



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

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

(11)



1-0044641

(51)^{2020.01} C07K 16/18; C12P 21/08; C12N 5/10; (13) B
A61K 39/395; C12N 15/13

-
- (21) 1-2021-00541 (22) 16/07/2019
(86) PCT/CN2019/096159 16/07/2019 (87) WO2020/015637 23/01/2020
(30) CN20181078219 6.2 17/07/2018 CN
(45) 25/04/2025 445 (43) 26/04/2021 397A
(71) 1. JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)
No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone,
Lianyungang, Jiangsu 222047, China
2. SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD (CN)
No. 279 Wenjing Road, Minhang District, Shanghai, 200245, China
(72) YING, Hua (US); ZHANG, Ling (CN); SHI, Jinping (CN); ZHANG, Xiaomin (CN);
SUN, Jiakang (CN); HU, Qiyue (US); TAO, Weikang (US).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)
-

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG ABETA HOẶC MẢNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN
CỦA NÓ, ĐƯỢC PHÂN CHỨA NÓ VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ KHÁNG
THỂ NÀY

(21) 1-2021-00541

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Abeta, vectơ tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic, tế bào chủ, dược phẩm và phương pháp điều chế kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng β -amyloid và việc ứng dụng nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các mô tả ở đây chỉ cung cấp thông tin cơ bản về sáng chế, và không nhất thiết nêu ra kỹ thuật trước đây.

β -amyloid (Amyloid-beta, amyloid-beta, Abeta, $A\beta$) là polypeptit chứa 39-43 axit amin được tạo ra từ protein tiền chất amyloid (amyloid precursor protein-APP) bởi thủy phân protein β - và γ -secretaza. Nó có thể được sản sinh bởi nhiều tế bào và tuần hoàn trong máu, dịch não tủy và dịch khe não. Hầu hết β -amyloid liên kết với chaperon, và một số ít tồn tại ở dạng tự do. $A\beta$ là chất độc thần kinh. Nó không thể được chuyển hóa bởi tế bào khi hàm lượng của nó gia tăng. Thay vì đó, nó sẽ bị tích lũy với khối lượng lớn trong tế bào tạo thành các mảng lão suy $A\beta$, và hậu quả là thúc đẩy làm hư hại hoặc làm chết tế bào thần kinh. Hầu hết các kiểu phụ thông thường của $A\beta$ trong cơ thể người là $A\beta$ 1-40 và $A\beta$ 1-42, trong số đó $A\beta$ 1-42 là độc hơn và dễ bị tích tụ để tạo thành lõi của mảng $A\beta$ và kích hoạt tác động gây độc tế bào thần kinh ("Medical Review", 2009, 15 (23): 3575-3577).

Bệnh Alzheimer (Alzheimer disease-AD) được phát hiện đầu tiên năm 1906 bởi bác sỹ tâm thần và thần kinh học Đức, Alzheimer Alois, và được đặt tên sau tên ông. Nó cũng được biết là chứng sa sút trí tuệ lão suy, và là bệnh thoái hóa thần kinh mạn tính. Các biểu hiện lâm sàng chính của AD bao gồm mất trí nhớ dần dần, rối loạn nhận thức, hành vi bất thường, và rối loạn xã hội. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các bệnh nhân AD chủ yếu có các đặc điểm bệnh học sau: các mảng lão suy được tạo thành do sự kết tụ β -amyloid trong vỏ não và hải mã, các đám rối tơ thần kinh được tạo thành bởi sự kết tụ bất thường protein Tau, và tế bào thần kinh giảm trong vỏ não và hải mã. Sự tích tụ $A\beta$ không chỉ liên quan đến sự thay đổi thoái hóa noron, mà còn có khả năng hoạt hóa hàng loạt các hoạt động thần kinh, bao gồm hoạt hóa tế bào hình sao và các tế bào tiểu thần kinh đệm, phá hủy hàng rào máu-não và thay đổi vi tuần hoàn, và hoạt động tương tự. Nó là nguyên nhân chính của sự thoái hóa noron thần kinh xung quanh các mảng bám lão suy trong não và gây chết ở người bệnh AD (Oh, E.S., Troncoso, J.C. &

Fangmark Tucker, S.M. *Neuromol Med* (2008) 10: 195).

Sự tích tụ A β không chỉ được tìm thấy ở các mảng lão suy của bệnh, mà còn tìm thấy với khối lượng lớn trong các bệnh amyloid não khác, như bệnh mạch máu não tích tụ amyloid (CAA, cũng được đặt tên là bệnh mạch máu amyloid ura đỏ Congo (Congophilic amyloid angiopathy). Sự tích tụ A β được tìm thấy trong bệnh CAA chủ yếu bao gồm dạng A β ngắn hơn (A β 1-40), và cũng bao gồm lượng nhỏ A β 1-42 (Wilcock et al., *Journal of Neuroinflammation* 1 (24):1-11 (2004)).

Dựa trên vai trò quan trọng của A β trong bệnh học AD, và độ độc của A β là phụ thuộc vào khối lượng, mức kết tụ và tỷ lệ thanh thải của nó, các nhà nghiên cứu đã liên tục phát triển các phương pháp khác nhau để can thiệp vào các bệnh A β , nỗ lực để làm chậm hoặc chặn sự tiến triển của AD bằng cách làm giảm sự sản sinh A β , ngăn ngừa sự tích lũy A β và sự tích tụ và sự phiền toái do độ độc của A β . Nhiều kháng thể kháng lại A β đã được công bố, bao gồm Aducanumab (Biogen), Bapineuzumab (Janssen, Elan, Pfizer), Solanezumab (Eli Lilly), Gantenerumab (Hoffman-LaRoche), và các kháng thể kháng A β được bộc lộ trong đơn sáng chế No WO1994017197A1, WO1998044955A1, WO2003016466A3, WO2003070760A3, WO2004071408A3, WO2006081171A1, WO2007108756A1, WO2008011348A3, WO2008081008A1, WO2012051498A3 và v.v... Tuy nhiên, hầu hết các kháng thể đã kết thúc trong thất bại, bao gồm Bapineuzumab và Solanezumab, mà đã được đưa ra là mong đợi lớn nhưng thất bại trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III. Hiện nay, chỉ Aducanumab vẫn là trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III, và nó chỉ được xem là kháng thể kháng A β mới hứa hẹn được thông qua để điều trị AD, tuy nhiên các kết quả thử nghiệm lâm sàng nữa vẫn cần được xác nhận là liệu nó đã đạt chất lượng để đưa ra thị trường.

Do đó, vẫn có nhu cầu cấp thiết phát triển các kháng thể kháng Abeta với cấu trúc mới để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn gây ra bởi β -amyloid (như AD).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát triển các kháng thể kháng Abeta và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó với cấu trúc hoàn toàn mới sau các nghiên cứu thí nghiệm sâu rộng. Các kháng thể kháng Abeta và mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có khả năng liên kết đặc hiệu với Abeta người với ái lực cao, và thể hiện hiệu quả tuyệt vời. Chúng được mong đợi là hữu ích để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn gây ra bởi Abeta (ví dụ, bệnh Alzheimer).

Trong một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với Abeta người, kháng thể này bao gồm ít nhất một vùng CDR được chọn từ các trình tự axit amin sau hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với:

(1) trình tự axit amin của vùng HCDR1 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, 17 hoặc 23;

(2) trình tự axit amin của vùng HCDR2 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, 18, 24 hoặc 52;

(3) trình tự axit amin của vùng HCDR3 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, 19, 25 hoặc 27;

(4) trình tự axit amin của vùng LCDR1 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14 hoặc 20;

(5) trình tự axit amin của vùng LCDR2 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 hoặc 21; và

(6) trình tự axit amin của vùng LCDR3 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16, 22, 26 hoặc 53.

Đối với trình tự axit amin có ít nhất 85% trình tự giống như được nêu trên, ưu tiên là có ít nhất 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% trình tự giống; ưu tiên hơn, có nhiều hơn 90%, nhiều hơn 95% hoặc nhiều hơn 99% trình tự giống, ưu tiên nhất, có ít nhất 95% trình tự giống. Trình tự axit amin được đề cập trên có ít nhất 85% trình tự giống có thể thu được bằng cách xóa bỏ, chèn thêm hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta này liên kết với sợi A β 1-42 người và/hoặc A β 1-42 monome với hằng số cân bằng phân ly (KD) là khoảng 10^{-7} M hoặc thậm chí nhỏ hơn; ưu tiên là, liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M, hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn. Giá trị KD có thể được xác định bằng công nghệ Cộng hưởng plasma bề mặt (Surface Plasma Resonance-SPR) trong thiết bị Biacore T200.

Ưu tiên là, Abeta người này là sợi A β 1-42 và A β 1-42 monome.

Theo một số phương án ưu tiên, kháng thể kháng Abeta này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa các vùng HCDR1-3 hoặc các vùng LCDR1-3 như được xác định trong một trong số bất kỳ sau:

(i) các vùng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, 12 và 13;

(ii) các vùng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, 18 và 19;

(iii) các vùng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23, 24 và 25;

(iv) các vùng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, 18 và 27;

(v) các vùng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, 52 và 19,

(vi) các vùng HCDR1, HCDR2 và HCDR3 chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, 52 và 27;

và/hoặc

(vii) các vùng LCDR1, LCDR2 và LCDR3 chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, 15 và 16,

(viii) các vùng LCDR1, LCDR2 và LCDR3 chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20, 21 và 22,

(viii) các vùng LCDR1, LCDR2 và LCDR3 chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20, 21 và 26; hoặc

(x) các vùng LCDR1, LCDR2 và LCDR3 chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện tương ứng trong các trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20, 21 và 53.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế là kháng thể kháng Abeta bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ A đến D sau:

A) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có vùng HCDR1 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11, vùng HCDR2 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 và vùng HCDR3 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13, và vùng LCDR1 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14, vùng LCDR2 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 15 và vùng LCDR3 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16;

B) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có vùng HCDR1 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID

NO: 17, vùng HCDR2 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18 hoặc 52 và vùng HCDR3 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19, và vùng LCDR1 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20, vùng LCDR2 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng LCDR3 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22;

C) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có vùng HCDR1 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23, vùng HCDR2 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24 và vùng HCDR3 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25, và vùng LCDR1 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20, vùng LCDR2 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng LCDR3 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 hoặc 53; và

D) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, có vùng HCDR1 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 17, vùng HCDR2 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18 hoặc 52 và vùng HCDR3 chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27, và vùng LCDR1 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20, vùng LCDR2 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21 và vùng LCDR3 chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể chuột, khảm, được làm cho phù hợp với người hoặc người hoàn toàn.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể chuột, và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, 5, 7 hoặc 9 hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với; và/hoặc

trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO:4, 6, 8 hoặc 10 hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với.

Đối với trình tự axit amin có ít nhất 85% trình tự giống như được nêu trên, ưu tiên là có ít nhất 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% trình tự giống; ưu tiên hơn, có nhiều hơn 90%, nhiều

hơn 95% hoặc nhiều hơn 99% trình tự giống, ưu tiên nhất, có ít nhất 95% trình tự giống. Trình tự axit amin được đề cập trên có ít nhất 85% trình tự giống có thể thu được bằng cách xóa bỏ, chèn thêm hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin. Ưu tiên hơn, kháng thể này liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) là khoảng 10^{-7}M hoặc thậm chí nhỏ hơn. Trong một số phương án, kháng thể này liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-8}M , 10^{-9}M , hoặc 10^{-10}M hoặc thậm chí nhỏ hơn, và giá trị KD có thể được xác định bằng Công nghệ cộng hưởng plasma bề mặt (SPR) trong thiết bị Biacore T200. Ưu tiên là, Abeta người này là các sợi A β 1-42 và A β 1-42 monome.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể kháng Abeta bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ E đến H sau:

E) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

F) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6;

G) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8; và

H) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

Trong một số phương án của kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề cập trên đây, kháng thể này là kháng thể được làm giống người. Ưu tiên là, trình tự vùng FR của kháng thể được bắt nguồn từ trình tự vùng FR kháng thể dòng mầm người hoặc biến thể của nó. Ưu tiên là, như yêu cầu, biến thể này bao gồm một hoặc nhiều sự bỏ bớt, sự xen vào hoặc sự thay thế axit amin; Ưu tiên hơn, biến thể vùng FR có lên đến 10 sự đột biến hồi phục axit amin trên vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người, tương ứng.

Trong một số phương án, trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng của

kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, 46, 48 hoặc 50, hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với; và/hoặc

trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45, 47, 49 hoặc 51, hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với.

Đối với trình tự axit amin có ít nhất 85% trình tự giống như được nêu trên, ưu tiên là có ít nhất 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% trình tự giống; ưu tiên hơn, có nhiều hơn 90%, nhiều hơn 95% hoặc nhiều hơn 99% trình tự giống, ưu tiên nhất, có ít nhất 95% trình tự giống. Trình tự axit amin được đề cập trên có ít nhất 85% trình tự giống có thể thu được bằng cách xóa bỏ, chèn thêm hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin. Ưu tiên là, kháng thể này liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) là khoảng 10^{-7} M hoặc thậm chí nhỏ hơn. Trong một số phương án, kháng thể này liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M, hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn, và giá trị KD có thể được xác định bằng Công nghệ cộng hưởng plasma bề mặt (SPR) trong thiết bị Biacore T200. Ưu tiên là, Abeta người này là sợi A β 1-42 và A β 1-42 monome.

Trong một số phương án, kháng thể này là kháng thể được làm giống người được chọn từ kháng thể kháng Abeta bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là từ a) đến d) sau:

a) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 45;

b) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 46, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 47;

c) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 48, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49; và

d) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như

được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 50, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể có ít nhất 90% trình tự giống với trình tự như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51, trong đó được đề cập trên đây ít nhất 90% trình tự giống bao gồm ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% trình tự giống.

Trong một số phương án, kháng thể này là kháng thể được làm giống người bao gồm các vùng biến đổi như được thể hiện trong bất kỳ sau đây:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện trong trình tự nêu tương ứng trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13, và (các) vùng FR chứa một hoặc nhiều sự đột biến hồi phục axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 1E, 71A và 94R; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16;

b) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể bao gồm HCDR1 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 19, và HCDR2 như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 18 hoặc 52, và (các) vùng FR chứa một hoặc nhiều sự đột biến hồi phục axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 28A và 82B T; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22;

c) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể bao gồm HCDR1, HCDR2 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm LCDR1 và LCDR2 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20 và SEQ ID NO: 21, và LCDR3 như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 26 hoặc 53, và (các) vùng FR chứa một hoặc nhiều sự đột biến hồi phục axit amin được chọn từ nhóm bao gồm 2V và 45K; và

d) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể bao gồm HCDR1 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 27, và HCDR2 như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 18 hoặc 52; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, và (các) vùng FR bao gồm sự đột biến hồi phục axit amin 2V.

Trong một số phương án, kháng thể này là kháng thể được làm giống người bao gồm các vùng biến đổi như được thể hiện trong bất kỳ sau đây:

a) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit

amin nêu trong SEQ ID NO: 66 hoặc biến thể vùng FR của nó; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 67 hoặc biến thể vùng FR của nó;

b) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 68 hoặc biến thể vùng FR của nó; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 69 hoặc biến thể vùng FR của nó;

c) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 70 hoặc biến thể vùng FR của nó; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 71 hoặc biến thể vùng FR của nó; và

d) vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72 hoặc biến thể vùng FR của nó; và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 73 hoặc biến thể vùng FR của nó; trong đó biến thể vùng FR có lên đến 10 sự đột biến hồi phục axit amin một cách tách biệt trên vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được đề cập trên đây là kháng thể kháng Abeta bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ M đến P sau:

M) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 45;

N) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 47;

O) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 49;

P) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 51.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa thêm vùng hằng định.

Trong một số phương án, vùng hằng định chuỗi nặng kháng thể là vùng hằng định IgG1 người, ưu tiên là, trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng kháng thể là như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 42 hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với; và vùng hằng định chuỗi nhẹ kháng thể được chọn từ vùng hằng định kappa người, và ưu tiên nhất, trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ kháng thể là như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với.

Đối với trình tự axit amin có ít nhất 85% trình tự giống như được nêu trên, ưu tiên là có ít nhất 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% trình tự giống; ưu tiên hơn, có nhiều hơn 90%, nhiều hơn 95% hoặc nhiều hơn 99% trình tự giống, ưu tiên nhất, có ít nhất 95% trình tự giống. Trình tự axit amin được đề cập trên có ít nhất 85% trình tự giống có thể thu được bằng cách xóa bỏ, chèn thêm hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin.

Trong một số phương án, trình tự axit amin chuỗi nặng của kháng thể kháng Abeta là như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 30, 34, 38 hoặc 40, hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với, và/hoặc

trình tự axit amin chuỗi nhẹ của kháng thể này như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, 35, 39 hoặc 41, hoặc có ít nhất 85% trình tự của nó giống với.

Đối với trình tự axit amin có ít nhất 85% trình tự giống như được nêu trên, ưu tiên là có ít nhất 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% trình tự giống; ưu tiên hơn, có nhiều hơn 90%, nhiều hơn 95% hoặc nhiều hơn 99% trình tự giống, ưu tiên nhất, có ít nhất 95% trình tự giống. Trình tự axit amin được đề cập trên có ít nhất 85% trình tự giống có thể thu được bằng cách xóa bỏ, chèn thêm hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin. Ưu tiên là, kháng thể này liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) là khoảng 10^{-7} M hoặc thậm chí nhỏ hơn. Trong một số phương án, kháng thể này liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M, hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn, và giá trị KD có thể được xác định bằng Công nghệ cộng hưởng plasma bề mặt (SPR) trong thiết bị Biacore T200. Ưu tiên là, Abeta người này là sợi A β 1-42 và A β 1-42 monome.

Trong một số phương án, kháng thể kháng Abeta này hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó là kháng thể kháng Abeta bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó được chọn từ Q đến T sau:

Q) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 31;

R) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 35;

S) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 39; và

T) kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41.

Trong một số phương án, mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diabody, dsFv và mảnh gắn kết kháng nguyên của peptit chứa CDR.

Trong một số phương án, được đề xuất là kháng thể kháng Abeta cạnh tranh với kháng thể được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để liên kết với Abeta người, hoặc cạnh tranh với kháng thể được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó để liên kết với epitop kháng nguyên Abeta giống nhau.

Trong một số phương án, sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Abeta bất kỳ hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó như được mô tả trên đây.

Trong một số phương án, phân tử axit nucleic này là phân tử axit nucleic bất kỳ được chọn từ U đến Z sau:

U) phân tử axit nucleic, bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 52 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với, và/hoặc bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với;

V) phân tử axit nucleic, bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 54 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với, và/hoặc bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với;

W) phân tử axit nucleic, bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 56 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với, và/hoặc bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong

trình tự nêu trong SEQ ID NO:57 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với; và

Z) phân tử axit nucleic, bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với, và/hoặc bao gồm trình tự nucleotit như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO:59 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất 85% trình tự của nó giống với.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề xuất vectơ tái tổ hợp, chứa phân tử axit nucleic được đề cập trên đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ thu được bằng cách biến nạp vectơ tái tổ hợp được đề cập trên đây; tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm tế bào tiền nhân và tế bào nhân chuẩn, ưu tiên là tế bào nhân chuẩn, ưu tiên hơn các tế bào động vật có vú, bao gồm CHO (Chinese Hamster ovary) dòng tế bào buồng trứng chuột) và tế bào NS0.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế kháng thể kháng Abeta được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm các bước nuôi cấy tế bào chủ được đề cập trên đây trong môi trường nuôi cấy, và sau đó tinh chế và thu hồi kháng thể này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng Abeta được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và một hoặc nhiều chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng được dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng Abeta được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm được đề cập trên đây để sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn gây ra bởi Abeta.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn gây ra bởi Abeta, bao gồm dùng lượng hữu hiệu cho hiệu quả điều trị bệnh kháng thể kháng Abeta được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm được đề cập trên đây, cho người bệnh bị mắc bệnh hoặc rối loạn này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng Abeta được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm được đề cập trên đây để sử dụng làm thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn được trung gian bởi Abeta.

