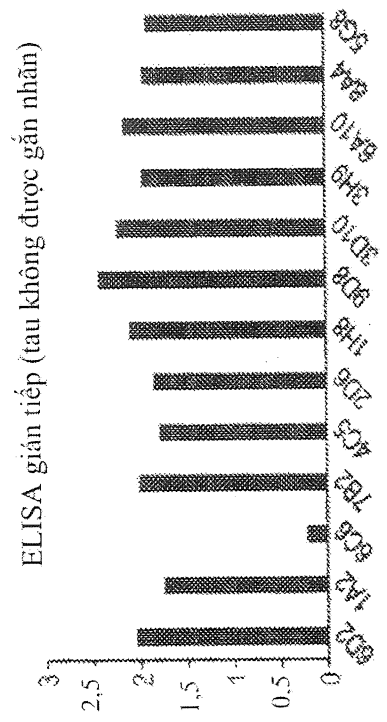


FIG. 1B

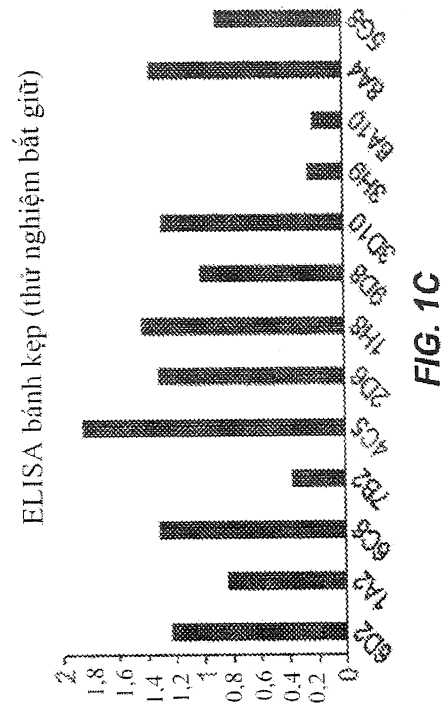
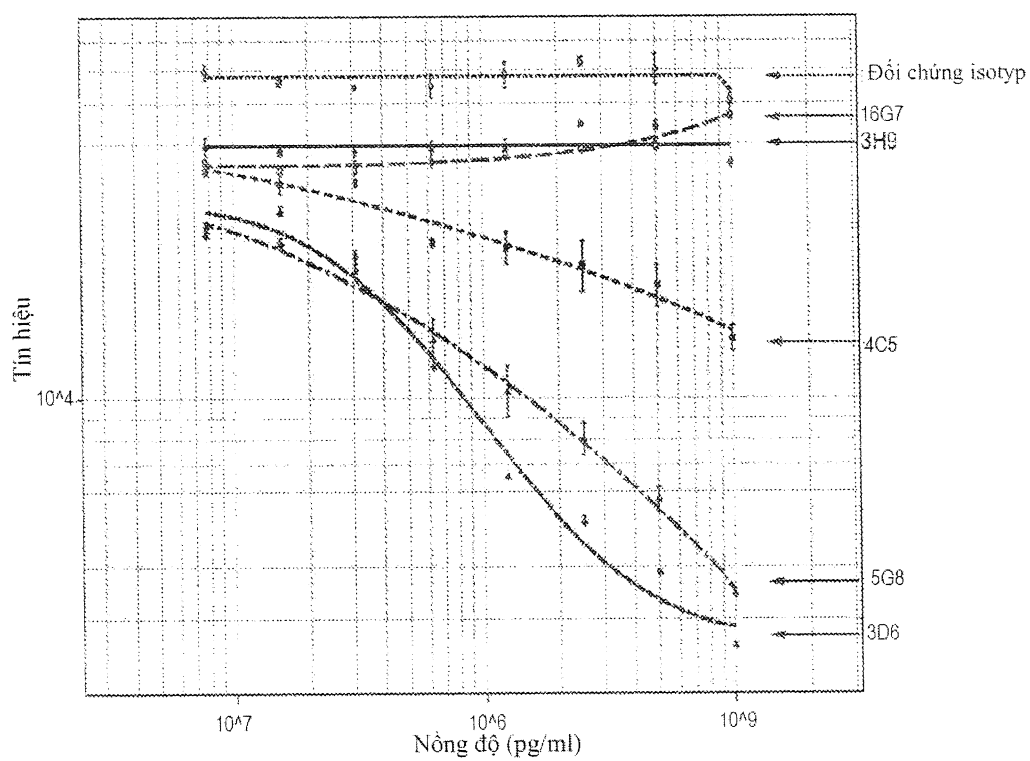
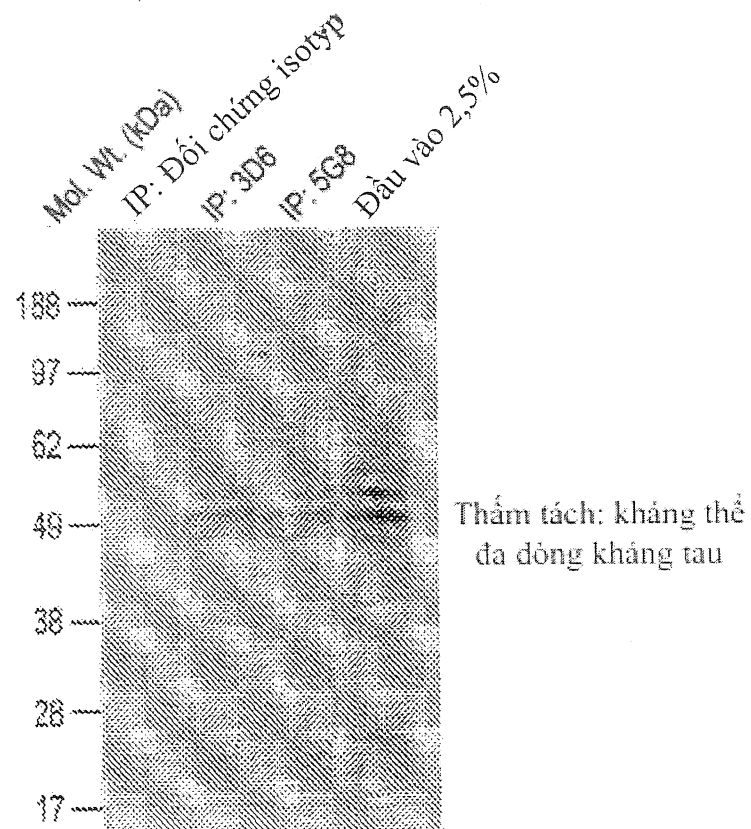