Trong một số phương án, bệnh hoặc rối loạn được đề cập trên đây là bệnh thoái hóa thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, rối loạn nhận thức nhẹ, chứng mất trí, chứng sa sút trí tuệ thể Lewy, bệnh Parkinson, bệnh Pick, bệnh Bevac, bệnh mạch máu amyloid ưa đỏ Congo, bệnh mạch máu não tích tụ

amyloid, hội chứng Down, ồ nhồi máu não, bệnh Huntington, bệnh Creutzfeldt-Jakob, hội chứng sa sút trí tuệ do AIDS, chứng trầm cảm, rối loạn lo âu, chứng ám ảnh, chứng liệt Bell, bệnh động kinh, viêm não, bệnh xơ cứng rải rác, rối loạn thần kinh cơ, rối loạn khối u thần kinh, khối u não, rối loạn thần kinh mạch do đột quỵ, rối loạn miễn dịch thần kinh, bệnh tai-thần kinh, chấn thương thần kinh do tổn thương tủy sống, đau do đau thần kinh, rối loạn thần kinh và thần kinh tâm thần học nhi khoa, rối loạn giấc ngủ, hội chứng Tourette, rối loạn nhận thức nhẹ, sa sút trí tuệ não mạch, ồ nhồi máu não, xơ nang, bệnh Gaucher và loạn vận động khác và các bệnh về hệ thần kinh trung ương. Trong một số phương án, bệnh này là bệnh Alzheimer.

Trong một số phương án, sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh Alzheimer, bao gồm dùng cho người bệnh lượng hữu hiệu cho hiệu quả điều trị kháng thể kháng Abeta được đề cập trên đây hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó hoặc được phẩm được đề cập trên đây.

Các kháng thể kháng Abeta hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo sáng chế thể hiện hiệu quả tốt trong cả hai các thử nghiệm sinh hóa và các thử nghiệm được lực học *in vivo*. Ví dụ, trong thử nghiệm phát hiện ái lực, các kháng thể kháng Abeta theo sáng chế (HAB-2401, HAB-5101, HAB-3601 và HAB-9001) thể hiện ái lực đối với sợi A β 1-42 là nhỏ hơn 10^{-8} M, thậm chí nhỏ hơn 10^{-10} M, và ái lực đối với A β 1-42 monome là nhỏ hơn 10^{-7} M đến 10^{-8} M. Đặc biệt là, kháng thể HAB-9001 thể hiện ái lực mạnh hơn gần 100 lần so với Aducanumab, được biết gần đây là kháng thể kháng Abeta tuyệt vời nhất.

Ngoài ra, trong thử nghiệm về hiệu quả của các kháng thể để ngăn chặn sự kết tụ của các A β 1-42 monome thành các sợi A β 1-42, các kết quả này cho thấy rằng các kháng thể HAB-2401, HAB-5101 và HAB-9001 theo sáng chế có thể ức chế hiệu quả sự kết tụ của A β 1-42 monome thành các sợi A β 1-42, trong khi Aducanumab thì không thể.

Trong thử nghiệm sinh hóa, các kết quả này cho thấy rằng các kháng thể kháng Abeta HAB-2401 và HAB-3601 theo sáng chế có hiệu quả bảo vệ neuron ban đầu chuột rat và có thể thúc đẩy sự thực bào sợi A β bởi các tế bào tiểu thần kinh đệm ban đầu.

Ngoài ra, trong thử nghiệm được lực học ở động vật, các kết quả này cho thấy rằng các kháng thể HAB-2401, HAB-5101 và HAB-9001 theo sáng chế có thể cải thiện đáng kể trí nhớ không gian và khả năng nhận thức của chuột Alzheimer 5 $\times$ FAD. Hơn nữa, các kháng thể theo sáng chế có tác động thấp hơn đối với sự giải phóng cytokin (như TNF α , IFN- γ , IL1 β , IL2, IL6, IL12p70, IL4, IL10, MCP-1 và KC) trong mô não, khi so sánh với kháng thể dương tính Aducanumab, chỉ ra rằng các kháng thể theo sáng chế có thể điều khiển về mặt

nguy cơ an toàn. Các kháng thể kháng Abeta theo sáng chế được mong đợi là hữu ích trong tương lai để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn gây ra bởi Abeta (như bệnh Alzheimer).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện thử nghiệm phát huỳnh quang thioflavin (ThT), thể hiện các kết quả thí nghiệm về hiệu quả ngăn chặn của các kháng thể kháng Abeta đối với sự kết tụ của A β 1-42 monome thành các sợi A β 1-42;

Fig. 2 thể hiện thử nghiệm bảo vệ lên các noron vỏ ban đầu, thể hiện các kết quả thí nghiệm về hiệu quả bảo vệ của các kháng thể kháng Abeta đối với các noron ban đầu của chuột rat;

Fig. 3 thể hiện thử nghiệm thực bào BV2, thể hiện các kết quả thí nghiệm của các kháng thể kháng Abeta mà thúc đẩy sự thực bào các sợi A β bởi các tế bào BV2;

Fig. 4 thể hiện các kết quả thí nghiệm về hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự thực bào các sợi A β bằng các tế bào tiểu thần kinh đệm ban đầu chuột rat;

Fig. 5 là hình vẽ miêu tả điểm ghi khả năng của chuột làm tổ;

Fig. 6 thể hiện thí nghiệm làm tổ, đồ thị thanh thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự cải thiện tập tính xã hội của chuột chuyển gen 5 $\times$ FAD;

Fig. 7 thể hiện thí nghiệm làm tổ, biểu đồ phân tán thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự cải thiện tập tính xã hội của chuột chuyển gen 5 $\times$ FAD;

Fig. 8 thể hiện biểu đồ mê cung nước. Đường tròn liền và đường tròn chấm tương ứng là vị trí của bục và khu vực bục.

Fig. 9 thể hiện đường cong học cho thí nghiệm mê cung nước; thể hiện các kết quả đường cong về huấn luyện và học bục kín. ANOVA hai chiều đề cập đến phân tích phương sai hai chiều; Các kết quả phân tích là như sau:

ANOVA hai chiều: WT so với tá dược lỏng: # $p<0,05$; ###: $p<0,001$;

Amab so với tá dược lỏng: ▼ : $p<0,05$; ▼ ▼ : $p<0,01$;
▼▼▼: $P<0,001$;

HAB-5101-Ch so với tá dược lỏng: ^: $p<0,05$;

HAB-2401-Ch so với tá dược lỏng: ◆: $p<0,05$; ◆◆: $p<0,01$;

HAB-9001-Ch so với tá dược lỏng: *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***:

$P<0,001$.

Fig. 10A-10G thể hiện các kết quả của thí nghiệm mê cung nước: trực hoành

thể hiện các nhóm dùng dược chất; Fig. 10A thể hiện các kết quả thời gian chờ để đến bụi, Fig. 10B thể hiện các kết quả thời gian chờ để đến vùng bụi, Fig. 10C thể hiện các kết quả số đếm chỗ giao nhau bụi này, Fig. 10D thể hiện các kết quả số đếm chỗ giao nhau vùng bụi, Fig. 10E thể hiện các kết quả khoảng thời gian trên bụi, Fig. 10F thể hiện các kết quả khoảng thời gian ở vùng bụi, và Fig. 10G thể hiện các kết quả về chỉ số chỗ giao nhau bụi (chỉ số giao nhau = số đếm giao nhau vùng đích - (tổng số đếm giao các vùng tương ứng trong ba cung phần tư còn lại)/3), lời ghi chú của các fig. 10B-10G là giống như các lời ghi chú của fig. 10A (chi tiết xem lời ghi chú trong Fig. 10A). ANOVA một chiều đề cập đến phân tích phương sai một chiều (Tương tự cho các fig. 12 và 13), so với tá dược, $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$; không có các sự khác biệt có ý nghĩa được phát hiện giữa các nhóm này;

Fig. 11A-11D thể hiện các kết quả về sự tích tụ A β trong thử nghiệm ELISA. Fig. 11A thể hiện hàm lượng A β 1-40 không tan có trong hải mã, Fig. 11B thể hiện hàm lượng A β 1-42 không tan có trong hải mã (lời ghi chú của Fig. 11B là giống lời ghi chú của Fig. 11A, chi tiết xem Fig. 11A), Fig. 11C thể hiện hàm lượng A β 1-40 không tan có trong vỏ não, và Fig. 11D thể hiện hàm lượng A β 1-42 không tan có trong vỏ não (lời ghi chú của Fig. 11D là giống lời ghi chú của Fig. 11C, chi tiết xem Fig. 11C);

Fig. 12 là đồ thị thể hiện A β trong hải mã, chỉ định các kết quả của phát hiện IHC về sự tích tụ A β (vỏ não). ANOVA một chiều, so với tá dược $***p<0,001$;

Fig. 13 thể hiện A β trong vỏ não, chỉ định các kết quả của sự phát hiện IHC về sự tích tụ A β (hải mã);

Fig. 14A thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng cytokin, TNF α trong mô não;

Fig. 14B thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng cytokin, IFN- γ trong mô não;

Fig. 14C thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng MCP-1 trong mô não;

Fig. 14D thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng KC trong mô não;

Fig. 15A thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng cytokin, IL1 β trong mô não;

Fig. 15B thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng cytokin, IL2 trong mô não;

Fig. 15C thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng cytokin, IL6 trong mô não;

Fig. 15D thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải

phóng cytokin, IL12p70 trong mô não;

Fig. 15E thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng cytokin, IL4 trong mô não;

Fig. 15F thể hiện hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự giải phóng cytokin, IL10 trong mô não.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ

Để hiểu dễ dàng hơn sáng chế, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học nhất định được xác định cụ thể dưới đây. Trừ khi được định nghĩa khác được xác định rõ ràng ở đây, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học khác được sử dụng ở đây có nghĩa được hiểu thông thường bởi chuyên gia trong ngành thuộc lĩnh vực của sáng chế.

Các mã ba chữ cái và các mã một chữ cái cho axit amin được sử dụng trong sáng chế là như được mô tả trong J. biol. chem, 243, p3558 (1968).

Trong sáng chế, "XXX" đề cập đến một hoặc nhiều chất; ví dụ, "kháng thể kháng Abeta" nên được hiểu là một hoặc nhiều kháng thể liên kết đặc hiệu với Abeta. Do đó, thuật ngữ "một", "một hoặc nhiều" và "ít nhất một" có thể được sử dụng hoán đổi cho nhau ở đây.

Thuật ngữ "amyloid β ", " β -amyloid", " $A\beta$ " và "Abeta" có thể được sử dụng hoán đổi cho nhau ở đây và đề cập đến đoạn được tạo ra bằng cách cắt protein tiền chất Amyloid (Amyloid Precursor Protein-APP) sử dụng β -secretaza 1 (BACE1), hoặc dạng cải biến bất kỳ hoặc dạng tương đương chức năng của nó, bao gồm, nhưng không bị giới hạn đến $A\beta$ 1-40 và $A\beta$ 1-42. Được biết rằng $A\beta$ có mặt ở dạng monome, mà được kết hợp để tạo thành các oligome và cấu trúc tiền sợi. Cấu trúc và trình tự của peptit $A\beta$ này được biết nhiều đối với chuyên gia trong ngành, và các phương pháp sản xuất peptit hoặc để chiết các peptit này từ não và các mô khác cũng được biết nhiều (ví dụ, Glenner và Wong, Biochem Biophys Res. Comm. 129:885 -890 (1984)). Hơn nữa, các peptit $A\beta$ cũng có sẵn trên thị trường. Là các ví dụ về trình tự axit amin của $A\beta$ người, SEQ ID NO:1 thể hiện trình tự axit amin của $A\beta$ 1-40 và SEQ ID NO:2 thể hiện trình tự axit amin của $A\beta$ 1-42.

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể" đề cập đến globulin miễn dịch, cấu trúc chuỗi bốn-peptit được nối với nhau bằng liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau. (Các) vùng hằng định chuỗi nặng globulin miễn dịch khác nhau thể hiện thành phần axit amin và cấu trúc sắp xếp khác nhau, do đó thể hiện tính sinh miễn dịch khác nhau. Do đó, các globulin miễn dịch có thể được chia thành năm loại, hoặc được đặt tên là các isotyp

globulin miễn dịch, cụ thể là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE, tương ứng với chuỗi nặng μ , δ , γ , α và ϵ , theo thành phần axit amin của vùng khớp của nó và số lượng và vị trí của các liên kết disulfua chuỗi nặng, loại Ig giống nhau có thể được chia tiếp thành các phân lớp dưới khác nhau. ví dụ, IgG có thể được chia thành IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Chuỗi nhẹ có thể được chia thành chuỗi κ hoặc λ dựa trên (các) vùng hằng định khác nhau. Mỗi loại trong số năm loại Ig có thể có chuỗi κ hoặc λ .

Trong sáng chế, chuỗi nhẹ kháng thể có thể chứa thêm vùng hằng định chuỗi nhẹ, chứa chuỗi κ , λ người hoặc chuột hoặc biến thể của nó; chuỗi nặng kháng thể có thể chứa thêm vùng hằng định chuỗi nặng, chứa IgG1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 người hoặc chuột hoặc biến thể của nó.

Các trình tự khoảng 110 axit amin liền kề với đầu tận cùng N của các chuỗi nặng và nhẹ kháng thể là biến đổi cao, được biết là vùng biến đổi (vùng Fv), bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH); phần còn lại của các trình tự axit amin gần với đầu tận cùng C là tương đối ổn định, được biết là vùng hằng định. Vùng biến đổi bao gồm ba vùng siêu biến (hypervariable region-HVR) và bốn vùng khung tương đối bảo thủ (framework region-FR). Ba vùng siêu biến xác định tính đặc hiệu của kháng thể cũng được biết là vùng xác định tính bổ sung (complementarity determining region-CDR). Mỗi vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, với trật tự trình tự từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxyl theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Ba vùng CDR của chuỗi nhẹ đề cập đến LCDR1, LCDR2, và LCDR3, và ba vùng CDR của chuỗi nặng đề cập đến HCDR1, HCDR2, và HCDR3. Số và vị trí của các gốc axit amin CDR của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được mô tả ở đây tuân theo tiêu chuẩn đánh số Kabat đã biết và/hoặc tiêu chuẩn đánh số Chothia ((1983) U.S.Dept.of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest.).

Các kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống người, ưu tiên là kháng thể được làm giống người.

Thuật ngữ "kháng thể chuột" được mô tả trong sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng gắn kết Abeta người được điều chế theo kiến thức và kỹ năng trong lĩnh vực này. Trong khi điều chế, đối tượng thử nghiệm có thể được tiêm kháng nguyên Abeta, và sau đó khối tế bào lai biểu hiện kháng thể chứa trình tự mong muốn hoặc đặc điểm chức năng mong muốn được phân tách. Trong phương án theo sáng chế, kháng thể Abeta chuột hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó chứa thêm vùng hằng định chuỗi nhẹ của chuỗi κ , λ chuột hoặc biến thể của nó, và/hoặc chứa thêm vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1, IgG2, IgG3 chuột hoặc

biến thể của nó.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" như được mô tả ở đây, là kháng thể bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể chuột cùng với vùng hằng định của kháng thể người, và kháng thể khảm có thể làm giảm bớt đáp ứng miễn dịch gây ra bởi kháng thể chuột. Để thiết lập kháng thể khảm, trước hết thiết lập khối tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng chuột đặc hiệu và gen vùng biến đổi được tách dòng đơn tính từ khối tế bào lai chuột này. Sau đó gen vùng hằng định được tách dòng đơn tính từ kháng thể người theo nhu cầu. Gen vùng biến đổi chuột được liên kết với gen vùng hằng định người để tạo thành gen khảm, mà có thể sau đó được cài xen vào trong vector biểu hiện. Cuối cùng phân tử kháng thể khảm sẽ được biểu hiện trong hệ thống tiền nhân hoặc nhân chuẩn. Trong phương án theo sáng chế, chuỗi nhẹ của kháng thể khảm chứa thêm vùng hằng định chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ chuỗi κ , λ người hoặc biến thể của nó. Chuỗi nặng của kháng thể khảm chứa thêm vùng hằng định chuỗi nặng có nguồn gốc từ IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 người hoặc biến thể của nó, ưu tiên là chứa vùng hằng định chuỗi nặng có nguồn gốc từ IgG1, IgG2 hoặc IgG4 người, hoặc biến thể IgG1, IgG2 hoặc IgG4 có (các) đột biến axit amin, như (các) đột biến YTE hoặc (các) đột biến hồi phục.

"Kháng thể được làm giống người" như được sử dụng ở đây, cũng được biết là kháng thể ghép CDR, đề cập đến kháng thể được tạo ra bằng cách ghép các trình tự CDR chuột vào trong các vùng khung vùng biến đổi kháng thể người, nghĩa là, kháng thể được tạo ra trong các loại trình tự vùng khung kháng thể dòng mầm người khác nhau. Kháng thể được làm giống người có thể chế ngự các đáp ứng khác loại gây ra bởi kháng thể khảm mang một số lớn các thành phần protein chuột. Các trình tự vùng khung này có thể thu được cơ sở dữ liệu ADN công bố bao hàm các trình tự gen kháng thể dòng mầm hoặc các tài liệu tham khảo đã được công bố. Ví dụ, các trình tự ADN dòng mầm của các gen vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự dòng mầm người "VBase" (www.mrcpe.com.ac.uk/vbase), cũng như trong Kabat, EA, et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Để tránh sự giảm hoạt tính gây ra bởi tính sinh miễn dịch giảm, các trình tự vùng khung trong kháng thể người vùng biến đổi có thể được đưa đến các đột biến bảo toàn giảm thiểu hoặc (các) đột biến hồi phục để duy trì hoạt tính. Kháng thể được làm giống người theo sáng chế cũng bao gồm kháng thể được làm giống người trên đó sự thành thực ái lực CDR được thực hiện bởi sự biểu hiện thể thực khuẩn. Trong một phương án theo sáng chế, trình tự CDR của kháng thể được làm giống người Abeta được chọn từ SEQ ID NO: 11-27. Đối với vùng khung vùng biến đổi kháng thể người, sau khi thiết kế và chọn lọc, trình tự vùng FR chuỗi nặng kháng thể được chọn từ vùng FR1, FR2, FR3 và JH6 của dòng mầm người

IGHV1-24*01 và hjh6.3, IGHV3-30*01 và hjh6.3 hoặc IGHV2-70D*04 và hjh6.1, hoặc trình tự đột biến của nó; trình tự vùng FR chuỗi nhẹ được chọn từ các vùng FR1, FR2, FR3 và JK4, JK2 của dòng mầm người IGKV1-27*01 và hjk4.1, IGKV1-39*01 và hjk4.1, IGKV2-40*01 và hjk4.1, IGKV2-40*01 và hjk2.1, hoặc trình tự đột biến của nó.

Ghép CDR có thể dẫn đến giảm ái lực của kháng thể Abeta thu được hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó với kháng thể do các gốc vùng khung tiếp xúc với kháng nguyên. Các tương tác này có thể thu được từ các đột biến soma cao. Do đó, có thể vẫn cần thiết ghép axit amin vùng khung thể cho với vùng khung kháng thể được làm giống người. Các gốc axit amin tham gia vào gắn kết kháng nguyên có nguồn gốc từ kháng thể người không phải Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có thể được xác định bằng cách kiểm tra trình tự và cấu trúc của vùng biến đổi kháng thể đơn dòng chuột. Các gốc axit amin mà khác nhau giữa vùng khung CDR thể cho và các dòng mầm có thể được xem là được liên quan. Nếu không thể xác định dòng mầm gần nhất, trình tự này có thể được so sánh với trình tự thông thường cùng có ở các kiểu phụ hoặc trình tự chuột với phần trăm tương đồng cao. Các gốc vùng khung hiếm được cho là kết quả của đột biến cao trong các tế bào soma, và đóng vai trò quan trọng trong liên kết.

Như được sử dụng ở đây, "mảnh gắn kết kháng nguyên" hoặc "mảnh có chức năng" đề cập đến một hoặc nhiều mảnh kháng thể vẫn còn khả năng liên kết với kháng nguyên. Đã được thấy rằng các mảnh của kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh có thể được sử dụng để thu được chức năng gắn kết với kháng thể đặc hiệu. Các ví dụ về các mảnh gắn kết được đưa vào ở dạng "mảnh gắn kết kháng nguyên" bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một bao gồm khu vực VL, VH, CL và CH1; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bằng liên kết disulfua trong vùng khớp; (iii) mảnh Fd, bao gồm các khu vực VH và CH1; (iv) mảnh Fv, bao gồm khu vực VH và VL một nhánh; (v) khu vực đơn hoặc mảnh dAb (Ward et al. (1989) Nature341: 544-546) bao gồm khu vực VH; và (vi) vùng xác định bổ sung tách biệt (CDR) hoặc (vii) kết hợp của hai hoặc nhiều CDR tách biệt được liên kết tùy ý bằng các đoạn nối tổng hợp. Ngoài ra, khu vực VL và khu vực VH của mảnh Fv được mã hóa bởi hai gen tách biệt, tuy nhiên, chúng có thể được liên kết bằng đoạn nối tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp, để tạo ra chuỗi protein đơn trong đó phân tử hóa trị một được tạo thành bằng cách kết cặp khu vực VL và VH (được đề cập đến là chuỗi đơn Fv (scFv); xem ví dụ, Bird et al. (1988): 423-426; Science 242 và Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Các kháng thể chuỗi đơn này cũng nhằm để được đưa vào dưới dạng "mảnh gắn kết kháng nguyên". Các kháng thể này thu được sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong ngành,

và được sàng lọc các mảnh có chức năng bằng cách sử dụng phương pháp tương tự như phương pháp cho kháng thể nguyên vẹn. Các phần gắn kết kháng nguyên có thể được sản xuất bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách cắt bằng enzym hoặc hóa học globulin miễn dịch nguyên vẹn. Các kháng thể có thể được tạo thành ở dạng các isotyp khác nhau, ví dụ, IgG (ví dụ, kiểu phụ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4), kháng thể IgA1, IgA2, IgD, IgE hoặc IgM.

Như được sử dụng ở đây, Fab là mảnh kháng thể thu được bằng cách xử lý phân tử kháng thể IgG bằng papain (cắt các gốc axit amin ở vị trí 224 của chuỗi H). Mảnh Fab có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên, trong đó khoảng một nửa phía đầu tận cùng N của chuỗi H và toàn bộ chuỗi L được liên kết với nhau thông qua liên kết disulfua. Fab theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách xử lý kháng thể đơn dòng theo sáng chế (mà nhận biết đặc hiệu Abeta người và liên kết với vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó) với papain. Hơn nữa, Fab có thể được sản xuất bằng cách xen ADN mã hóa Fab của kháng thể này vào trong vector biểu hiện tế bào tiền nhân hoặc vector biểu hiện tế bào có nhân và đưa vector này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện Fab.

Như được sử dụng ở đây, $F(ab')_2$ là mảnh kháng thể có trọng lượng phân tử là khoảng 100.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên và chứa hai vùng Fab mà được liên kết ở vị trí khớp, nó có thể được sản xuất bằng cách cắt phân phía dưới hai liên kết disulfua trong vùng khớp của IgG bằng pepsin. $F(ab')_2$ theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách xử lý kháng thể đơn dòng theo sáng chế (mà nhận biết đặc hiệu Abeta người và liên kết với vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó) bằng pepsin. Ngoài ra, $F(ab')_2$ có thể được sản xuất bằng cách liên kết Fab' được mô tả dưới đây thông qua liên kết thioete hoặc liên kết disulfua.

Như được sử dụng ở đây, Fab' là mảnh kháng thể có trọng lượng phân tử là khoảng 50.000 và có hoạt tính gắn kết kháng nguyên. Fab' thu được bằng cách cắt liên kết disulfua ở vùng khớp của $F(ab')_2$ được đề cập trên đây. Fab' theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách xử lý $F(ab')_2$ theo sáng chế (mà nhận biết đặc hiệu Abeta và liên kết với vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó) bằng tác nhân khử, như dithiothreitol. Hơn nữa, Fab' có thể được sản xuất bằng cách xen ADN mã hóa Fab' của kháng thể này vào trong vector biểu hiện tế bào tiền nhân hoặc vector biểu hiện tế bào có nhân và đưa vector này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện Fab'.

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể chuỗi đơn", "chuỗi đơn Fv" hoặc "scFv" đề cập đến phân tử chứa khu vực biến đổi chuỗi nặng kháng thể (hoặc vùng; VH) được nối với khu vực biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc vùng; VL)

bằng đoạn nối. Phân tử scFv này có công thức chung NH₂-VL-đoạn nối-VH-COOH hoặc NH₂-VH-đoạn nối-VL-COOH. Đoạn nối thích hợp trong ngành bao gồm trình tự axit amin GGGGS lặp lại hoặc biến thể của nó, ví dụ, biến thể có 1-4 đoạn lặp lại (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). Các đoạn nối khác mà có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả bởi Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106, Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 and Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.* scFv theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: thu cADN mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu Abeta người và liên kết với vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó, xây dựng ADN mã hóa scFv, xen ADN này vào trong vector biểu hiện tế bào tiền nhân hoặc vector biểu hiện tế bào có nhân, và sau đó đưa vector biểu hiện này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện scFv này.

Như được sử dụng ở đây, diabody là mảnh kháng thể trong đó scFv được dimer hóa, và nó là mảnh kháng thể có hoạt tính gắn kết kháng nguyên hóa trị hai. Trong hoạt tính gắn kết kháng nguyên hóa trị hai này, hai kháng nguyên này có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Diabody theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: thu cADN mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu Abeta người và liên kết với vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó, xây dựng ADN mã hóa scFv sao cho chiều dài của đoạn nối peptit này là 8 gốc axit amin hoặc ít hơn, xen ADN này vào trong vector biểu hiện tế bào tiền nhân hoặc vector biểu hiện tế bào có nhân, và sau đó đưa vector biểu hiện vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện diabody này.

Như được sử dụng ở đây, dsFv thu được bằng cách thay thế một gốc axit amin trong mỗi VH và VL bằng gốc cystein, và sau đó nối các polypeptit được thế này thông qua liên kết disulfua giữa hai gốc cystein. Các gốc axit amin được thay thế bằng gốc cystein có thể được chọn lọc dựa trên dự đoán cấu trúc ba chiều của kháng thể theo các phương pháp đã biết (*Protein Engineering*, 7, 697 (1994)). dsFv theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: thu cADN mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu Abeta người và liên kết với vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó, xây dựng ADN mã hóa dsFv, xen ADN này vào trong vector biểu hiện tế bào tiền nhân hoặc vector biểu hiện tế bào có nhân, và sau đó đưa vector biểu hiện này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện dsFv này.

Như được sử dụng ở đây, peptit chứa CDR được xây dựng từ một hoặc nhiều vùng CDR VH hoặc VL. Peptit chứa một vài CDR có thể được nối trực

tiếp hoặc thông qua đoạn nối peptit thích hợp. Peptit chứa CDR theo sáng chế có thể được sản xuất bằng các bước sau: xây dựng ADN mã hóa VH và VL của kháng thể đơn dòng theo sáng chế mà nhận biết đặc hiệu Abeta người và liên kết với vùng ngoại bào hoặc cấu trúc ba chiều của nó, xen ADN này vào trong vector biểu hiện tế bào tiền nhân hoặc vector biểu hiện tế bào có nhân, và sau đó đưa vector biểu hiện này vào trong tế bào tiền nhân hoặc tế bào có nhân để biểu hiện peptit này. Peptit chứa CDR có thể cũng được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học như phương pháp Fmoc hoặc phương pháp tBoc.

Như được sử dụng ở đây, "CDR" đề cập đến một trong số sáu vùng siêu biến có trong khu vực biến đổi kháng thể mà chủ yếu góp phần vào gắn kết kháng nguyên. Một trong những định nghĩa được sử dụng thông thường nhất về 6 CDR được cung cấp bởi Kabat EA et al. ((1991) Các trình tự của protein có lợi ích về miễn dịch. NIH Publication 91-3242). Như được sử dụng ở đây, định nghĩa Kabat cho CDR được áp dụng cho CDR1, CDR2, và CDR3 của khu vực biến đổi chuỗi nhẹ (CDR L1, CDR L2, CDR L3 hoặc L1, L2, L3), và CDR2 và CDR3 của khu vực biến đổi chuỗi nặng (CDR H2, CDR H3 hoặc H2, H3).

Như được sử dụng ở đây, "khung kháng thể" đề cập đến một phần của khu vực biến đổi, VL hoặc VH, mà làm khung cho các vòng gắn kết kháng nguyên (CDR) của khu vực biến đổi này. Đặc biệt là, nó là khu vực biến đổi không có CDR.

Như được sử dụng ở đây, "epitop" hoặc "thể xác định kháng nguyên" hoặc "epitop kháng nguyên" đề cập đến vị trí trên kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với globulin miễn dịch hoặc kháng thể (ví dụ, vị trí đặc hiệu trên phân tử Abeta). Các epitop thường bao gồm ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 axit amin liền nhau hoặc không liền nhau trong cấu hình bậc bốn duy nhất. (Xem, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, ed. G. E. Morris (1996)).

Như được sử dụng ở đây, "liên kết đặc hiệu với", "liên kết chọn lọc với", "được liên kết chọn lọc với" hoặc "được liên kết đặc hiệu với" đề cập đến liên kết của kháng thể với epitop xác định trước trên kháng nguyên. Điển hình là, kháng thể này liên kết với ái lực (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M, ví dụ, ít hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn.

Như được sử dụng ở đây, "KD" hoặc "Kd" đề cập đến hằng số cân bằng phân ly cho tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể. Thông thường, kháng thể theo sáng chế liên kết với Abeta người với hằng số cân bằng phân ly (KD) nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M, ví dụ, nhỏ hơn khoảng 10^{-8} M, 10^{-9} M hoặc 10^{-10} M hoặc thậm chí nhỏ hơn, ví dụ, như được xác định bằng Công nghệ cộng hưởng plasma bề mặt (SPR) trong thiết bị Biacore T200.

Như được sử dụng ở đây, "liên kết cạnh tranh" và "được liên kết cạnh tranh với" đề cập đến kháng thể nhận biết và liên kết với eptiop giống nhau (cũng được gọi là thể xác định kháng nguyên) hoặc một phần của eptiop giống nhau trên Abeta người là kháng thể đơn dòng trong số các kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Kháng thể liên kết với eptiop giống nhau là các kháng thể đơn dòng theo sáng chế đề cập đến kháng thể nhận biết và liên kết với trình tự axit amin Abeta người mà được nhận biết bởi các kháng thể đơn dòng theo sáng chế.

Khi thuật ngữ "cạnh tranh" được sử dụng trong phạm vi của các protein gắn kết kháng nguyên (ví dụ, trung hòa các protein gắn kết kháng nguyên hoặc trung hòa các kháng thể) mà cạnh tranh với eptiop giống nhau, nghĩa là cạnh tranh xảy ra giữa các protein gắn kết kháng nguyên, mà được xác định bằng các thử nghiệm trong đó protein gắn kết kháng nguyên được thử nghiệm (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh có chức năng miễn dịch của nó) ngăn ngừa hoặc ức chế (ví dụ, làm giảm) liên kết đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu (ví dụ, phối tử hoặc kháng thể tham chiếu) với kháng nguyên thông thường (ví dụ, kháng nguyên PD-L1 hoặc mảnh của nó). Một số loại thử nghiệm liên kết cạnh tranh là sẵn có để xác định liệu protein gắn kết kháng nguyên có cạnh tranh với protein khác. Các thử nghiệm này là, ví dụ, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch (radioimmunoassay-RIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm miễn dịch (immunoassay-EIA) enzym trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm cạnh tranh kẹp (xem ví dụ, Stahl et al, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem ví dụ, Kirkland et al, 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619), thử nghiệm đánh dấu trực tiếp pha rắn, thử nghiệm kẹp đánh dấu trực tiếp pha rắn (xem ví dụ, Harlow và Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA đánh dấu trực tiếp pha rắn với chất đánh dấu I-125 (xem ví dụ, Morel et al, 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem ví dụ, Cheung, et al, 1990, *Virology* 176: 546-552); và RIA đánh dấu trực tiếp (Moldenhauer et al, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). Thông thường, thử nghiệm bao gồm sử dụng kháng nguyên tinh chế có khả năng gắn kết với bề mặt rắn hoặc tế bào được nạp cả hai protein gắn kết kháng nguyên thử nghiệm không đánh dấu và protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu được đánh dấu. Ước chế cạnh tranh được xác định bằng cách đo khối lượng đánh dấu liên kết với bề mặt rắn hoặc với tế bào có mặt trong protein gắn kết kháng nguyên thử nghiệm. Thông thường, protein gắn kết kháng nguyên thử nghiệm có với lượng dư. Các protein gắn kết kháng nguyên được xác định bằng thử nghiệm cạnh tranh (cạnh tranh với protein gắn kết kháng nguyên) bao gồm: các protein gắn kết kháng nguyên liên kết với eptiop giống nhau là protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu; và các protein gắn kết kháng

nguyên liên kết với epitop mà đủ gần với epitop mà gắn kết với protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu, trong đó hai epitop gây cản trở về mặt không gian với nhau để cản trở liên kết này. Chi tiết bổ sung về các phương pháp xác định liên kết cạnh tranh được cung cấp trong các ví dụ ở đây. Thông thường, khi protein gắn kết kháng nguyên cạnh tranh có với lượng dư, nó sẽ ức chế (ví dụ, làm giảm) ít nhất 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% hoặc 75% hoặc thậm chí cao hơn của liên kết đặc hiệu của protein gắn kết kháng nguyên tham chiếu với kháng nguyên thông thường. Trong một số trường hợp, liên kết này bị ức chế ít nhất 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, hoặc 97% hoặc thậm chí cao hơn.

Như được sử dụng ở đây, "phân tử axit nucleic" đề cập đến các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi đôi, nhưng ưu tiên là ADN sợi đôi. Axit nucleic được "liên kết hoạt động" khi nó được đặt vào trong mối quan hệ chức năng với trình tự nucleic khác. Ví dụ, gen khởi đầu hoặc gen tăng cường được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa nếu nó ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự này.

Như được sử dụng ở đây, "vector" đề cập đến phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà đã được liên kết với. Trong một phương án, vector là "plasmid," đề cập đến vòng ADN sợi đôi dạng vòng bên trong đó có thể được nối các đoạn ADN bổ sung. Theo phương án khác, vector là vector virus, trong đó đoạn ADN bổ sung này có thể được nối vào trong hệ gen virus. Các vector được bộc lộ ở đây có khả năng tự sao chép bên trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, các vector vi khuẩn có điểm bắt đầu sao chép của vi khuẩn và vector động vật có vú episom), hoặc có thể được xen vào trong hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào trong tế bào chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với hệ gen tế bào chủ (ví dụ, vector động vật có vú không phải episom).

Như được sử dụng ở đây, "tế bào chủ" đề cập đến tế bào đã được đưa vào trong đó vector biểu hiện. Tế bào chủ có thể bao gồm tế bào vi khuẩn, vi sinh vật, thực vật hoặc động vật. Vi khuẩn có thể dễ dàng được biến nạp bao gồm các vi khuẩn thuộc enterobacteriaceae, như *Escherichia coli* hoặc chủng *Salmonella*; *Bacillaceae* như *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* và *Haemophilus influenzae*. Các vi sinh vật thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*. Dòng tế bào chủ động vật thích hợp bao gồm CHO (Dòng tế bào trứng chuột hamster Trung Quốc) và các tế bào NS0.

Các phương pháp sản xuất và tinh chế các kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên được biết nhiều trong ngành, ví dụ, A Laboratory Manual for Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, chương 5-8 và 15. Ví dụ, chuột có thể được gây miễn dịch bằng Abeta

người hoặc các mảnh của nó, và các kháng thể thu được có thể sau đó được hồi tính, tinh chế và phân tích trình tự các trình tự axit amin bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường được biết trong ngành. Mảnh gắn kết kháng nguyên có thể cũng được điều chế bằng các phương pháp thông thường. Các kháng thể hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được cải biến di truyền để chứa một hoặc nhiều vùng khung người và các CDR có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người. Các trình tự dòng mầm FR người có thể thu được từ ImMunoGeneTics (IMGT) thông qua trang web của họ <http://imgt.cines.fr>, hoặc từ The Immuglobulin Facts Book, 2001, ISBN 012441351, bằng cách sắp xếp thẳng hàng dựa trên cơ sở dữ liệu gen dòng mầm vùng biến đổi kháng thể người IMGT và sử dụng phần mềm MOE.

Các kháng thể được cải biến di truyền hoặc các mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được điều chế và tinh chế sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ, các trình tự cADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được tách dòng đơn tính và được đưa vào trong vectơ biểu hiện GS. Các vectơ biểu hiện globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể sau đó được chuyển nhiễm ổn định vào trong tế bào may CHO. Là phương pháp được giới thiệu thêm nữa được biết trong ngành, hệ thống biểu hiện động vật có vú sẽ dẫn đến sự glycosyl hóa, thường ở các vị trí đầu tận cùng N bảo thủ cao trong vùng Fc. Thu được các dòng đơn tính ổn định biểu hiện kháng thể liên kết đặc hiệu với **Abeta** người. Các dòng dương tính có thể được nhân lên trong môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh trong các thiết bị phản ứng sinh học để sản xuất kháng thể. Môi trường nuôi cấy mà đã được tiết vào trong đó kháng thể có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, tinh chế bằng cách thực hiện trên cột FF Protein A hoặc G Sepharose mà đã được cải biến bằng đệm. Các thành phần liên kết không đặc hiệu được rửa bỏ. Kháng thể liên kết được rửa giải bằng gradient pH và các mảnh kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE, và sau đó gom lại. Các kháng thể có thể được lọc và cô đặc sử dụng các kỹ thuật chung. Các sự kết tụ hòa tan và các multimer có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật chung, như sự loại trừ kích cỡ hoặc trao đổi ion. Sản phẩm thu được sau đó được đông lạnh ngay lập tức, ví dụ ở -70°C , hoặc có thể được làm khô lạnh.

Như được sử dụng ở đây, “đột biến” bao gồm nhưng không bị giới hạn đến “đột biến hồi phục”, “đột biến bảo toàn” hoặc “sự thế hoặc thay thế bảo toàn”. Như được sử dụng ở đây, “đột biến bảo toàn” hoặc “sự thế hoặc thay thế bảo toàn” đề cập đến sự thay thế bằng axit amin khác có các đặc điểm tương tự (ví dụ sự tích điện, kích thước chuỗi bên, tính kỵ nước/tính ưa nước, cấu hình và độ mềm dẻo của khung v.v...) cho axit amin trong protein, sao cho các sự thay đổi có thể được xảy ra sau đó không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein này.

Chuyên gia trong ngành nhận thấy rằng nhìn chung, một sự thay thế axit amin trong các vùng không quan trọng của polypeptit không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học (xem ví dụ, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Ngoài ra, sự thay thế bằng axit amin tương tự có cùng cấu trúc hoặc chức năng là ít có khả năng phá vỡ hoạt tính sinh học.