FIG. 1C

Tên	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$k_D (nM)$
3D6	$2,58 \times 10^5$	$1,19 \times 10^{-3}$	0,46
1H8	$5,07 \times 10^5$	$5,61 \times 10^{-3}$	11,1
3H9	$4,71 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-3}$	3,0
5G8	$3,75 \times 10^5$	$2,54 \times 10^{-3}$	6,78
6D2	$3,83 \times 10^5$	$3,18 \times 10^{-3}$	8,29
7G6	$5,76 \times 10^5$	$3,32 \times 10^{-3}$	5,77
8A4	$5,99 \times 10^5$	$2,27 \times 10^{-3}$	3,8

FIG. 2**FIG. 3**

**FIG. 4**

5G8-VH	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	R	S	G	A	S	V	R	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	R	40
aDabi-Fab2b-VH	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v1	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v2	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v3	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v4	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v5	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v6	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	A	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v7	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40
hu5G8-VH_v8	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	40

5G8-VH	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	S	D	T	S	S	N	T	A	Y	80	
aDabi-Fab2b-VH	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	E	T	N	P	P	R	N	G	G	T	T	Y	N	E	K	F	K	G	K	A	T	M	T	R	D	T	S	T	S	T	A	Y	80
hu5G8-VH_v1	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	R	D	T	S	T	S	T	A	Y	80	
hu5G8-VH_v2	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	S	D	T	S	T	S	T	A	Y	80	
hu5G8-VH_v3	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	S	D	T	S	T	S	T	A	Y	80	
hu5G8-VH_v4	P	G	Q	G	L	D	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	S	D	T	S	T	S	T	A	Y	80	
hu5G8-VH_v5	P	G	Q	G	L	D	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	S	D	T	S	T	N	T	A	Y	80	
hu5G8-VH_v6	P	G	Q	G	L	D	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	K	A	T	M	T	S	D	T	S	T	N	T	A	Y	80	
hu5G8-VH_v7	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	T	S	T	V	Y	80	
hu5G8-VH_v8	P	G	Q	G	L	D	W	I	G	W	I	D	P	E	N	G	D	T	V	Y	A	P	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	S	D	T	S	T	S	T	V	Y	80	

FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 6A

5G8-VL	112	(SEQ ID NO: 8)
aDabi-Fab2b-VL	112	(SEQ ID NO: 31)
hu5G8-VL_v1	112	(SEQ ID NO: 41)
hu5G8-VL_v2	112	(SEQ ID NO: 42)
hu5G8-VL_v3	112	(SEQ ID NO: 43)
hu5G8-VL_v4	112	(SEQ ID NO: 44)
hu5G8-VL_v5	112	(SEQ ID NO: 45)
hu5G8-VL_v6	112	(SEQ ID NO: 46)

R	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	L	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	F	Q	A	S	H	V	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	L	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	L	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	L	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	L	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	L	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K
S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	Y	C	W	Q	G	T	L	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K

FIG. 6B

FIG. 7

protein6A10VL	10	20	30	40	
ABC66863VL					40
hu6A10VL_v1					40
hu6A10VL_v2					40
hu6A10VL_v3					40
protein6A10VL	50	60	70	80	
ABC66863VL					80
hu6A10VL_v1					80
hu6A10VL_v2					80
hu6A10VL_v3					80
protein6A10VL	90	100	110		
ABC66863VL					112 (SEQ ID NO: 64)
hu6A10VL_v1					112 (SEQ ID NO: 83)
hu6A10VL_v2					112 (SEQ ID NO: 88)
hu6A10VL_v3					112 (SEQ ID NO: 89)

FIG. 8

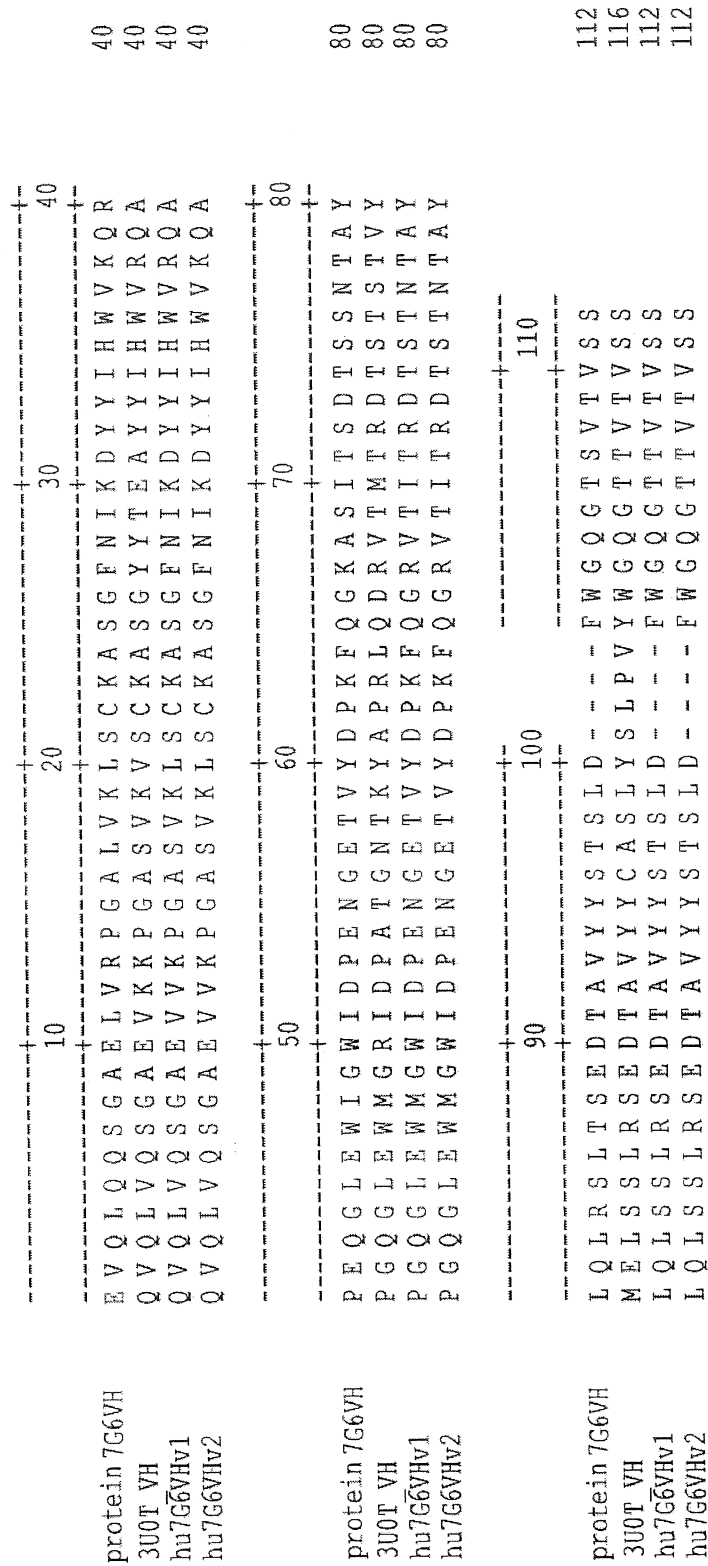
8A4-VH	10	20	30	40	
ADU57742	EVQLQQSGAELVRRPGLVKLSCKASGGFNISKDYIHHWVKQR				40
8A4VH_v1	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSNPFVSWVRQA				40
8A4VH_v2	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGFNISKDYIHHWVRQA				40
8A4VH_v3	QVQLQQSGAEVVKPPGGSSVKLSCKASGGFNISKDYIHHWVRQA				40