"Trình tự đột biến" được đề cập trong sáng chế đề cập đến trình tự nucleotit và trình tự axit amin có các phần trăm trình tự giống khác nhau với các trình tự theo sáng chế, sau khi thay đổi trình tự nucleotit và trình tự axit amin theo sáng chế bằng sự thay thế, sự xen vào hoặc sự bỏ bớt thích hợp. Trình tự giống được mô tả trong sáng chế có thể ít nhất là 85%, 90% hoặc 95%, ưu tiên là ít nhất 95%. Các ví dụ không giới hạn bao gồm 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%. So sánh trình tự và xác định phần trăm giống giữa hai trình tự có thể được thực hiện sử dụng thuật toán BLASTN/BLASTP có các sự bố trí mặc định sẵn có trên trang web của Trung tâm viện nghiên cứu công nghệ sinh học quốc gia (National Center For Biotechnology Institute).

Như được sử dụng ở đây, "sự tương đồng" hoặc "sự tương tự" hoặc "sự nhất quán" đề cập đến sự tương tự về trình tự giữa hai trình tự polynucleotit hoặc giữa hai trình tự polypeptit. Khi vị trí trong cả hai chuỗi được so sánh được chiếm vị trí bởi bazơ tương tự hoặc dưới đơn vị monome axit amin, ví dụ, nếu vị trí trong mỗi phân tử trong số hai phân tử ADN được chiếm giữ bằng adenin, thì các phân tử này là tương đồng ở vị trí này. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là hàm của số các vị trí tương ứng hoặc tương đồng cùng có giữa hai chuỗi chia cho số vị trí được so sánh và sau đó nhân với 100. Ví dụ, nếu 6 trong số 10 vị trí giữa hai chuỗi được so sánh hoặc tương đồng khi các trình tự này được duỗi thẳng tối ưu, thì hai trình tự có 60% độ tương đồng; nếu 95 trong số 100 vị trí trong hai chuỗi được so sánh hoặc tương đồng thì hai chuỗi này có 95% độ tương đồng. Nhìn chung, so sánh được thực hiện khi hai trình tự được duỗi thẳng để thu được phần trăm tương đồng tối đa.

"Ngoại sinh" được đề cập trong sáng chế đề cập đến các chất được tạo ra bên ngoài các sinh vật, các tế bào hoặc người tùy theo hoàn cảnh. "Nội sinh" đề cập đến các chất được tạo ra trong tế bào, sinh vật hoặc cơ thể người tùy theo hoàn cảnh.

Như được sử dụng ở đây, "tế bào," "dòng tế bào," và "dịch nuôi tế bào" được sử dụng hoán đổi cho nhau và tất cả sự chỉ định này bao gồm cùng dòng. Do đó, các từ "thể biến nạp" và "tế bào được biến nạp" bao gồm các tế bào ban đầu và dịch nuôi cấy là thể hệ sau từ các tế bào này không kể đến số lần cấy

truyền. Cũng nên được hiểu rằng tất cả các tế bào thể hệ sau này có thể không giống nhau một cách chính xác về thành phần ADN, do các đột biến chủ định hoặc ngẫu nhiên. Thể hệ sau đột biến mà có chức năng và hoạt tính sinh học giống nhau như chức năng và hoạt tính sinh học trong tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm. Trong đó các chỉ định riêng nhằm để sẽ được hiểu rõ ràng từ bối cảnh này.

Như được sử dụng ở đây, "phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction)" hoặc "PCR" đề cập đến quy trình hoặc kỹ thuật trong đó khối lượng nhỏ phân cụ thể axit nucleic, ARN và/hoặc ADN, được khuếch đại như được mô tả trong, ví dụ, U.S. Pat. No. 4,683,195. Nhìn chung, thông tin về trình tự ở các đầu mút của hoặc bên ngoài vùng quan tâm cần sẵn có, như các đoạn môi oligonucleotit có thể được thiết kế; các đoạn môi này sẽ là giống hoặc tương tự trong trình tự với các sợi đối diện của khuôn cần được khuếch đại. Các nucleotit của đầu tận cùng 5' của hai đoạn môi có thể trùng với các đầu tận cùng của nguyên liệu được khuếch đại. PCR có thể được sử dụng để khuếch đại các trình tự ARN cụ thể, các trình tự ADN cụ thể từ tổng ADN hệ gen, và cADN được phiên mã từ ARN tế bào tổng cộng, thực khuẩn thể hoặc trình tự plasmid, v.v... Thông thường xem Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). Thử nghiệm PCR được sử dụng trong sáng chế được xem là một, nhưng không chỉ là ví dụ về phương pháp polymeraza để khuếch đại mẫu axit nucleic thử nghiệm. Phương pháp này bao gồm sử dụng các trình tự axit nucleic đã biết làm các môi và polymeraza axit nucleic để khuếch đại hoặc tạo ra phân cụ thể của axit nucleic.

Như được sử dụng ở đây, "dược phẩm" đề cập đến hỗn hợp chứa một hoặc nhiều hợp chất theo sáng chế hoặc muối được dụng/dược lý hoặc tiền dược chất của nó và các thành phần hóa học khác, như chất mang được dụng/dược lý và các tá dược. Dược phẩm nhằm để thúc đẩy dùng cho sinh vật, làm dễ dàng hấp thụ hoạt chất và nhờ đó tạo ra hiệu quả sinh học.

Như được sử dụng ở đây, "điều trị" nghĩa là dùng bên ngoài hoặc bên trong dược chất, như chế phẩm chứa bất kỳ trong số các hợp chất gắn kết theo sáng chế, cho người bệnh có một hoặc nhiều triệu chứng bệnh mà tác nhân này có hoạt tính điều trị đã biết. Thông thường, tác nhân này được dùng với khối lượng hữu hiệu để làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng bệnh ở người bệnh hoặc quần thể cần được điều trị, dù bằng cách làm giảm sự tiến triển hoặc ức chế tiến trình của (các) triệu chứng này ở mức độ có thể đo được về mặt lâm sàng bất kỳ. Khối lượng hoạt chất hữu hiệu để làm thuyên giảm triệu chứng bệnh cụ thể bất kỳ (cũng được đề cập đến là "khối lượng cho hiệu quả điều trị") có thể thay đổi tùy

theo các yếu tố khác nhau như tình trạng bệnh, độ tuổi, và trọng lượng cơ thể của người bệnh, và khả năng của dược chất để gây ra đáp ứng mong muốn ở người bệnh. Dù triệu chứng bệnh đã được thuyên giảm có thể được đánh giá bằng phép đo lâm sàng bất kỳ thường được sử dụng bởi bác sĩ hoặc nhà cung cấp dịch vụ chăm sóc sức khỏe có chuyên môn khác để đánh giá độ nghiêm trọng hoặc tình trạng tiến triển của triệu chứng này. Trong khi phương án theo sáng chế (ví dụ, phương pháp điều trị hoặc vật phẩm sản xuất) có thể là không hữu hiệu để làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh đích ở từng người bệnh, nên làm thuyên giảm (các) triệu chứng bệnh đích ở một số người bệnh đáng kể có ý nghĩa thống kê như được xác định bởi thử nghiệm thống kê bất kỳ đã biết trong ngành như thử nghiệm t Student, thử nghiệm chi-square, thử nghiệm U theo Mann và Whitney, thử nghiệm Kruskal-Wallis (thử nghiệm H), thử nghiệm Jonckheere-Terpstra và thử nghiệm Wilcoxon.

Như được sử dụng ở đây, "khối lượng hiệu quả" bao hàm khối lượng thích hợp để làm thuyên giảm hoặc ngăn ngừa triệu chứng hoặc dấu hiệu của tình trạng bệnh. Khối lượng hiệu quả cũng có nghĩa khối lượng thích hợp để cho phép hoặc dễ dàng chẩn đoán. Khối lượng hữu hiệu cho người bệnh cụ thể hoặc đối tượng thú y có thể thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như tình trạng cần được điều trị, tình trạng sức khỏe chung của người bệnh, đường và liều lượng dùng và độ nghiêm trọng của các tác dụng phụ. Khối lượng hữu hiệu có thể là liều dùng tối đa hoặc quy trình phân liều để tránh các tác dụng phụ hoặc tác dụng gây độc đáng kể.

Như được sử dụng ở đây, "dùng" hoặc "điều trị," khi được áp dụng cho động vật, người, đối tượng thí nghiệm, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học, đề cập đến sự tiếp xúc của tác nhân hoặc chế phẩm chẩn đoán, điều trị hoặc y tế ngoại vi với động vật, người, đối tượng, tế bào, mô, cơ quan, hoặc dịch sinh học. "Dùng" hoặc "điều trị" có thể đề cập đến, ví dụ, cho phương pháp điều trị, dược động học, chẩn đoán, nghiên cứu và thí nghiệm. Điều trị tế bào bao gồm tiếp xúc chất phản ứng với tế bào, cũng như tiếp xúc chất phản ứng với dịch, trong đó dịch này tiếp xúc với tế bào. "Dùng" hoặc "điều trị" cũng có nghĩa là điều trị *in vitro* hoặc *ex vivo*, ví dụ, tế bào bằng chất phản ứng, chế phẩm chẩn đoán, liên kết, hoặc với tế bào khác. "Điều trị", khi áp dụng cho người, đối tượng thú y hoặc nghiên cứu, đề cập đến điều trị chữa trị, biện pháp phòng bệnh hoặc ngăn ngừa, các ứng dụng nghiên cứu và chẩn đoán.

Như được sử dụng ở đây, "bệnh hoặc rối loạn gây ra bởi Abeta" đề cập đến bệnh hoặc rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến β -amyloid, bao gồm nhưng không giới hạn đến bệnh và rối loạn gây ra bởi sự có mặt hoặc hoạt tính của β -amyloid bao gồm Abeta monome, hoặc tiền sợi, hoặc các polyme, hoặc sự kết

hợp bất kỳ của chúng, ví dụ, bệnh thoái hóa thần kinh (ví dụ: bệnh Alzheimer, rối loạn nhận thức nhẹ, chứng mất trí, chứng sa sút trí tuệ thể Lewy, bệnh Parkinson, bệnh Pick, bệnh Bevac, v.v...), các bệnh về mắt khác nhau gây ra bởi sự lắng đọng β -amyloid (ví dụ, thoái hóa điểm vàng, bệnh thần kinh về mắt liên quan đến drusen, bệnh glôcôm, bệnh đục thủy tinh thể, v.v...).

Như được sử dụng ở đây, "bệnh thoái hóa thần kinh" bao gồm nhưng không bị giới hạn đến: bệnh Alzheimer, rối loạn nhận thức nhẹ, chứng mất trí, chứng sa sút trí tuệ thể Lewy, bệnh Parkinson, bệnh Pick, bệnh Bevac, bệnh mạch máu amyloid ưa đỏ Congo, bệnh mạch máu não tích tụ amyloid, hội chứng Down, ồ nhồi máu não, bệnh Huntington, bệnh Creutzfeldt-Jakob, hội chứng sa sút trí tuệ do AIDS, chứng trầm cảm, rối loạn lo âu, chứng ám ảnh, chứng liệt Bell, bệnh động kinh, viêm não, bệnh xơ cứng rải rải, rối loạn thần kinh cơ, rối loạn khối u thần kinh, khối u não, rối loạn thần kinh mạch bao gồm đột quỵ, rối loạn miễn dịch thần kinh, bệnh tai-thần kinh, chấn thương thần kinh bao gồm tổn thương tủy sống, đau bao gồm đau căn nguyên thần kinh, rối loạn thần kinh và thần kinh tâm thần học nhi khoa, rối loạn giấc ngủ, hội chứng Tourette, rối loạn nhận thức nhẹ, sa sút trí tuệ não mạch, ồ nhồi máu não, xơ nang, bệnh Gaucher và loạn vận động khác và các bệnh về hệ thần kinh trung ương.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được cung cấp để mô tả tiếp sáng chế nhưng không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các phương pháp thí nghiệm mà không chỉ định các điều kiện cụ thể trong các ví dụ theo sáng chế thường được thực hiện theo điều kiện thông thường, như Sambrook et al., Antibodies, Molecular Cloning, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; hoặc theo các điều kiện được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Các chất phản ứng mà không được chỉ định nguồn cụ thể là chất phản ứng sẵn có trên thị trường.

Ví dụ 1. Điều chế kháng nguyên Abeta

Các kháng nguyên Abeta được sử dụng trong các ví dụ và các ví dụ thử nghiệm theo sáng chế được tổng hợp bởi GL Biochem, GenScript hoặc Sigma, và sau đó được điều chế *in vitro* (xem bảng 1 chi tiết). Các kháng nguyên Abeta để sử dụng để gây miễn dịch là các tiền sợi A β 1-42 và A β 1-40 KLH; các kháng nguyên Abeta để sử dụng để sàng lọc là các sợi A β 1-40-BSA, huyền phù A β 1-40 DMSO, huyền phù A β 1-42-biotin DMSO, tiền sợi A β 1-42 và các sợi A β 1-42; các kháng nguyên Abeta để sử dụng để phát hiện là A β 1-42 monome và các sợi A β 1-42.

Trình tự axit amin của A β 1-40 được thể hiện trong trình tự nêu trong (SEQ ID NO:1): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV ;

Trình tự axit amin của A β 1-42 được thể hiện trong trình tự nêu trong (SEQ ID NO: 2):

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA .

A β 1-40 KLH và A β 1-40-BSA đề cập đến polypeptit A β 1-40 tổng hợp được nối tương ứng với KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) và BSA (Bovine Serum Albumin-albumin huyết thanh bò), trong đó A β 1-40 được sử dụng được kết hợp với axit amin Cys ở đầu tận cùng N để thuận lợi cho việc nối và phát hiện;

Tiền sợi A β 1-42 đề cập đến polypeptit A β 1-42 được điều chế ở dạng tiền sợi *in vitro*.

Các sợi A β 1-40-BSA đề cập đến polypeptit A β 1-42 được nối với BSA được điều chế ở dạng sợi *in vitro*.

Huyền phù A β 1-40 DMSO đề cập đến dung dịch trong được điều chế bằng cách hòa tan trực tiếp polypeptit A β 1-42 trong DMSO (dimetyl sulfoxit).

Huyền phù A β 1-42-biotin DMSO đề cập đến dung dịch trong được điều chế bằng cách hòa tan trực tiếp polypeptit A β 1-42 có đuôi biotin trong DMSO (dimetyl sulfoxit).

Sợi A β 1-42 đề cập đến polypeptit A β 1-42 được điều chế ở dạng sợi *in vitro*.

A β 1-42 monome đề cập đến A β 1-42 monome.

Bảng 1. Các kháng nguyên Abeta để sử dụng để gây miễn dịch, sàng lọc và phát hiện, và phương pháp điều chế tương ứng của chúng

Sử dụng	Polypeptit	Nhà cung cấp và số Catalog	Phương pháp điều chế
Gây miễn dịch	Tiền sợi A β 1-42	GL Biochem 180231	Bột peptit A β được hòa tan trong NaOH 10mM (pH>10), lắc trong 2 phuts, bổ sung 10×PBS với thể tích bằng một phần mười thể tích NaOH để tạo ra nồng độ cuối cùng là 443 μ M. Dung dịch này được ủ ở 37°C qua đêm, và sau đó được pha loãng bằng PBS đến 50 μ M thu được các tiền sợi A β 1-42.
	A β 1-40 KLH	GL Biochem KLH-SH-CV-41 479311	Polypeptit này được hòa tan trực tiếp trong PBS thu được 1 mg/ml dung dịch.

Sàng lọc tế bào lai	Sợi A β 1-40-BSA	GL Biochem BSA-SH-CV-41 479311	Bột A β 1-40-BSA tổng hợp được hòa tan trong DMSO với 0,5 mg/10 μ l, và sau đó được pha loãng bằng 434 μ l nước đã loại bỏ ion. A β thu được được đặt ở 37°C trong 10 ngày thu được sợi A β 1-40-BSA.
	Huyền phù A β 1-40 DMSO	GL Biochem DV-40 82357	Polypeptit được hòa tan trực tiếp trong DMSO với 1mg/ml.
	Huyền phù A β 1-42-biotin DMSO	GL Biochem Bio-DA-42 212574	Polypeptit được hòa tan trực tiếp trong DMSO với 1mg/ml.
	Sợi A β 1-42	GL Biochem P160217-SY1 80231	Bột A β 1-42 tổng hợp được hòa tan trong DMSO với 0,5 mg/10 μ l, và sau đó được pha loãng bằng 434 μ l nước đã loại bỏ ion. A β thu được được đặt ở 37°C trong 10 ngày thu được sợi A β 1-42.
	Tiền sợi A β 1-42	GL Biochem 180231	Phương pháp điều chế là giống như phương pháp điều chế các tiền sợi A β 1-42 để sử dụng để gây miễn dịch.
Thử nghiệm ThT	A β 1-42 monome	GenScript RP10017	Bột polypeptit A β 1-42 tổng hợp được hòa tan trong đệm được làm lạnh trước (2 $\times$ PBS và NaOH 10mM, pH>10, được trộn với tỷ lệ 1:1(theo thể tích)) với nồng độ cuối cùng là 1mg/ml.
Thử nghiệm bảo vệ thần kinh	Sợi A β 1-42	GL Biochem P160427-SY5 07408	Bột A β 1-42 tổng hợp được hòa tan trong DMSO với 0,5 mg/10 μ l, và sau đó được pha loãng bằng 434 μ l nước đã loại bỏ ion. A β thu được được đặt ở 37 °C trong 10 ngày thu được sợi A β 1-42.
Thử nghiệm sự thực bào BV2		P160802-SY1 80231	
Thử nghiệm sự thực bào tiểu thần kinh đệm		P160802-SY1 80231	
Biacore	A β 1-42 monome	Sigma A 9810	Bột polypeptit A β 1-42 được hòa tan trong DMSO với nồng độ cuối cùng là 2mg/ml.

	Sợi A β 1-42	GL Biochem, P160217-SY1 80231 và P160802-SY1 80231	Bột A β 1-42 tổng hợp được hòa tan trong DMSO với 0,5 mg/10 μ l, và sau đó được pha loãng bằng 434 μ l nước đã loại bỏ ion. A β thu được được đặt ở 37 °C trong 10 ngày thu được sợi A β 1-42.
--	--------------------	--	--

Ví dụ 2. Điều chế kháng thể đơn dòng tế bào lai kháng Abeta người

1. Gây miễn dịch

Kháng thể đơn dòng kháng Abeta người được sản xuất bằng cách gây miễn dịch chuột. Chuột trắng SJL, cái, 6-8 tuần tuổi được sử dụng cho thí nghiệm (Beijing Vital River Experimental Animal Technology Co., Ltd., số li-xăng sản xuất động vật: SCXK (Beijing) 2012-0001). Môi trường cho ăn: mức SPF. Sau khi mua chuột, chúng được giữ trong môi trường phòng thí nghiệm trong 1 tuần, chu trình sáng/tối 12/12 giờ, ở nhiệt độ 20-25°C; độ ẩm là 40-60%. Sau đó chuột được gây miễn dịch theo các quy trình sau. Các kháng nguyên để gây miễn dịch là A β 1-40-K LH và các tiền sợi A β 1-42.

Sơ đồ gây miễn dịch 1: Tá được sử dụng để gây miễn dịch là QuickAntib ody-Mouse3W (Beijing Kangbiquan Biotechnology Co., Ltd. Cat No. KX0210042). Tỷ lệ của kháng nguyên với tá được (QuickAntibody-Mouse3W) là 1:1, 10 μ g/chuột/lần. Kháng nguyên và tá được được trộn kỹ và được sử dụng để tiêm chủng ngừa vào ngày 0, 7, 14, 21, 28, 35 và 42. Vào ngày 0, chuột được tiêm trong cơ (injected intramuscularly-IM) ở chân sau bằng 10 μ g/con chuột kháng nguyên được trộn. Gây miễn dịch lần thứ nhất được lặp lại vào ngày 7, 14, 21, 28, 35 và 42, và tương tự chuột được tiêm trong cơ (IM) ở chân sau bằng 10 μ g/con chuột kháng nguyên được trộn. Thu các mẫu máu vào ngày 19, 40 và 55, và chuẩn độ kháng thể trong huyết thanh chuột được xác định bằng phương pháp ELISA. Sau khi gây miễn dịch lần thứ bảy đến thứ tám, chuột có chuẩn độ kháng thể trong huyết thanh cao có xu hướng ổn định được chọn để dung hợp với tế bào lách. Ba ngày trước khi dung hợp với tế bào lách, dung dịch kháng nguyên được điều chế với nước muối được tiêm trong màng bụng (intraperitoneally injected-IP), 20 μ g/con chuột, để tăng cường tính sinh miễn dịch.