8A4-VH	50	60	70	80	
ADU57742	PEQGGLLEWIGWIDPPENGDTVYDPPQFQDKANITADTSSSNTAY				80
8A4VH_v1	PGQGGLLEWMMGGIIPFAQKVLGAQQRVRRDRINITADTSTTAY				80
8A4VH_v2	PGQGGLLEWMMGGIIPENGDTVYDPPQFQDKRINTADTSTTAY				80
8A4VH_v3	PGQGGLLEWIGWIDPPENGDTVYDPPQFQDKRINTADTSTTAY				80

8A4-VH	90	100	110		
ADU57742	LQLSSLTSEGTAVYYCST--LDFFWGQGTTLTVSS			112	(SEQ ID NO: 91)
8A4VH_v1	ME LSGLRSSDDTAVYYCATGQQQLYSLHYWGQGTTLTVSS			118	(SEQ ID NO: 110)
8A4VH_v2	ME LSGLRSSDDTAVYYCST--LDFFWGQGTTLTVSS			112	(SEQ ID NO: 113)
8A4VH_v3	ME LSGLRSEDDTAVYYCAT--LDFFWGQGTTLTVSS			112	(SEQ ID NO: 114)
	ME LSGLRSSDDTAVYYCAT--LDFFWGQGTTLTVSS			112	(SEQ ID NO: 115)

FIG. 9

FIG. 10



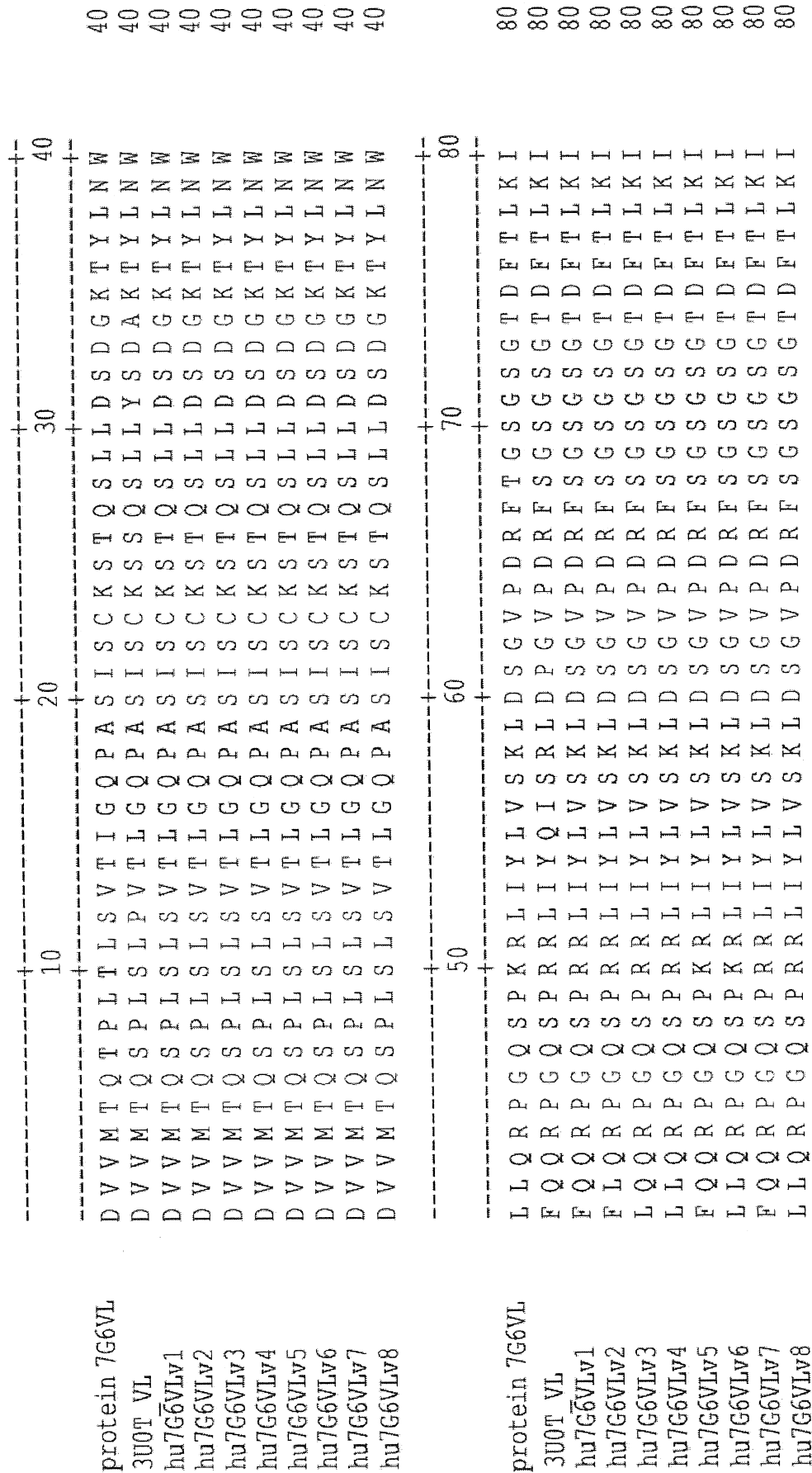


FIG. 12B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Prothena Biosciences Ltd.

Barbour, Robin

Alexander, Svetlana

Renz, Mark

Gai, Shuning

Nijjar, Tarlochan

Dolan, Philip

Payne, Philip W.

<120> Kháng thể gắn kết với Tau người, được phẩm chứa kháng thể này và phương pháp in vitro để làm cho kháng thể chuột tương thích với người

<130> 057450-508111

<150> US 62/500,427

<151> 02-05-2017

<150> US 62/580,408

<151> 01-11-2017

<160> 149

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20 25 30

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

35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val

65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu

85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 2

<211> 412

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
 85 90 95
 Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
 100 105 110
 Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 115 120 125
 Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140
 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 180 185 190
 Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 210 215 220
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 245 250 255
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys

```

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

```

<210> 3

<211> 383

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

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

```

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175
 Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190
 Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
 195 200 205
 Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
 210 215 220
 Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
 225 230 235 240
 His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
 245 250 255
 Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
 260 265 270
 Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
 275 280 285
 Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
 290 295 300
 Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 305 310 315 320
 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 325 330 335
 Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
 340 345 350
 Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
 355 360 365
 Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380
 <210> 4
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu

35	40	45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser		
50	55	60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val		
65	70	75
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu		
85	90	95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro		
100	105	110
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val		
115	120	125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly		
130	135	140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro		
145	150	155
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro		
165	170	175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly		
180	185	190
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser		
195	200	205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys		
210	215	220
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys		
225	230	235
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val		
245	250	255
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly		
260	265	270
Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr		
275	280	285
Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly		
290	295	300
Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln		
305	310	315
Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly		
325	330	335
Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys		
340	345	350
Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val		

```

          355              360              365
Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
      370              375              380
Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
385              390              395              400
Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
          405              410