Sơ đồ gây miễn dịch 2: Tá được sử dụng để gây miễn dịch là QuickAntib ody-Mouse5W (Beijing Kangbiquan Biotechnology Co., Ltd. Cat No. KX021004). Tỷ lệ của kháng nguyên với tá được (QuickAntibody-Mouse5W) là 1:1, 25 μ g/chuột/lần (để gây miễn dịch lần thứ nhất) và 25 μ g/chuột/lần (để tăng cường tính sinh miễn dịch). Kháng nguyên và tá được được trộn kỹ và được sử dụng để tiêm chủng ngừa vào ngày 0, 14, 28, 42 và 56. Vào ngày 0, chuột được

tiêm trong cơ (IM) ở chân sau bằng 25 µg/con chuột kháng nguyên được trộn. Gây miễn dịch lần thứ nhất được lặp lại vào ngày 14, 28, 42 và 56, và tương tự chuột được tiêm trong cơ (IM) ở chân sau bằng 25 µg/con chuột kháng nguyên được trộn. Thu các mẫu máu vào ngày 20 và 49, và chuẩn độ kháng thể trong huyết thanh chuột được xác định bằng phương pháp ELISA. Sau khi gây miễn dịch lần thứ năm, chuột có chuẩn độ kháng thể trong huyết thanh cao có xu hướng ổn định được chọn để dung hợp với tế bào lách. Ba ngày trước khi dung hợp với tế bào lách, dung dịch kháng nguyên được điều chế với nước muối được tiêm trong màng bụng (IP), 50 µg/con chuột, để tăng cường tính sinh miễn dịch.

2. Dung hợp với tế bào lách

Các tế bào lai thu được bằng cách dung hợp lympho bào lách với tế bào u tủy Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) bằng cách sử dụng quy trình dung hợp qua trung gian PEG tối ưu. Các tế bào lai được dung hợp được tái tạo huyền phù trong môi trường hoàn chỉnh (môi trường DMEM chứa 20% FBS, 1×HAT, 1×OPI) với mật độ $0,5-1 \times 10^6/\text{ml}$, được nhân lên trong đĩa 96 lỗ với 100 µl/lỗ, ủ ở 37°C và 5% CO₂ trong 3-4 ngày, được bổ sung 100µl/lỗ môi trường hoàn chỉnh HAT, và được nuôi trong 3-4 ngày cho tới khi hình thành các dòng tế bào giống hình kim. Loại bỏ phần nổi, bổ sung 200µl/lỗ môi trường hoàn chỉnh HT (môi trường RPMI-1640 chứa 20% FBS, 1×HT và 1×OPI), ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 3 ngày và sau đó được đưa đến cho phát hiện ELISA.

3. Sàng lọc các tế bào lai

10-11 ngày sau khi dung hợp, theo mật độ sinh trưởng tế bào, thử nghiệm liên kết ELISA (cũng được biết là thử nghiệm hấp thụ miễn dịch được nối với enzym) được thực hiện trên phần nổi dịch nuôi cấy dòng đơn tính với các dạng khác nhau polypeptit Aβ để sàng lọc sơ bộ, để phân loại các kiểu phụ của các dòng tế bào lai thu được. Sợi Aβ1-40-BSA, huyền phù Aβ1-42 biotin DMSO và huyền phù Aβ1-40 DMSO được sử dụng để sàng lọc các tế bào lai với Aβ1-40-KLH là chất gây miễn dịch; và các tiền sợi Aβ1-42, các sợi Aβ1-42 và huyền phù Aβ1-42-biotin DMSO được sử dụng để sàng lọc các tế bào lai với tiền sợi Aβ1-42 là chất gây miễn dịch. Đối với các lỗ dương tính, thay đổi môi trường và nhân lên vào đĩa 24-lỗ theo mật độ tế bào. Các dòng tế bào được chuyển vào trong đĩa 24 lỗ được thử nghiệm lại và sau đó được tách dòng phụ cho lần thứ nhất. Một số tế bào dương tính được sàng lọc trong tách dòng phụ thứ nhất được bảo quản, và được sử dụng cho tách dòng phụ thứ hai. Một số tế bào dương tính được sàng lọc trong dòng phụ thứ hai được bảo quản, và được sử dụng để biểu hiện protein. Các tế bào lai có khả năng liên kết đặc hiệu với polypeptit Aβ được

thu từ nhiều sự dung hợp. Sau thử nghiệm huỳnh quang thioflavin (cũng được đề cập đến là ThT), thử nghiệm bảo vệ thần kinh và thử nghiệm thực bào đại thực bào, dòng đơn tính lai mAb-2401, mAb-3601, mAb-5101 và mAb-9001 thu được và được sử dụng để điều chế kháng thể bằng dịch nuôi cấy tế bào không chứa huyết thanh. Các kháng thể thu được được tinh chế theo ví dụ về tinh chế và các kháng thể tinh chế được sử dụng trong các ví dụ thử nghiệm.

4. Tinh chế các kháng thể tế bào lai và các kháng thể tái tổ hợp

Các mẫu phần nổi biểu hiện bởi các tế bào được ly tâm với tốc độ cao để loại bỏ tạp chất, và phần nổi được biểu hiện bởi tế bào lai được tinh chế bằng cột Protein G và phần nổi được biểu hiện bởi các kháng thể tái tổ hợp được tinh chế bằng cột Protein A. Rửa cột này bằng PBS (pH 7,4) cho tới khi số đọc A280 rơi xuống đường cơ sở. Các protein đích được rửa giải bằng axit axetic 100mM, pH3,0, và trung hòa bằng Tris-HCl 1M, pH8,0. Các mẫu được rửa giải được cô đặc thích hợp và sau đó được tinh chế tiếp bằng sắc ký gel Superdex200 (GE) cân bằng trước bằng PBS để loại bỏ các kết tụ. Các đỉnh monome được thu lại và được chia theo ước số để sử dụng.

5. Phân tích trình tự dòng tế bào lai dương tính

Các quy trình tách dòng đơn tính các trình tự từ khối tế bào lai dương tính là như sau. Các tế bào lai trong pha sinh trưởng loga được thu lại. ARN được chiết bằng Trizol (Invitrogen, Cat No. 15596-018) theo hướng dẫn của kit và được phiên mã ngược bằng kit PrimeScript™ Reverse Transcription (Takara, Cat No. 2680A). Khuếch đại cADN thu được bằng PCR sử dụng bộ Ig chuột-mồi (Novagen, TB326 Rev. B 0503), và đọc trình tự bởi công ty. Các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) kháng thể chuột và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của các dòng tế bào lai mAb-2401, mAb-3601, mAb-5101 và mAb-9001 được xác định như sau:

> mAb-2401 VH (SEQ ID NO: 3):

EVQLQQSV AELVRPGASVKLSCTASGFNIKNTYMHVVKORPEQGLEWIGRIDPTNGNTKYAPK
EKDKATIIADTSSNTGYLQLSSLTSEDTAIYYCARRVYYYDSTYNYWGQGTTLVSS

> mAb-2401VL (SEQ ID NO: 4):

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
VPDRFTGSGSRITDFTLTISNVQAEDLAVYYCQNDYNYPLTFGAGTKLELK

> mAb-3601 VH (SEQ ID NO: 5):

QATLKESGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNP
ALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDTADTATYYCARRPLGSYDYFDYWGQGTTTLTVSS

> mAb-3601 VL (SEQ ID NO: 6):

DVLMQTPTSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLOKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSRVPLTFGAGTKLELK

> mAb-5101 VH (SEQ ID NO: 7):

QVTLKESGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLTSGMGVSVWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDVSLYNPSL
KSRLTISKDASRNQVFLKITSVDTADSATYYCVRRRIITVVDAMDYWGQGTSTVTVSS

> mAb-5101 VL (SEQ ID NO: 8):

DVLMQTPTSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLOKSGQSPKLLIYKVS NRFS GVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCCQGSRVPTTFGGGKLEIK

> mAb-9001 VH (SEQ ID NO: 9):

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTFGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNP
ALKSRLTISKDTSKNQVFLKIAIVDTADIATYYCVRRGFHLGSRGDYFDHWWGQGTTLTVSS

> mAb-9001 VL (SEQ ID NO: 10):

DVLMQTPTSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLOKPGQSPKLLIYKVS NRFS GVPD
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSRVPLTFGAGTKLELK

Lưu ý: Trình tự axit amin vùng biến đổi của các kháng thể trên được trình bày là FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Các ký tự in nghiêng chỉ trình tự FR và các ký tự gạch chân chỉ các trình tự CDR.

Các trình tự axit amin của các vùng CDR của các kháng thể mAb-2401, mAb-3601, mAb-5101 và mAb-9001 được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2 Các trình tự axit amin vùng CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng Abeta

Kháng thể	Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ	
mAb-2401	HCDR 1	NTYMH SEQ ID NO: 11	LCDR 1	KSSQSLLNSGNQKN YLT SEQ ID NO: 14
	HCDR 2	RIDPTNGNTKYAPK FKD SEQ ID NO: 12	LCDR 2	WASTRES SEQ ID NO: 15
	HCDR 3	RVYYDYDSTYNY SEQ ID NO: 13	LCDR 3	QNDYNYPLT SEQ ID NO: 16
mAb-3601	HCDR 1	TFGMGVG SEQ ID NO: 17	LCDR 1	RSSQSIVHSNGNTY LE SEQ ID NO: 20
	HCDR 2	HIWWDDDKYYNP LKS SEQ ID NO: 18	LCDR 2	KVSNRFS SEQ ID NO: 21
	HCDR	RPLGSYDYFDY	LCDR	FQGSRVPLT

	3	SEQ ID NO: 19	3	SEQ ID NO: 22
mAb-5 101	HCDR 1	TSGMGVS SEQ ID NO: 23	LCDR 1	RSSQSIVHSNGNTY LE SEQ ID NO: 20
	HCDR 2	HIYWDDVSLYNPSL KS SEQ ID NO: 24	LCDR 2	KVSNRFS SEQ ID NO: 21
	HCDR 3	RRIITVVDAMDY SEQ ID NO: 25	LCDR 3	CQGSRVPPT SEQ ID NO: 26
mAb-9 001	HCDR 1	TFGMGVG SEQ ID NO: 17	LCDR 1	RSSQSIVHSNGNTY LE SEQ ID NO: 20
	HCDR 2	HIWWDDDKYYNPA LKS SEQ ID NO: 18	LCDR 2	KVSNRFS SEQ ID NO: 21
	HCDR 3	RGFHLGSRGDYFDH SEQ ID NO: 27	LCDR 3	FQGSRVPLT SEQ ID NO: 22

Ví dụ 3. Làm giống người kháng thể đơn dòng lai kháng Abeta người

Cấu trúc cổ điển được xác định theo trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể chuột. Trong số các trình tự dòng mầm người với cấu trúc tương tự, các trình tự này hầu như tương tự với các vùng không phải CDR của chuột (vùng khung) được chọn là các khuôn để làm phù hợp với người. Sau đó, các vùng CDR kháng thể chuột được ghép lên trên các khuôn chọn lọc để làm phù hợp với người để thay thế các vùng CDR người. Các đột biến hồi phục hoặc các đột biến điểm được tạo ra trên một số trình tự vùng FR như yêu cầu. Vùng biến đổi sau đó được kết hợp với (các) vùng hằng định người (như vùng hằng định IgG1 người) thu được các kháng thể kháng Abeta được làm giống người.

1. Làm giống người mAb-2401

Các khuôn để làm giống người chuỗi nặng kháng thể mAb-2401 là IGHV1-24*01 và hJh6.3. Đây là các vùng FR1, FR2 và FR3 từ chuỗi nặng dòng mầm người IGHV1-24 được chọn, và vùng JH6 của hJh6.3 được chọn là vùng FR4. Các khuôn cho chuỗi nhẹ là IGKV1-27*01 và hJk4.1. Đây là, FR1, FR2, và FR3 từ chuỗi nhẹ dòng mầm người IGKV1-27 được chọn, và vùng JK4 của hJk4.1 được chọn là vùng FR4.

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nặng dòng mầm người (IGHV1-24*01) được thể hiện trong (SEQ ID NO:28):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGF
DPEDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCAT

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm người (IGKV1-27*01) được thể hiện trong (SEQ ID NO: 29):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS TLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQKYN SAP

Vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm biến đổi giống người là như sau:

HAB-2401 được ghép VH (SEQ ID NO: 66):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTNTYMHWVRQAPGKGLEWMGRI
DPTNGNTKYAPKFKDRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATRVYYYDSTY
NYWGKGT TVTVSS

HAB-2401 được ghép VL (SEQ ID NO: 67):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGKVPKLL
IYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQNDYNYPLTFGGG TKV
EIK

Các vùng CDR kháng thể chuột được ghép lên trên khuôn làm phù hợp với người chọn lọc để thay thế các vùng CDR khuôn người, và đột biến hồi phục được tạo ra trên chuỗi nặng ở vị trí 1, 72 và 98 (đánh số trình tự tự nhiên, tương ứng với vị trí 1, 71 và 94 theo đánh số Kabat) (Q1E, E72A và T98R; Q1E, E71A, T94R theo đánh số Kabat), và sau đó kết hợp với vùng hằng định của IgG1 người thu được kháng thể được làm giống người HAB-2401.

Trình tự axit amin chuỗi nặng của HAB-2401 được thể hiện trong (SEQ ID NO: 30):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTNTYMHWVRQAPGKGLEWMGRIDPTN
GNTKYAPKFKDRVTMTADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCARRVYYYDSTYNYW
GKGT TVTVSSASTKGPSVFEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ của HAB-2401 được thể hiện trong (SEQ ID NO: 31):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGKVPKLLIYW
ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDVATYYCQNDYNYPLTFGGG TKVEIK

RTVAAPSVFIEPPSDEQLKSGTASVVCLLNFEYPREAKVOWKVDNALOSGNSO
ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

Lưu ý: Trong trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ HAB-2401 trên đây, các ký tự in nghiêng chỉ định trình tự FR, các ký tự gạch chân chỉ định trình tự CDR, các ký tự gạch chân kép chỉ định trình tự vùng hằng định.

2. Làm giống người mAb-3601

Các khuôn để làm giống người chuỗi nặng kháng thể mAb-3601 là IGHV3-30*01 và hjh6.3. Đây là các vùng FR1, FR2 và FR3 từ chuỗi nặng dòng mầm người IGHV3-30 được chọn, và vùng JH6 của hjh6.3 được chọn là vùng FR4. Các khuôn cho chuỗi nhẹ là IGKV1-39*01/hjk4.1. Đây là, FR1, FR2, và FR3 từ chuỗi nhẹ dòng mầm người IGKV1-39 được chọn, và vùng JK4 của hjk4.1 được chọn là vùng FR4.

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nặng dòng mầm người (IGHV3-30*01) được thể hiện trong (SEQ ID NO:32):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
 DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm người (IGKV1-39*01) được thể hiện trong (SEQ ID NO: 33):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

Vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ làm phù hợp với người là như sau:

HAB-3601 được ghép VH (SEQ ID NO: 68):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTFGMGVGVWRQAPGKGLEWVAH
IWWDDDKYYNPALKSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLGSYDYF
DYWGKGTTVTVSS

HAB-3601 được ghép VL (SEQ ID NO: 69):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSI VHSNGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIY
KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSRVPLTFGGGKVEIK

Các vùng CDR kháng thể chuột được ghép lên trên khuôn làm phù hợp với người chọn lọc để thay thế các vùng CDR người từ khuôn, các đột biến hồi phục được tạo ra trên chuỗi nặng ở vị trí 28 và 86 (đánh số trình tự tự nhiên, tương ứng với vị trí 28 và 82B theo đánh số Kabat) (T28A và S86T; T28A và S82B T theo đánh số Kabat), đột biến điểm được tạo ra trên chuỗi nặng ở vị trí 58 (đánh số trình tự tự nhiên) (D58N) để loại bỏ sự isome hóa axit aspartic tiềm tàng, và sau đó kết hợp với vùng hằng định của IgG1 người thu được kháng thể được làm giống người HAB-3601.

Trình tự axit amin chuỗi nặng của HAB-3601 được thể hiện trong (SEQ ID

NO: 34):

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSTFGMGVGVWRQAPGKGLEWVAHIW
WDDNKYYNPALKSRFTISRDN SKNTLYLQ MNTLRAEDTAVYYCARRPLGSYDYFD
YWGKGTTVTVSSASTKGPSVFELAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHE
ALHNHYTOKSLSLSPGK

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ của HAB-3601 được thể hiện trong (SEQ ID NO: 35):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKVS
NRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSRVPLTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIEPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSOES
VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

Lưu ý: Trong trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ HAB-3601 trên đây, các ký tự in nghiêng chỉ định trình tự FR, các ký tự gạch chân chỉ định trình tự CDR, và các ký tự gạch chân kép chỉ định trình tự vùng hằng định.

3. Làm giống người mAb-5101

Các khuôn để làm giống người chuỗi nặng kháng thể mAb-5101 là IGHV2-70D*04 và hJh6.1. Đây là, FR1, FR2 và FR3 từ chuỗi nặng dòng mầm người IGHV2-70D được chọn, và vùng JH6 của hJh6.1 được chọn là vùng FR4. Các khuôn cho chuỗi nhẹ là IGKV2-40*01 và hJk4.1. Đây là, FR1, FR2, và FR3 từ chuỗi nhẹ dòng mầm người IGKV2-40 được chọn, và vùng JK4 của hJk4.1 được chọn là vùng FR4.

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nặng dòng mầm người (IGHV2-70D*04) được thể hiện trong (SEQ ID NO:36):

QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMRVSWIRQPPGKALEWLARIDW
DDDKFYSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATATYYCARI

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm người (IGKV2-40*01) được thể hiện trong (SEQ ID NO: 37):

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIY
TLSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP

Vùng biến đổi được biến đổi giống người là như sau:

HAB-5101 được ghép VH (SEQ ID NO: 70):

QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIROPPGKALEWLAHIY
WDDVSLYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRRIITVVDAMD
YWGQGTITVTVSS

HAB-5101 được ghép VL (SEQ ID NO: 71):

DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCCQGSRPPTFGGGTKVEIK

Các vùng CDR kháng thể chuột được ghép lên trên khuôn làm phù hợp với người chọn lọc để thay thế các vùng CDR người từ khuôn, các đột biến hồi phục được tạo ra trên chuỗi nhẹ ở vị trí 2 và 50 (đánh số trình tự tự nhiên, tương ứng với vị trí 2 và 45 theo đánh số Kabat) (I2V và Q50K; I2V và Q45K theo đánh số Kabat), đột biến điểm được tạo ra trên chuỗi nhẹ ở vị trí 94 (đánh số trình tự tự nhiên) (C94S) để loại bỏ sự bắt cặp sai liên kết disulfua tiềm tàng, và sau đó kết hợp với vùng hằng định của IgG1 người thu được kháng thể được làm giống người HAB-5101.

Trình tự axit amin chuỗi nặng của HAB-5101 được thể hiện trong (SEQ ID NO: 38):

QVTLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIROPPGKALEWLAHIYWD
DVSLYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARRRIITVVDAMDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTPEAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ của HAB-5101 được thể hiện trong (SEQ ID NO: 39):

DVVMQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQGSRPPTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALOSGNSQES
VTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSENRGEC

Lưu ý: Trong các trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ HAB-5101 trên đây, các ký tự in nghiêng chỉ định trình tự FR, các ký tự gạch chân chỉ định trình tự CDR, và các ký tự gạch chân kép chỉ định trình tự vùng hằng định.