<210>  5
<211> 381
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400>  5

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

```

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
 245 250 255
 Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
 275 280 285
 Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
 290 295 300
 Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
 305 310 315 320
 Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
 325 330 335
 Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
 340 345 350
 Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
 355 360 365
 Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380
 <210> 6
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60
 Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95
 Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110
 Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly


```

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

```

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 7

```

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

```

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

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 8

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

Arg

<210> 9

<211> 393

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 9

atgaaatgca gctgggtcat cttcttcctg atggcagtggt ttataggaat caattcagag 60
gttcagctgc agcagtctgg ggcagagctt gtgaggtcag gggcctcagt caggttgtcc 120
tgcacagctt ctggcttcaa cattaaggac tactatatgc actgggtgag gcagaggcct 180
gaacagggcc tggagtggat tggatggatt gatcctgaga atggtgatac tgtatatgcc 240
ccgaagttcc agggcaaggc cactatgact tcagacacat cctccaacac agcctacctg 300
cacctcagca gcctgacatc tgaagacact gccgtctatt actgtagccc ccttgacttc 360
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 393

<210> 10

<211> 399

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 10

atgatgagtc ctgccaggt cctgtttctg ttagtactct ggattcggga aaccaacggt 60
gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcctcc 120
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 180
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctgggtgtc taaactggac 240
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 300
cgcagagtgg aggtgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac actttttccg 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 399

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 11

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His

1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 12

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

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 15

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 16

Trp Gln Gly Thr Leu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 17

Asp Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 18

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 19

Lys Asp Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 20

Asp Pro Glu Asn Gly Asp

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 21

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val

1 5 10

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 22

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val

1

5

10

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 23

Ser Pro Leu Asp

1

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 24

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu

1

5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 25

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

1

5

10

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 26

Trp Gln Gly Thr Leu Phe Pro Tyr

1 5
 <210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27
 Lys Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Ser Glu Tyr Ala Pro Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Leu Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Asn Ala Asp Leu His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 28
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 29
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

 <210> 30
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 30
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ile Trp Val Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Phe Leu Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro His Thr Val Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ala


```

                100                105                110
<210>  31
<211>  112
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<400>  31
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1              5              10              15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
                20              25              30
Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
                35              40              45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
                50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Lys Ile
65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
                85              90              95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                100             105             110
<210>  32
<211>  100
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens
<400>  32
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1              5              10              15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
                20              25              30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
                35              40              45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
                50              55              60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65              70              75              80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
                85              90              95
Ile His Leu Pro
                100
<210>  33

```

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110
 <210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 <210> 36
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85		90		95										
Ser	Pro	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			100					105					110		
<210> 37															
<211> 112															
<212> PRT															
<213> Nhân tạo															
<220>															
<223> Được tổng hợp															
<400> 37															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Arg	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ser	Pro	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			100						105				110		
<210> 38															
<211> 112															
<212> PRT															
<213> Nhân tạo															
<220>															
<223> Được tổng hợp															
<400> 38															
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Met	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr

65		70		75		80									
Leu	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ser	Pro	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			100					105					110		

<210> 39

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 39

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

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 40

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Ala	Pro	Lys	Phe

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

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

<210> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 43

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

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 45

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

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 46

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

<210>	47
<211>	131
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo
<220>	
<223>	Được tổng hợp
<400>	47

$\langle 210 \rangle$	48
$\langle 211 \rangle$	132

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 48

```

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

```

<210> 49

<211> 131

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 49