4. Làm giống người mAb-9001

Các khuôn để làm giống người chuỗi nặng kháng thể mAb-9001 là IGHV2-70D*04 và hgh6.1. Đó là, FR1, FR2 và FR3 từ chuỗi nặng dòng mầm

người IGHV2-70 được chọn, và vùng JH6 của hjh6.1 được chọn là vùng FR4. Các khuôn cho chuỗi nhẹ là IGKV2-40*01 và hjk2.1. Đó là, FR1, FR2, và FR3 từ chuỗi nhẹ dòng mầm người IGKV2-40 được chọn, và vùng JK2 của hjk2.1 được chọn là vùng FR4.

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nặng dòng mầm người (IGHV2-70D*04) được thể hiện trong (SEQ ID NO:36):

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMRVSWIRQPPGKALEWLARIDW
DDDKFYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARI

Trình tự axit amin của khuôn chuỗi nhẹ dòng mầm người (IGKV2-40*01) được thể hiện trong (SEQ ID NO: 37):

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLDSDDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIY
TLSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP

Các vùng biến đổi làm giống người là như sau:

HAB-9001 được ghép VH (SEQ ID NO: 72):

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGMGVGVIRQPPGKALEWLAHI
WWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARRGFHLGSR
GDYFDHWGOGTTVTVSS

HAB-9001 được ghép VL (SEQ ID NO: 73):

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSRVPLTFGQGTKLEIK

Các vùng CDR kháng thể chuột được ghép lên trên khuôn làm phù hợp với người chọn lọc để thay thế các vùng CDR người từ khuôn, đột biến hồi phục được tạo ra trên chuỗi nhẹ ở vị trí 2 (đánh số trình tự tự nhiên, tương ứng với vị trí 2 theo đánh số Kabat) (I2V), đột biến điểm được tạo ra trên chuỗi nặng ở vị trí 58 (đánh số trình tự tự nhiên) (D58N) để loại bỏ sự isome hóa axit aspartic tiềm tàng, và sau đó kết hợp với vùng hằng định của IgG1 người thu được kháng thể được làm giống người HAB-9001.

Trình tự axit amin chuỗi nặng của HAB-9001 được thể hiện trong (SEQ ID NO: 40):

QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGMGVGVIRQPPGKALEWLAHIWWD
DNKYYPALPKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARRGFHLGSRGDYF
DHWGOGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ của HAB-9001 được thể hiện trong (SEQ ID NO:

41):

DVVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSRVPLTFGQGTKLEIKRT
VAAPSVFIEPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Lưu ý: Trong các trình tự axit amin chuỗi nặng và nhẹ HAB-9001 trên đây, các ký tự in nghiêng chỉ định trình tự FR, các ký tự gạch chân chỉ định trình tự CDR, và các ký tự gạch chân kép chỉ định trình tự vùng hằng định.

Ngoài ra, đối với các trình tự vùng hằng định của kháng thể HAB-2401, HAB-3601, HAB-5101 và HAB-9001, trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 42, trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43, trình tự axit amin vùng biến đổi và các trình tự axit amin chiều dài hoàn chỉnh được thể hiện trong bảng dưới đây:

Bảng 3: Trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng Abeta được làm giống người

Kháng thể	Chuỗi nặng		Chuỗi nhẹ	
HAB-2401	Trình tự vùng biến đổi (VH)	SEQ ID NO: 44	Trình tự vùng biến đổi (VL)	SEQ ID NO: 45
	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (H)	SEQ ID NO: 30	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (L)	SEQ ID NO: 31
HAB-3601	Trình tự vùng biến đổi (VH)	SEQ ID NO: 46	Trình tự vùng biến đổi (VL)	SEQ ID NO: 47
	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (H)	SEQ ID NO: 34	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (L)	SEQ ID NO: 35
HAB-5101	Trình tự vùng biến đổi (VH)	SEQ ID NO: 48	Trình tự vùng biến đổi (VL)	SEQ ID NO: 49
	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (H)	SEQ ID NO: 38	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (L)	SEQ ID NO: 39
HAB-9001	Trình tự vùng biến đổi (VH)	SEQ ID NO: 50	Trình tự vùng biến đổi (VL)	SEQ ID NO: 51
	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (H)	SEQ ID NO: 40	Trình tự chiều dài hoàn chỉnh (L)	SEQ ID NO: 41
HAB-2401	HCDR1	SEQ ID NO: 11	LCDR1	SEQ ID NO: 14

	HCDR2	SEQ ID NO: 12	LCDR2	SEQ ID NO: 15
	HCDR3	SEQ ID NO: 13	LCDR3	SEQ ID NO: 16
HAB-360 1	HCDR1	SEQ ID NO: 17	LCDR1	SEQ ID NO: 20
	HCDR2	SEQ ID NO: 52	LCDR2	SEQ ID NO: 21
	HCDR3	SEQ ID NO: 19	LCDR3	SEQ ID NO: 22
HAB-510 1	HCDR1	SEQ ID NO: 23	LCDR1	SEQ ID NO: 20
	HCDR2	SEQ ID NO: 24	LCDR2	SEQ ID NO: 21
	HCDR3	SEQ ID NO: 25	LCDR3	SEQ ID NO: 53
HAB-900 1	HCDR1	SEQ ID NO: 17	LCDR1	SEQ ID NO: 20
	HCDR2	SEQ ID NO: 52	LCDR2	SEQ ID NO: 21
	HCDR3	SEQ ID NO: 27	LCDR3	SEQ ID NO: 22

Ví dụ 4. Điều chế kháng thể được làm giống người

1. Tách dòng phân tử kháng thể được làm giống người

Tối ưu hóa codon được thực hiện dựa trên trình tự kháng thể được làm giống người được thiết kế thu được các trình tự gen mã hóa codon ưu tiên người. Mảnh gen VH/VK của mỗi kháng thể được xây dựng bằng các mồi PCR được thiết kế, và sau đó được đưa vào trong vector biểu hiện pHr (mang peptit tín hiệu và mảnh gen vùng hằng định (CH1-FC/CL)) bằng sự tái tổ hợp khác loại để xây dựng plasmid biểu hiện chiều dài hoàn chỉnh kháng thể được làm giống người VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr. Các dòng đúng được thay đổi bằng cách phân tích trình tự, trong đó đối với HAB-2401, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 54, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 55; đối với HAB-3601, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 56, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57; đối với HAB-5101, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58, trình tự

nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 59; và đối với HAB-9001, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nặng được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 60, trình tự nucleotit mã hóa chuỗi nhẹ được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61.

2. Biểu hiện và tinh chế kháng thể được làm giống người

Các tế bào HEK293E được chuyển nhiễm plasmit tương ứng biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể với tỷ lệ 1:1.5. 6 ngày sau khi chuyển nhiễm, thu phần nổi biểu hiện, ly tâm ở tốc độ cao để loại bỏ tạp chất, và tinh chế bằng cột protein A. Cột này được rửa bằng PBS cho tới khi số đọc A280 rơi xuống đường cơ sở. Các protein đích được rửa giải bằng axit axetic 100mM, pH3,0, và trung hòa bằng Tris-HCl 1M, pH8.0. Các mẫu được rửa giải được cô đặc thích hợp và sau đó được tinh chế tiếp bằng sắc ký gel Superdex200 (GE) cân bằng trước bằng PBS để loại bỏ các kết tụ. Các đỉnh monome được thu lại và được chia đều ước số để sử dụng.

Hiệu suất và hiệu quả của sáng chế được thay đổi bằng các thử nghiệm sinh hóa sau hoặc thử nghiệm được học *in vivo*:

Ví dụ thử nghiệm 1. Ái lực của các kháng thể Abeta được phát hiện bằng thử nghiệm BIAcore

Ái lực của kháng thể với sợi A β 1-42 được phát hiện bằng phương pháp nổi amino. Các sợi A β 1-42 được nối với chip cảm biến sinh học CM5 (200 RU), và sau đó phân tử kháng thể được cho phép chảy qua bề mặt chip. Tín hiệu phản ứng được phát hiện theo thời gian thực bằng thiết bị Biacore T200 để tạo ra đường cong liên kết và phân ly. Khi kết thúc mỗi chu trình thí nghiệm, sau khi phân ly hoàn thành, chip cảm biến sinh học được rửa và tái tạo bằng 10 mM Glycine-HCl (pH 1,5). Kháng thể dương tính, Aducanumab, được điều chế theo thông tin trình tự về Aducanumab được đưa ra bởi WHO (xem WHO Drug Information, Vol. 28, No. 3, 2014), và phương pháp điều chế được mô tả trong Ví dụ 4 theo sáng chế.

Ái lực của kháng thể với A β 1-42 monome được phát hiện bằng cách bắt giữ kháng thể trên chip. IgG được bắt giữ ái lực trên chip cảm biến sinh học Protein A, và sau đó kháng nguyên A β 1-42 monome được cho phép chảy qua bề mặt chip. Tín hiệu phản ứng được phát hiện theo thời gian thực bằng thiết bị Biacore T200 để tạo ra đường cong liên kết và phân ly. Khi kết thúc mỗi chu trình thí nghiệm, sau khi phân ly hoàn thành, chip cảm biến sinh học được rửa và tái tạo bằng 10 mM Glycine-HCl (pH1,5).

Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 4. HAB-2401, HAB-5101,

HAB-3601 và HAB-9001 có ái lực với sợi A β 1-42 nằm trong khoảng từ 10^{-8} đến 10^{-10} M, trong số đó HAB-9001 có ái lực lớn nhất, xếp thứ hai về độ lớn mạnh hơn ái lực của Aducanumab. HAB-2401, HAB-5101, HAB-3601 và HAB-9001 có ái lực với A β 1-42 monome nằm trong khoảng từ 10^{-7} đến 10^{-8} M, trong số đó HAB-9001 có ái lực lớn nhất, xếp thứ hai về độ lớn mạnh hơn ái lực của Aducanumab. Tất cả bốn kháng thể thử nghiệm có ái lực mạnh hơn ái lực của kháng thể dương tính, Aducanumab.

Bảng 4. Ái lực của các kháng thể với sợi A β 1-42 và A β 1-42 monome

Kháng thể	Ái lực (M)	
	Sợi A β 1-42	A β 1-42 monome
Aducanumab	7,52E-08	3,20E-06
HAB-2401	1,17E-08	2,29E-07
HAB-5101	1,22E-09	3,33E-07
HAB-3601	5,45E-08	2,62E-07
HAB-9001	2,13E-10	2,79E-08

Ví dụ thử nghiệm 2 Hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta để ngăn chặn sự kết tụ của A β 1-42 monome thành sợi A β 1-42

Hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta để ức chế sự kết tụ của A β 1-42 monome thành các sợi A β 1-42 được phát hiện bằng thử nghiệm ThT. ThT (Thioflavin T, thioflavin) là loại thuốc nhuộm huỳnh quang và thường được sử dụng để xác định *in vitro* các sợi A β , làm các tín hiệu huỳnh quang ở bước sóng kích thích 450 nm và bước sóng phát là 482 nm sẽ được tăng cường đáng kể ngay khi nó kết hợp với protein giàu tấm β (như chất lắng đọng A β amyloid). Các quy trình thí nghiệm cụ thể của thử nghiệm ThT được chỉ định như sau. 0,5mg A β 1-42 người (GenScript, CAT#RP10017) được bổ sung vào trong 250 μ l NaOH 10mM, hòa tan hoàn toàn và sau đó được bổ sung vào trong thể tích tương đương 2 $\times$ PBS được làm lạnh trước để trung hòa. Dung dịch A β 1-42 monome với nồng độ 1mg/ml được điều chế và pha loãng bằng ddH₂O đến 0,25mg/ml. A β 1-42 monome (10 μ l/lỗ, 0,25mg/ml) được trộn với 20 μ M ThT (sigma, CAT#T3516) và được bổ sung vào trong đĩa 384 lỗ màu đen (Corning, CAT#4514), và lỗ không bổ sung A β 1-42 monome được làm đối chứng âm. Sau đó các kháng thể được pha loãng gradient (bắt đầu từ 1mg/ml, pha loãng gradient gấp 2-lần, 10 μ l/lỗ) được bổ sung vào trong hỗn hợp trên, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Các tín hiệu huỳnh quang được đọc ở bước sóng kích thích là 440 nm và bước sóng phát là 485nm bằng cách sử dụng máy đọc vi đĩa FlexStation3 (các thiết bị phân tử).

Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 1. Tất cả HAB-2401,

HAB-5101 và HAB-9001 có thể ức chế hiệu quả sự kết tụ của A β 1-42 monome thành sợi A β 1-42. Trong khi HAB-3601 và Aducanumab không có chức năng này.

Ví dụ thử nghiệm 3. Bảo vệ các kháng thể kháng Abeta đối với các neuron ban đầu của chuột rat

Vỏ não được cắt thành mảnh từ chuột rat bào thai SD có độ tuổi thai từ 16-18 ngày, được cắt bằng trypsin (Gibco, CAT#25200-072), hút bằng pipet và lọc vào trong huyền phù một tế bào, ly tâm và đếm. Các tế bào được pha loãng bằng DMEM (Gibco, CAT#10564-029) chứa 10% FBS (Gibco, CAT#10099-141) đến 1×10^4 cho mỗi lỗ (1×10^4 /lỗ), và dần vào trong đĩa 96 lỗ (Corning, CAT#3903) được phủ bằng PDL (Poly-D-lysine, polylysine) (Sigma, CAT#P0899). Sau khi ủ qua đêm trong thiết bị ủ (37°C , 5% CO_2), đổi môi trường này bằng Neurobasal (Gibco, CAT#21103049) + 2% B27 (Gibco, CAT#17504044), và đổi một nửa môi trường này sau 3-4 ngày. Vào ngày 8, 10 μM sợi A β 1-42 (GL biochem, CAT#53819) và bổ sung các nồng độ khác nhau kháng thể thử nghiệm. Sau khi ủ trong 3 ngày, 30 μl /lỗ Cell Titer-Glo (Promega, CAT#G7571) được bổ sung, và đọc đĩa này bằng máy đọc vi đĩa (PerkinElmer, Vector3) bằng phương pháp hóa huỳnh quang.

Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 2. HAB-2401, HAB-5101, HAB-3601, HAB-9001 và kháng thể dương tính Aducanumab có thể bảo vệ tế bào thần kinh sơ cấp khỏi sự gây độc của sợi A β , và hiệu quả phụ thuộc liều được quan sát trong giới hạn nồng độ từ 10 đến 100 $\mu\text{g/ml}$.

Ví dụ thử nghiệm 4. Các kháng thể kháng Abeta thúc đẩy sự thực bào sợi A β bởi các tế bào BV2

Các tế bào BV2 trong pha sinh trưởng loga (FuDan IBS Cell Center, FH0366) được lấy ra và được cắt bằng trypsin, ly tâm ở 800 vòng/phút trong 5 phút. Mật độ tế bào trong đĩa 24-lỗ được điều chỉnh bằng RPMI 1640 (chứa 10% FBS) đến $1,2 \times 10^5$ tế bào/lỗ/500 μl , lắc kỹ cho tới khi hình thành lớp tế bào đơn, và được đặt trong thiết bị ủ ở 37°C , 5% CO_2 qua đêm. 16 giờ sau đó, 100 μl kháng thể Abeta được pha loãng gradient hoặc đối chứng âm (kháng thể kháng thrombin dựa trên đích không thích hợp được sử dụng làm đối chứng âm, và kháng thể kháng thrombin được sản xuất theo phương pháp điều chế đối với H1601-008 như được mô tả trong WO2017133673A1) được trộn kỹ với 10 μM sợi Abeta được đánh dấu huỳnh quang (pha loãng bằng 100 μl F-12K môi trường

cơ sở), ủ ở 37°C trong một giờ, được bổ sung vào trong đĩa 24 lỗ với 500µl môi trường được loại bỏ, và ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 1 giờ. Loại bỏ phần nổi, và các tế bào này được rửa nhẹ ba lần bằng PBS được làm lạnh trước ở 4°C. Và sau đó Trypsin-EDTA 0,25% được làm lạnh trước (1×) được bổ sung với 200µl/lỗ và được đặt ở 4°C trong 20 phút. Trypsin này được trung hòa bằng môi trường F-12K chứa 10% FBS và được ly tâm, và sau đó rửa các tế bào này ba lần bằng PBS được làm lạnh trước, 100µl tế bào được thu lại và đưa lên trên thiết bị đọc tế bào Flow Cytometer để đọc cường độ huỳnh quang FITC.

Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 3. Cả hai HAB-2401 và HAB-3601 có thể thúc đẩy sự thực bào sợi Aβ bằng các tế bào BV2, chỉ giống kháng thể dương tính Aducanumab. Hiệu quả phụ thuộc liều được quan sát trong giới hạn nồng độ từ 0,03 đến 0,3 µg/ml.

Ví dụ thử nghiệm 5. Hiệu quả của các kháng thể kháng Abeta đối với sự thực bào sợi Aβ bởi tiểu thần kinh đệm sơ cấp chuột rat

Vỏ não được cắt thành mảnh từ chuột rat SD mới sinh, nghiền và lọc thu được huyền phù tế bào. Tái tạo huyền phù các tế bào này trong DMEM chứa 20% FBS (Gibco, CAT#10099-141), được chuyển vào trong bình nuôi cấy T75 (Corning, CAT#3473) được phủ trước bằng PDL (Sigma, CAT#P0899) và đặt trong thiết bị ủ (37°C, 5% CO₂). Đổi môi trường sau mỗi 3 ngày. Vào ngày 8, đặt bình nuôi cấy này trên máy lắc và lắc ở 200 vòng/phút trong 1 giờ. Thu huyền phù này, ly tâm, đếm, pha loãng đến 5E4/lỗ (5×10^4 /lỗ) bằng môi trường DMEM/F12 (GE, CAT#SH30023.01) chứa 10% FBS, và đặt vào trong đĩa 24 lỗ. 6 giờ sau đó, đổi môi trường bằng môi trường DMEM/F12 không chứa huyết thanh và ủ qua đêm. Vào ngày 9, các nồng độ kháng thể khác nhau hoặc đối chứng âm (kháng thể kháng thrombin dựa trên đích không thích hợp được sử dụng làm đối chứng âm, và kháng thể kháng thrombin được sản xuất theo phương pháp điều chế H1601-008 như được mô tả trong WO2017133673A1) được trộn với 10µM Abeta 1-42 (GL biochem, CAT#53819) được đánh dấu FITC (Thermo, CAT#A30006), ủ ở 37 °C trong 30 phút, và được ly tâm để rửa bỏ kháng thể dư. Hỗn hợp kháng thể và Abeta được bổ sung vào các tế bào này và ủ ở 37°C trong 30 phút. Rửa các tế bào này hai lần bằng PBS (Hyclone, CAT#SH30256.01), và bổ sung trypsin (Gibco, CAT#25200-072), được đặt trong tủ lạnh ở 4 °C trong 10 phút để cắt các tế bào này. Và sau đó bổ sung huyết thanh để kết thúc phản ứng, thu các tế bào này sau khi loại bỏ phần nổi bằng cách ly tâm, bổ sung PBS được làm lạnh trước và loại bỏ phần nổi bằng cách ly tâm, và rửa các tế bào này hai lần bằng PBS. Cường độ huỳnh quang FITC được đọc

bằng thiết bị đo tế bào dòng (BD, Verse).

Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 4. Trong thí nghiệm về sự thực bào tiểu thần kinh đệm sơ cấp chuột rat, HAB-2401 và HAB-3601 có thể thúc đẩy sự thực bào sợi A β bởi tiểu thần kinh đệm sơ cấp, chỉ như kháng thể dương tính Aducanumab. Hiệu quả phụ thuộc liều được quan sát trong giới hạn nồng độ từ 0,03 đến 0,3 μ g/ml.