```

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

```

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser
 130

<210> 50

<211> 133

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 50

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

<210> 51

<211> 131

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 51

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

<210> 52

<211> 133

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 52

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

115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg
 130
 <210> 53
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 53
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp
 65 70 75 80
 Pro Gln Phe Gln Asp Lys Ala Asn Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Gly Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser
 130
 <210> 54
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 54
 Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Asn Arg
 1 5 10 15
 Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
 20 25 30
 Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser

35 40 45
 Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Ile Lys Arg
 130
 <210> 55
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 55
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 56

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 57

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 57

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 58

<400> 58

000

<210> 59

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 60

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1

5

10

15

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 61

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1

5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 62

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1

5

<210> 63

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 63

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala

1

5

10

15

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

20

25

30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 64

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 65

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 66

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 67

<400> 67

000

<210> 68

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 68

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 69

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 70

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 71

<211> 5
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 71
Asp Tyr Tyr Ile His
1 5
<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 72
Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr
1 5
<210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 73
Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5
<210> 74
<211> 6
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 74
Asp Pro Glu Asn Asp Asp
1 5
<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 75

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 76

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 77

<211> 4

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 77

Thr Pro Leu Asp

1

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 78

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu

1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 79

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

1 5 10

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 80

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr

1

5

<210> 81

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Leu Ala Ala Arg Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 82

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Ser Pro Glu
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 83
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Arg Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 84
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

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

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 85

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

<210> 86

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 86

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr

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

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 87

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

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 88

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

<210>	89
<211>	112
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo
<220>	
<223>	Được tổng hợp
<400>	89

<210>	90
<211>	112
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo
<220>	
<223>	Được tổng hợp

<400> 90

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

<210> 91

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 91

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

<210> 92

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 92

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Phe Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 93

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 94

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Gln Phe Gln

1 5 10 15

Asp

<210> 95

<400> 95

000

<210> 96

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 96

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1

5

10

15

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 97

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1

5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 98

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Cys Thr

1

5

<210> 99

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 99

Asp Tyr Tyr Ile His

1

5

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 100

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

1 5

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 101

Lys Asp Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 102

Asp Pro Glu Asn Gly Asp

1 5

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 103

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val

1 5 10

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 104

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val

1 5 10
<210> 105
<211> 4
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 105
Ser Thr Leu Asp
1
<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 106
Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu
1 5
<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 107
Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
1 5 10
<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 108
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Cys
1 5
<210> 109
<211> 118
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 109

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

<210> 110

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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

<210> 111

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

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

<210> 112

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Asp Val Met Thr Ser Ser Ser Val Thr Gly Ala Ser Ser Cys Arg Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Trp Asn Trp Arg Gly Ser Arg
 20 25 30
 Arg Tyr Asp Val Ser Thr Arg Asp Ser Gly Val Asp Arg Ser Gly Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gly Thr Asp Thr Lys Ser Arg Val Ala Asp Val Gly Val Tyr
 50 55 60
 Tyr Cys Met Asp Trp His Thr Gly Gly Thr Lys Lys
 65 70 75

<210> 113

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 113

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

<210> 114

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 114

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

<210> 115

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 115

```

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

```

<210> 116

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 116

```

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

```

<210> 117

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 117

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 118

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 118

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 119

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 119

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

1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Ser

85 90 95

Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 120

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 120

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

	100	105	110
Arg			
<210>	121		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	Nhân tạo		
<220>			
<223>	Được tổng hợp		
<400>	121		
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His			
1	5	10	
<210>	122		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	Nhân tạo		
<220>			
<223>	Được tổng hợp		
<400>	122		
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe Gln			
1	5	10	15
Gly			
<210>	123		
<400>	123		
000			
<210>	124		
<211>	16		
<212>	PRT		
<213>	Nhân tạo		
<220>			
<223>	Được tổng hợp		
<400>	124		
Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn			
1	5	10	15
<210>	125		
<211>	7		
<212>	PRT		
<213>	Nhân tạo		
<220>			

<223> Được tổng hợp

<400> 125

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 126

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 127

<211> 5

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 127

Asp Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 128

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

1 5

<210> 129

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 129

Lys Asp Tyr Tyr Ile His

1 5

<210> 130

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 130

Asp Pro Glu Asn Gly Glu

1 5

<210> 131

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 131

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val

1 5 10

<210> 132

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 132

Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Val

1 5 10

<210> 133

<211> 4

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 133

Thr Ser Leu Asp

1

<210> 134

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 134

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu

1

5

<210> 135

<211> 10

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 135

Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

1

5

10

<210> 136

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 136

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr

1

5

<210> 137

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Tyr Thr Glu Ala Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Leu

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

290

Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Pro Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 138

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asp Ala Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Gln Ile Ser Arg Leu Asp Pro Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Thr His Tyr Pro Val Leu Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 139

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 139

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 140

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 140

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 141

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 141

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

<210> 142

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 142

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

<210> 143

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 143

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

<210> 144

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 144

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

<210> 145

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 145

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 146

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 146

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 147

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 147

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

Arg

<210> 148

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 148

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

```

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

```

<210> 149

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

```

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

```