Ví dụ thử nghiệm 6. Thử nghiệm dược lý *in vivo* các kháng thể kháng A β

Mô hình chuột Alzheimer 5 $\times$ FAD (Familial AD) (Năm đột biến di truyền AD) được sử dụng để đánh giá hiệu quả *in vivo* kháng thể kháng A β . Năm đột biến gen di truyền gen APP và PS1, bao gồm ba đột biến trên gen APP (cụ thể là đột biến Swedish (K670N, M671L), đột biến Florida (I716V) và đột biến London (V717I)) và hai đột biến trên gen PS1 (cụ thể là M146L và L286V) được biểu hiện quá mức trong chuột 5 $\times$ FAD. Do đó, so với chuột kiểu dại (wild-type-WT), chuột 5 $\times$ FAD thể hiện các tổn thương rõ rệt về chức năng nhận thức và trí nhớ và đã có các mảng lắng đọng A β đáng kể trong mô não. Ví dụ thử nghiệm này được thiết kế để đánh giá hiệu quả của kháng thể thử nghiệm để cải thiện khả năng nhận thức của chuột và giảm sự lắng đọng mảng A β bằng cách thử nghiệm sự cải thiện tập tính của chuột, bao gồm khả năng xây tổ, và trí nhớ không gian (trí nhớ không gian trong mê cung nước morris), cũng như bằng cách thử nghiệm sự thay đổi hàm lượng mảng A β trong mô não.

Chuột 5 $\times$ FAD được cung cấp bởi Shanghai ChemPartner Co., Ltd. Chuột ba tháng tuổi được chọn và được giữ ở nhiệt độ phòng là $23 \pm 2^\circ\text{C}$, với chu trình sáng/tối 12/12 giờ, thức ăn và nước *ad libitum*. Kháng thể thử nghiệm tất cả là ở dạng khảm người-chuột, nghĩa là, (các) vùng hằng định của chuỗi nặng và nhẹ được thay bằng (các) vùng hằng định chuột để tránh kháng thể kháng được chất-ADA (anti-drug antibody) gây ra bởi dùng lâu dài kháng thể. Sáu nhóm (n=15 mỗi nhóm) được đưa vào trong thí nghiệm này, 4 nhóm kháng thể được thử nghiệm, một nhóm Aducanumab là đối chứng dương và một nhóm PBS là đối chứng âm. HAB-2401 và HAB-3601 là ở dạng khảm mIgG1, trong khi HAB-5101, HAB-9001 và Aducanumab là ở dạng khảm mIgG2a, và chúng được đề cập đến tương ứng là HAB-2401-Ch, HAB-3601-Ch, HAB-5101-Ch, HAB-9001-Ch và Aducanumab-Ch. HAB-2401-Ch và HAB-3601-Ch được tạo ra bằng cách dung hợp vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của HAB-2401 và HAB-3601 với vùng hằng định chuỗi nặng của mIgG1 (axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng của mIgG1 được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 62) và vùng hằng định chuỗi nhẹ của mIgG1 (trình tự axit amin của

vùng hằng định chuỗi nhẹ của mIgG1 được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63); HAB-5101-Ch, HAB-9001-Ch và Aducanumab –Ch được tạo ra bằng cách dung hợp vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của HAB-5101, HAB-9001 và Aducanumab với vùng hằng định chuỗi nặng của mIgG2a (trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng của mIgG2a được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64) và vùng hằng định chuỗi nhẹ của mIgG2a (trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ của mIgG2a được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 65). Phương pháp điều chế kháng thể được mô tả trong Ví dụ 4 của sáng chế này. Kháng thể này được dùng i.p. với 15mpk (mg/kg, milligram cho mỗi kilogam trọng lượng cơ thể) một tuần một lần, và được dùng ở thời gian từ 13:00 đến 16:00, trong tổng cộng 12 tuần.

Tất cả chuột 5×FAD được tiêm bổ sung kháng thể tương ứng sau thử nghiệm hành vi (Ví dụ thử nghiệm 8). Chuột được chia thành ba mẻ, 5 con chuột mỗi nhóm. Các mẫu được lấy ở 24 giờ, 72 giờ và 7 ngày sau liều dùng bổ sung, để phát hiện định lượng hàm lượng kháng thể thâm BBB ở các thời điểm khác nhau. Trong khi đối với sự phát hiện sự lắng đọng A β (Ví dụ thử nghiệm 9) và cytokin (Ví dụ thử nghiệm 10), cho các nhóm kháng thể giống nhau, tất cả các mẫu được lấy ở các điểm thời gian khác nhau sau liều bổ sung được nhóm lại cùng nhau để xử lý dữ liệu.

Ví dụ thử nghiệm 7. Thử nghiệm khả năng xây tổ của chuột

Xây tổ là bản năng của chuột, và nó thường được sử dụng là phương pháp thí nghiệm để đo hành vi xã hội của chuột. Đã được thông báo rằng chuột chuyển gen biểu hiện quá mức APP, như Tg2576, APPswe/PS1, 3 × Tg-AD, 5 × FAD (Transl Psychiatry. 2015 May 5;5:e562), thể hiện sự suy yếu về khả năng xây tổ ở các mức độ khác nhau. Ví dụ thử nghiệm này là để đánh giá hiệu quả của kháng thể thử nghiệm đối với sự cải thiện tập tính xã hội của chuột chuyển gen 5×FAD bằng cách ghi lại khả năng xây tổ của chuột bằng các thông số khác nhau.

Các quy trình cụ thể về việc xây tổ được miêu tả dưới đây. Vào khoảng 16:00 vào ngày thí nghiệm thứ nhất, mẫu giấy nén được đặt trong mỗi chuồng, và mỗi con chuột được nhốt trong mỗi chuồng tách biệt. Giấy nén được cân trọng lượng trước khi đặt vào chuồng (trọng lượng 1), và môi trường sinh sản giữ nguyên không thay đổi. Vào lúc 10 giờ sáng tiếp theo, chuột được đưa ra và quay trở lại các chuồng ban đầu. Hình dạng của tổ và vị trí của mẫu giấy được giữ không thay đổi. Trước hết, máy quay kỹ thuật số được sử dụng để chụp ảnh các tổ được chuột xây (mặt phía trước và mặt phía sau để phản ánh hình dạng đúng

và chiều cao của tổ). Giấy mà đã được xé thành các miếng vụn được nhặt lên và cân trọng lượng (trọng lượng 2). Phần trăm giấy còn lại được tính toán. Dựa trên các bức hình, theo hình dạng, chiều cao của tổ và mức độ giấy đã được xé, điểm trung bình cho mỗi con vật được thu lại từ ba điểm số độc lập song song, theo tiêu chuẩn ghi điểm, các điểm số có thể được điều chỉnh thích hợp dựa trên tình huống cụ thể. Tiêu chuẩn ghi điểm được thể hiện trong Bảng 5:

Bảng 5. Tiêu chuẩn ghi điểm về khả năng xây tổ của chuột

Hình dạng, chiều cao của tổ và mức độ giấy đã được xé	Điểm
Mẫu giấy vẫn hầu như nguyên vẹn (giấy để lại hơn 90%), như được thể hiện trong Fig. 5;	1
Phần nhỏ mẫu giấy đã được xé thành các mảnh nhỏ, hầu hết mẫu nhỏ vẫn còn nguyên vẹn, và khối lượng còn lại nằm trong khoảng từ 50% đến 90%, như được thể hiện trong Fig. 5;	2
Hầu hết mẫu giấy đã được xé thành mảnh vụn (50%-90%), tuy nhiên các mảnh vụn không được tập hợp ở góc của chuồng để hình thành hình dạng sơ bộ của tổ, thay vì, các mảnh giấy đã rải rác trên đáy của chuồng, như được thể hiện trong Fig. 5;	3
Hầu hết mảnh vụn giấy (nhiều hơn 90%) được tập hợp ở góc của chuồng và về cơ bản hình thành hình dạng của tổ, nhưng chiều cao của tổ không vượt quá 50% chiều cao của thân chuột, như được thể hiện trong Fig. 5;	4
Giấy đã được hầu như xé hoàn toàn (nhiều hơn 90% đã được xé), với hình dạng là hồ hình dạng núi lửa, và chiều cao của tổ không vượt quá 50% chiều cao của thân chuột, như được thể hiện trong Fig. 5.	5

Các hình ảnh của mỗi con chuột được phân tích bằng cách sử dụng công cụ Lasso trong gói phần mềm Photoshop CS4 để tính toán tỷ lệ diện tích của tổ (phần trăm của diện tích tổ so với tổng diện tích của các mảnh giấy rải rác). Điểm toàn diện của ba thông số (điểm số bậc ba) được tính toán theo công thức sau:

Điểm toàn diện của ba thông số = Phần trăm giấy còn lại $\times$ Phần trăm diện tích tổ $\times$ Điểm số trung bình

Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Fig. 6 và Fig. 7. Có một số sự khác biệt giữa tá được (đối chứng trống là dung môi) và WT (wild-type-kiểu đại), mà phản ánh của số thí nghiệm của thử nghiệm. Trong khi các nhóm Aducanumab-Ch, HAB-2401-Ch và HAB-9001-Ch cho thấy một số xu hướng cải thiện với nhóm tá được.

Ví dụ thử nghiệm 8 Thử nghiệm hành vi mê cung nước (mê cung nước

Morris)

Thí nghiệm mê cung nước là thử nghiệm về hành vi được sử dụng thông thường trong lĩnh vực sinh học thần kinh để đánh giá khả năng học và nhớ không gian của chuột. Trong thí nghiệm này, các ám hiệu không gian xung quanh bể bơi được sử dụng để hướng dẫn chuột tìm và nhớ vực trốn thoát được ẩn dưới nước trong bể bơi bằng các huấn luyện.

Mê cung nước Morris bao gồm bể hình tròn bằng nhựa không mùi và không độc màu trắng với đường kính là 120cm và chiều cao là 50cm và bọc chất dẻo perspex trong suốt. Bục này cao 31cm, và bề mặt trên cùng của bục có đường kính là 8,5cm. Đổ đầy nước trong bể này cho tới khi bề mặt nước là ở trên bục này 1cm. Bể được chia thành bốn góc bằng nhau, NE, SE, SW và NW, và N, NE, E, SE, S, SW, W và NW được đánh dấu ở tám điểm được chia đều nhau đường tròn bên ngoài của bể hình tròn này. Bục được đặt ở trung tâm của góc SW, với khoảng cách 30cm đến tâm của vòng tròn này và khoảng cách 30cm đến vách của bể (biểu đồ của mê cung nước này được thể hiện trong Fig. 8). Thiết bị ghi hình được nối với máy tính và màn hình. Bể tròn được đặt trong phòng thí nghiệm có đầy đủ ánh sáng. Các ám hiệu nhìn thấy rõ ràng được gắn ở các đầu hiệu NE, SE, SW và NW. Trước khi thí nghiệm, khối lượng thích hợp các hạt nhựa trắng được rắc trong nước để làm cho nó phủ đều trên bề mặt nước, và nhiệt độ nước được duy trì ở $23,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Nước được thay 5 ngày một lần.

Các mô đun sau được đưa vào trong thí nghiệm mê cung nước: huấn luyện cờ, bục ẩn và thử nghiệm đầu dò.

8.1. Huấn luyện cờ

Cờ trên nước được đặt trên bục để hướng dẫn các con vật. Mỗi con vật thí nghiệm được đặt vào trong nước (đối diện với thành bể) ở điểm N, và video theo dõi và ghi được bắt đầu ở cùng thời điểm, trong 60 giây. Nếu con vật này không lên bục trong 60 giây, nó sẽ được hướng dẫn bằng tay lên bục và cho ở lại trong 20 giây trước khi được loại khỏi mê cung này; nếu con vật này tìm thấy bục trong 60 giây nhưng ở lại trên bục ít hơn 20 giây, sau 60 giây-huấn luyện kết thúc, nó sẽ buộc ở lại trên bục trong 20 giây trước khi được loại khỏi mê cung này; nếu con vật tìm thấy bục trong 60 giây và ở lại trên bục trong 20 giây, nó sẽ được loại khỏi bục. Sau khi huấn luyện, mỗi con vật được lau khô bằng khăn và đưa trở lại chuồng. Sau khi tất cả các con vật được huấn luyện, vòng huấn luyện tương tự mới được bắt đầu lại. Theo cách này, mỗi con vật được huấn luyện 4 lần trong một ngày.

8.2. Bục ẩn

Bục được ẩn khoảng 1cm dưới bề mặt nước. Các con vật được huấn luyện 4 lần một ngày trong tổng thời gian 12 ngày. Vị trí ở đó chuột được đưa vào trong nước được thể hiện trong Fig. 8. Trong mỗi huấn luyện, các con vật được đặt đối diện với thành bể, video theo dõi và ghi được bắt đầu ở cùng thời điểm. Mỗi huấn luyện kéo dài trong 60s. Nếu con vật này tìm thấy bục trong 60 giây, nó sẽ được hướng dẫn bằng tay lên bục và cho ở lại trong 15 giây trước khi được loại khỏi mê cung này; nếu con vật tìm thấy bục trong 60 giây nhưng ở lại trên bục ít hơn 15 giây, sau 60 giây-huấn luyện kết thúc, nó sẽ buộc ở lại trên bục trong 15 giây trước khi được loại khỏi mê cung này; nếu con vật tìm thấy bục trong 60 giây và ở lại trên bục trong 15 giây, nó sẽ được loại khỏi bục. Sau khi huấn luyện, mỗi con vật được lau khô bằng khăn và đưa trở lại chuồng. Sau khi tất cả các con vật được huấn luyện, vòng huấn luyện mới được bắt đầu lại, với vị trí khác nhau tại đó con vật được đưa vào trong nước.

8.3 Thử nghiệm đầu dò

24 giờ sau huấn luyện cuối cùng vào ngày 12, bục dưới nước được loại bỏ cho thử nghiệm đầu dò. Con vật được đưa vào trong nước (đối diện với thành bể) at the NE point, video theo dõi và ghi được bắt đầu ở cùng thời điểm. 60 giây sau đó, theo dõi kết thúc. Con vật được loại khỏi bể, làm khô bằng khăn và đưa trở lại chuồng. Theo dõi các con vật được phân tích bằng phần mềm Noldus Ethovision.

8.4. Các kết quả của thí nghiệm mê cung nước

Đường cong học của huấn luyện bục ẩn được thể hiện trong Fig. 9. Các kết quả cho thấy rằng giữa nhóm tá được chuột 5×FAD Tg (đối chứng trống là dung môi) và nhóm WT, sự khác biệt đáng kể được quan sát vào ngày 6, và sự khác biệt rất lớn được quan sát vào ngày 10 và ngày 11 của đào tạo bục ẩn, và sự khác biệt này có xu hướng ổn định, chỉ ra rằng có sự khác biệt về khả năng trí nhớ không gian giữa các chuột chuyển gen 5×FAD và chuột kiểu dại trong thử nghiệm hành vi. Sự khác biệt này là trên cơ sở thử nghiệm được chất thử nghiệm; từ ngày 1, nhóm được chất đối chứng dương Aducanumab-Ch luôn thể hiện thời gian chờ ngắn hơn lên bục so với nhóm tá được, vào ngày 11, sự khác biệt đáng kể được quan sát, chỉ ra rằng Aducanumab-Ch thể hiện hiệu quả tuyệt vời trong thí nghiệm này; Tương tự với nhóm Aducanumab-Ch, HAB-2401-Ch, HAB-5101-Ch và HAB-9001-Ch thể hiện sự khác biệt đáng kể vào ngày 11 và 12, chỉ ra rằng giống Aducanumab-Ch, ba được chất này có thể cải thiện đáng kể trí nhớ không gian và khả năng nhận thức của chuột.

Trong thử nghiệm đầu dò, chúng tôi đã đánh giá một vài các thông số thí nghiệm, bao gồm chờ đến bụi, chờ đến vùng bụi, số đếm đi qua bụi hoặc vùng bụi, khoảng thời gian trên bụi & khoảng thời gian trên vùng bụi và chỉ số ACI.

Kết quả về chờ đến bụi được thể hiện trong Fig. 10A. Có sự khác biệt nhất định giữa nhóm WT và nhóm tá dược, là của số thí nghiệm. (Cho nhóm WT, chờ đến bụi trong thử nghiệm đầu dò là dài hơn so với huấn luyện cò, mà có thể bị gây ra bởi sự thay đổi thí nghiệm, do chỉ một thử nghiệm được thực hiện trong thử nghiệm đầu dò này, trong khi bốn thử nghiệm đã được thông báo trong huấn luyện cò). Các kết quả của HAB-2401-Ch, HAB-5101-Ch và HAB-9001-ch có thể so sánh với kết quả của nhóm Aducanumab-Ch, và thể hiện khoảng thời gian ngắn hơn so với nhóm tá dược.

Các kết quả về chờ đến vùng bụi được thể hiện trong Fig. 10B. Nhóm WT thể hiện là khác biệt đáng kể khoảng ba lần khi so sánh với nhóm tá dược. Nhóm Aducanumab-Ch cho thấy sự khác biệt đáng kể khi so sánh với nhóm tá dược, trong khi kết quả của nhóm Aducanumab-Ch là gần với kết quả của nhóm WT, chỉ ra rằng các phân tử dương tính có thể cải thiện đáng kể trí nhớ của chuột 5×FAD. Tất cả bốn kháng thể thử nghiệm thể hiện sự khác biệt đáng kể khi so sánh với nhóm tá dược, trong số đó HAB-9001-Ch thể hiện hiệu quả thậm chí tốt hơn so với Aducanumab-Ch.

Các kết quả thí nghiệm về số đếm đi qua bụi hoặc vùng bụi được thể hiện trong Fig. 10C và Fig. 10D, các kết quả thí nghiệm về khoảng thời gian trên bụi & khoảng thời gian trên vùng bụi được thể hiện trong Fig. 10E và Fig. 10F, và các kết quả thí nghiệm của chỉ số ACI được thể hiện trong Fig. 10G. Trong thử nghiệm đầu dò, bụi đã được loại bỏ, và trí nhớ của chuột về bụi là tương ứng khẳng định chắc chắn về mặt lý thuyết với các thông số này. Đối với năm thông số này, có sự khác biệt nhất định giữa nhóm WT và nhóm tá dược, cho thấy của số thí nghiệm của các kết quả thí nghiệm. So với nhóm tá dược, Aducanumab-Ch cho thấy xu hướng cải thiện. So với nhóm tá dược, HAB-2401-Ch, HAB-5101-Ch và HAB-9001-Ch tất cả đều thể hiện mức cải thiện khác biệt, và HAB-9001-Ch thể hiện hiệu suất tốt nhất.

Tóm lại, trong thử nghiệm đầu dò, so với nhóm tá dược, HAB-2401-Ch, HAB-5101-Ch và HAB-9001-Ch thể hiện mức cải thiện khác biệt về chờ đến bụi, chờ đến vùng bụi, khoảng thời gian trên bụi, khoảng thời gian trên vùng bụi, số đếm đi qua bụi, số đếm đi qua vùng bụi và chỉ số ACI, gợi ý rằng ba kháng thể thử nghiệm này có thể cải thiện đáng kể trí nhớ không gian và khả năng nhận thức của mô hình chuột Alzheimer 5×FAD.

Ví dụ thử nghiệm 9. Phát hiện sự lắng đọng A β

Tất cả các mẫu được lấy từ chuột được sử dụng cho thử nghiệm hành vi (Ví dụ thử nghiệm 8). Mỗi con chuột được truyền PBS (pH 7,4) và thu lấy não. Bán cầu não trái được ngâm trong 4% PFA ngay lập tức và cố định trong 72 giờ, và bán cầu não phải được cắt trên đá để thu lấy vỏ não trán và hải mã, được cân tách biệt, sau đó làm lạnh nhanh trong nitơ lỏng, và dự trữ trong tủ lạnh ở -80°C để xử lý mẫu sau đó.

Các quy trình cụ thể để đồng nhất bán cầu não phải là như sau: mô thử nghiệm được cân trọng lượng và được chuyển vào trong ống đồng nhất, và bổ sung thể tích gấp 10 lần dịch phân giải diethylamin (50mM NaCl, 0,2% DEA chứa chất ức chế proteaza). Nghĩa là, 10 mg mô được bổ sung vào 100 μl dung dịch phân giải, đồng nhất bằng thiết bị đồng nhất, và siêu âm trong nước đá trong 15-20 giây. Dịch đồng nhất được chuyển vào trong ống ly tâm, ly tâm ở $100.000 \times g$ ở 4°C trong 30 phút. Phần nổi thu được chứa A β hòa tan được thu lại và bảo quản ở -80°C . Thể tích gấp 10 lần dung dịch phân giải guanidin hydroclorua (5M GuHCl trong PBS) được bổ sung vào trong ống ly tâm, viên này được tái tạo huyền phù và siêu âm trong nước đá trong 15-20 giây. Ly tâm mẫu này ở $100.000 \times g$ ở 4°C trong 30 phút. Phần nổi thu được chứa A β không hòa tan được thu lại và dự trữ ở -80°C .

Sự lắng đọng A β trong dịch đồng nhất mô não được phát hiện bằng phương pháp ELISA (Amyloid beta người (aa1-40) Quantikine ELISA Kit: R&D systems, DAB140B; Amyloid beta người (aa1-42) Quantikine ELISA Kit: R&D systems, DAB142). Trước hết, các thành phần không tan trong dịch đồng nhất não (nghĩa là, mẫu được thử nghiệm) và mẫu chuẩn được pha loãng bằng chất pha loãng; đĩa được phủ trước được rửa bằng đệm rửa; mẫu chuẩn được pha loãng và các mẫu được bổ sung; hàn kín đĩa này và ủ ở 4°C trong 2 giờ; rửa đĩa này bằng đệm rửa trong 3-4 lần; bổ sung kháng thể thứ cấp được làm lạnh trước; hàn kín đĩa này và ủ ở 4°C trong 2 giờ; rửa đĩa này 3-4 lần bằng đệm rửa; bổ sung dung dịch tạo màu cơ chất và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút; bổ sung dung dịch dừng và OD450 được đọc trên thiết bị đọc vi đĩa.

Các kết quả của thử nghiệm ELISA được thể hiện trong Fig. 11A-11D, Nhóm tá được (đối chứng trống là dung môi) thể hiện sự lắng đọng A β 1-40 và A β 1-42 đáng kể so với nhóm WT, chỉ ra rằng sự lắng đọng A β được biểu hiện quá mức trong mô não chuột $5 \times \text{FAD}$. So với nhóm tá được, xu hướng A β 1-40 và A β 1-42 giảm được quan sát trong Aducanumab-Ch. Trong số bốn kháng thể được thử nghiệm, HAB-3601-Ch có hiệu suất tốt nhất và có xu hướng A β 1-40 không hòa tan (A β 1-40 không hòa tan hải mã) và A β 1-42 không hòa tan (A β 1-42 không hòa tan hải mã) giảm so với tá được.

Quy trình nhuộm mô hóa học miễn dịch mô bán cầu não trái là như sau. Khử nước não được phân lập: não được cố định bằng 4% PFA trong 72 giờ, sau đó đưa vào trong dung dịch sucroza 30% để khử nước, đặt trong tủ lạnh ở 4°C qua đêm, và quy trình khử nước được lặp lại một lần; gắn các mô này: isopentan được đặt trong đá khô trong ít phút để tạo ra dịch lỏng trong isopentan để chạm -70°C; làm khô mô não bằng giấy thấm và đặt vào trong isopentan để được làm lạnh trong ít giây sau khi loại bỏ một phần dư, và sau đó lấy mô não này từ isopentan, làm khô và gắn trong hộp gắn với OTC (chất gắn), và sau đó đặt hộp gắn này lên trên đá lạnh để tạo ra OTC hóa rắn. Mô não được gắn này được lưu trữ trong tủ lạnh ở -80°C; Cắt: cắt mô não này theo mặt cắt đứng dọc giữa trong cryostat, 20µm cho mỗi lát; bất hoạt peroxidaza nội sinh: rửa lát cắt não ba lần trong PBS, mỗi lần 5 phút, ủ với 0,3% H₂O₂ (được điều chế bằng PBS) trong 10 phút; Tính thấm: mô não được rửa 3 lần trong PBS, 5 phút mỗi lần, ủ với TBST (TBS chứa 0,25% Triton X-100) 3 lần, 5 phút mỗi lần; chặn: ủ với 0,3% Triton X-100 và 5% BSA trong PBS trong 1 giờ; ủ với kháng thể sơ cấp: kháng thể sơ cấp 3D6 được pha loãng bằng 2% BSA trong TBST đến nồng độ hoạt động là 10µg/ml, và lát cắt não được đưa vào trong dung dịch hoạt động chứa kháng thể sơ cấp và ủ qua đêm ở 4°C; ủ với kháng thể thứ cấp: lát cắt não được rửa trong TBST ba lần, 5 phút mỗi lần, kháng thể thứ cấp được pha loãng bằng TBST chứa 2% BSA thu được nồng độ hoạt động là 5µg/ml, lát cắt não được ủ trong dung dịch hoạt động chứa kháng thể thứ cấp trong 1h; màu được phát triển: lát cắt não được rửa trong TBST 3 lần, 5 phút mỗi lần, và đưa vào trong dung dịch phát triển màu trong tối trong 5 phút, và sau đó ngâm trong nước tinh khiết hai lần hai lần để dừng phản ứng phát triển; gắn: mô não được đưa vào trong và ra khỏi PBS, làm khô, ngâm trong nước tinh khiết để loại bỏ muối, làm khô và cố định bằng các nồng độ etanol gradient (75%, 95%, etanol nguyên chất), gắn với nhựa, và làm khô; quét và phân tích định lượng: lát này được quét bằng máy quét lát kỹ thuật số (Hamamatsu Nanozoomer S210) để tạo ra hình ảnh quét về lát này. Cho mỗi ảnh về lát não, các vùng vỏ não và hải mã được chỉ định đầu tiên theo tọa độ não chuột, và sau đó các vùng tín hiệu dương tính Aβ được chỉ ra bằng phần mềm hệ thống phân tích BIOTOPIX™ Analysis. Cuối cùng, tỷ lệ về tín hiệu dương tính được tính toán tương ứng cho vỏ não và hải mã. Nghĩa là, tỷ lệ về tín hiệu dương tính Aβ trong vỏ não = vùng của tín hiệu dương tính Aβ trong vỏ não/tổng vùng của vỏ não; tỷ lệ của tín hiệu dương tính Aβ trong hải mã = vùng tín hiệu dương tính Aβ trong hải mã / tổng vùng hải mã.

Các kết quả thí nghiệm của phát hiện IHC được thể hiện trong Fig. 12 và Fig. 13. So với nhóm WT, nhóm tá được thể hiện sự lắng đọng rõ rệt Aβ1-40 và Aβ1-42, mà thống nhất với thử nghiệm ELISA. So với nhóm tá được,

HAB-3601-Ch, HAB-9001-Ch và Aducanumab-Ch có thể giảm đáng kể sự lắng đọng A β , gợi ý rằng HAB-3601-Ch và HAB-9001-Ch có thể giảm đáng kể sự lắng đọng A β , chỉ như Aducanumab-Ch.

Ví dụ thử nghiệm 10. Hiệu quả của các kháng thể đối với sự giải phóng cytokin trong mô não

Các mẫu được sử dụng trong ví dụ thử nghiệm này là thành phần hòa tan từ dịch đồng nhất não trong Ví dụ thử nghiệm 9, và phương pháp phát hiện được sử dụng là thiết bị phân tích MSD (Meso Scale Discovery) hóa huỳnh quang điện tử độ nhạy cao. Các quy trình thí nghiệm cụ thể được mô tả trong hướng dẫn sản phẩm (U-PLEX Biomarker Group (chuột) Bộ kit đa thử nghiệm: MSD, N05235A-1). Vấn đề là, kháng thể được bắt giữ được biotinyl hóa cho mỗi cytokin được nối với mỗi đoạn nối U-PLEX, phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, và sau đó kết thúc phản ứng này; dung dịch kháng thể được nối với U-PLEX điều chế được trộn và phủ trên đĩa U-PLEX, ủ ở nhiệt độ trong phòng kèm lắc trong một giờ hoặc 4°C qua đêm; các mẫu chuẩn và các mẫu thử nghiệm (nghĩa là, các thành phần hòa tan trong dịch đồng nhất mô não) được pha loãng theo hướng dẫn sử dụng; đĩa được phủ này được rửa bằng PBST hoặc 1× đệm rửa MSD (1x chất phản ứng rửa MSD) trong 3 lần, bổ sung 25 μ l chất pha loãng mẫu, và 25 μ l mẫu chuẩn pha loãng và các mẫu được thử nghiệm, và hàn kín đĩa này và ủ ở nhiệt độ trong phòng kèm lắc trong 1 giờ. Đĩa được phủ được rửa bằng PBST hoặc 1× đệm rửa MSD 3 lần, bổ sung 50 μ l hỗn hợp kháng thể phát hiện được pha loãng, và hàn kín đĩa này và ủ kèm với lắc ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Đĩa được phủ được rửa 3 lần bằng PBST hoặc 1× đệm rửa MSD, và sau đó bổ sung 2× chất phản ứng đệm đọc. Cuối cùng, đĩa này được đọc trên thiết bị MSD.

Các kết quả thí nghiệm được thể hiện trong Fig. 14A đến Fig. 14D và Fig. 15A đến Fig. 15F. Các mức của tất cả các cytokin như TNF α , IFN- γ , IL1 β , IL2, IL6, IL12p70, IL4, IL10, MCP-1 và KC là rất thấp và hầu như chạm mức giới hạn dưới của phương pháp phát hiện. Có sự khác biệt hiển nhiên giữa các cá thể chuột, vì vậy có sự khác biệt không đáng kể giữa các nhóm. Tóm lại, bốn nhóm kháng thể thử nghiệm không thể hiện mức cytokin cao hơn khi so sánh với đối chứng dương Aducanumab, chỉ ra rằng các kháng thể thử nghiệm là an toàn.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, chứa HCDR1 chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 17, HCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 18 hoặc 52, và HCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 27, và LCDR1 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 20, LCDR2 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 21, và LCDR3 như được thể hiện trong SEQ ID NO: 22.

2. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể chuột, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống người.

3. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể này là kháng thể chuột, và kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9, hoặc có ít nhất 95% trình tự giống với vùng FR của nó; và

vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10, hoặc có ít nhất 95% trình tự giống với vùng FR của nó.

4. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10.

5. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm giống người, và trình tự vùng FR của kháng thể này chứa vùng FR dòng mầm người hoặc biến thể của nó, biến thể vùng FR có lên đến 10 sự đột biến hồi phục axit amin tương ứng trên vùng khung chuỗi nhẹ và/hoặc vùng khung chuỗi nặng của kháng thể người.

6. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 50 hoặc có ít nhất 90% trình tự giống với vùng FR của nó, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51 hoặc có ít nhất 90% trình tự giống với vùng FR của nó.

7. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo

điểm 6, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm giống người bao gồm HCDR1 và HCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17 và SEQ ID NO: 27, và HCDR2 như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 18 hoặc 52, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể bao gồm LCDR1, LCDR2 và LCDR3 như được thể hiện tương ứng trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 và SEQ ID NO: 22, (các) vùng FR bao gồm sự đột biến hồi phục axit amin 2V.

8. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa (các) vùng hằng định.

9. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 8, trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng kháng thể như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 42 hoặc có ít nhất 85% trình tự giống với trình tự này, và trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ kháng thể như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 hoặc có ít nhất 85% trình tự giống với trình tự này.

10. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 8, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40, hoặc có ít nhất 85% trình tự giống với trình tự này, và/hoặc chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41, hoặc có ít nhất 85% trình tự giống với trình tự này.

11. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 10, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40 và chuỗi nhẹ như được thể hiện trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 41.

12. Kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diabody, dsFv và mảnh gắn kết kháng nguyên của peptit chứa CDR.

13. Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.

14. Vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic này theo điểm 13.

15. Tế bào chủ thu được bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp theo điểm 14, trong đó tế bào chủ được chọn từ nhóm bao gồm tế bào tiền nhân và tế bào nhân chuẩn.

16. Tế bào chủ theo điểm 15, trong đó tế bào chủ này là tế bào nhân chuẩn.

17. Tế bào chủ theo điểm 15, trong đó tế bào chủ này là tế bào động vật có vú.

18. Phương pháp điều chế kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ theo một điểm bất kỳ theo điểm từ 15 đến 17 trong môi trường nuôi cấy, và sau đó tinh chế và thu hồi kháng thể này.

19. Dược phẩm chứa:

kháng thể kháng Abeta hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, và
một hoặc nhiều chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG ABETA HOẶC MẢNG GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN CỦA NÓ, DƯỢC PHẨM CHỨA NÓ VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ KHÁNG THỂ NÀY

<130> 719048CPCT

<140> PCT/CN2019/096159

<141> 2019-07-16

<150> CN201810782196.2

<151> 2018-07-17

<160> 73

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin Abeta 1-40

<400> 1

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
		20						25					30		
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val								
		35					40								

<210> 2

<211> 42

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin Abeta 1-42

<400> 2

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
		20						25					30		
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala						

35

40

<210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VH mAb-2401

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Ile Ile Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Gly Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Val Tyr Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VL mAb-2401

<400> 4
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys

<210> 5
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VH mAb-3601

<400> 5
 Gln Ala Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Pro Leu Gly Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VL mAb-3601

<400> 6
 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 Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

				85					90					95			
Ser	Arg	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys		
			100					105					110				

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VH mAb-5101

<400> 7
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Val Ser Leu Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ala Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Val Arg Arg Arg Ile Ile Thr Val Val Asp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VL mAb-5101

<400> 8
 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 Ser 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 Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly

				85					90				95				
Ser	Arg	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110				

<210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VH mAb-9001

<400> 9																	
Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln		
1				5					10					15			
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Phe		
			20					25					30				
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu		
		35					40					45					
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ala		
		50				55					60						
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val		
65					70					75				80			
Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ile	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr		
			85						90					95			
Cys	Val	Arg	Arg	Gly	Phe	His	Leu	Gly	Ser	Arg	Gly	Asp	Tyr	Phe	Asp		
		100						105					110				
His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120										

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin VL mAb-9001

<400> 10																	
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	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly		

				85					90					95					
Ser	Arg	Val	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys				
			100					105					110						

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR1 mAb-2401, HAB-2401

<400> 11
 Asn Thr Tyr Met His
 1 5

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR2 mAb-2401, HAB-2401

<400> 12
 Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> mAb-2401, HAB-2401 HCDR3

<400> 13
 Arg Val Tyr Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Asn Tyr
 1 5 10

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin LCDR1 mAb-2401, HAB-2401

<400> 14
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Thr

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin LCDR2 mAb-2401, HAB-2401

<400> 15
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin LCDR3 mAb-2401, HAB-2401

<400> 16
 Gln Asn Asp Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR1 mAb-3601, mAb-9001, HAB-3601, HAB-9001

<400> 17
 Thr Phe Gly Met Gly Val Gly
 1 5

<210> 18
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR2 mAb-3601, mAb-9001

<400> 18
 His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR3 mAb-3601, HAB-3601

<400> 19
 Arg Pro Leu Gly Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin LCDR1 mAb-3601, mAb-5101, mAb-9001, HAB-3601,
 HAB-5101, HAB-9001

<400> 20
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin LCDR2 mAb-3601, mAb-5101, mAb-9001, HAB-3601,
 HAB-5101, HAB-9001

<400> 21
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin LCDR3 mAb-3601, mAb-9001, HAB-3601, HAB-9001

<400> 22
 Phe Gln Gly Ser Arg Val Pro Leu Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR1 mAb-5101, HAB-5101

<400> 23
 Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR2 mAb-5101, HAB-5101

<400> 24
 His Ile Tyr Trp Asp Asp Val Ser Leu Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR3 mAb-5101, HAB-5101

<400> 25

Arg Arg Ile Ile Thr Val Val Asp Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin LCDR3 mAb-5101

<400> 26

Cys Gln Gly Ser Arg Val Pro Pro Thr
 1 5

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin HCDR3 mAb-9001, HAB-9001

<400> 27

Arg Gly Phe His Leu Gly Ser Arg Gly Asp Tyr Phe Asp His
 1 5 10

<210> 28

<211> 98

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin khuôn chuỗi nặng (IGHV1-24*01) dòng mầm người

<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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Thr

<210> 29
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin khuôn chuỗi nhẹ (IGKV1-27*01) dòng mầm người

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nặng HAB-2401

<400> 30

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

```

      115              120              125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
      130              135              140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145              150              155              160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
      165              170              175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
      180              185              190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
      195              200              205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
      210              215              220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225              230              235              240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
      245              250              255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
      260              265              270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      275              280              285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
      290              295              300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305              310              315              320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
      325              330              335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
      340              345              350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
      355              360              365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
      370              375              380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385              390              395              400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
      405              410              415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
      420              425              430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      435              440              445
Gly Lys
      450

```

```

<210> 31
<211> 220
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> khu vực
<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ HAB-2401

```

<400> 31

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
          20           25           30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
          35           40           45
Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn
          85           90           95
Asp Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
          100          105          110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
          115          120          125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
          130          135          140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145           150           155           160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
          165          170          175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
          180          185          190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
          195          200          205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215          220

```

<210> 32

<211> 98

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin khuôn chuỗi nặng (IGHV3-30*01) dòng mầm người

<400> 32

```

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

```

<210> 33
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin khuôn chuỗi nhẹ (IGKV1-39*01) dòng mầm người

<400> 33
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 34
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nặng HAB-3601

<400> 34
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Thr Phe
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Pro Leu Gly Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

```

      130              135              140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145              150              155              160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
      165              170              175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
      180              185              190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
      195              200              205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
      210              215              220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225              230              235              240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
      245              250              255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
      260              265              270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
      275              280              285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
      290              295              300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305              310              315              320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
      325              330              335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
      340              345              350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
      355              360              365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
      370              375              380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385              390              395              400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      405              410              415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
      420              425              430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
      435              440              445
Pro Gly Lys
      450

```

<210> 35

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ HAB-3601

<400> 35

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

```

1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35           40           45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50           55           60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65           70           75           80
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85           90           95
Ser Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105          110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115          120          125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130          135          140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165          170          175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180          185          190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195          200          205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210          215

```

<210> 36

<211> 100

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin khuôn chuỗi nặng(IGHV2-70D*04) dòng mầm người

<400> 36

```

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

```

<210> 37
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin khuôn chuỗi nhẹ (IGKV2-40*01) dòng mầm người

<400> 37
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Ile Glu Phe Pro
 100

<210> 38
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nặng HAB-5101

<400> 38
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Val Ser Leu Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Thr Val Val Asp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 39
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ HAB-5101

<400> 39
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

1           5           10           15
Glu Pro 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 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Gly
                85           90           95
Ser Arg Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                100           105           110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
                115           120           125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130           135           140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145           150           155           160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165           170           175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
                180           185           190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195           200           205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210           215

```

<210> 40

<211> 454

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin chuỗi nặng HAB-9001

<400> 40

```

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

```

115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 41
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin chuỗi nhẹ HAB-9001

<400> 41

```

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro 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 Gln 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 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
          85          90          95
Ser Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          130          135          140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          195          200          205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

```

<210> 42

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nặng HAB-2401, HAB-3601,
HAB-5101, HAB-9001

<400> 42

```

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

```

```

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

```

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nhẹ HAB-2401, HAB-3601, HAB-5101, HAB-9001

<400> 43

```

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

```

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 85 90 105

<210> 44
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng HAB-2401

<400> 44
 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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Val Tyr Tyr Tyr Asp Ser Thr Tyr Asn Tyr Trp Gly Lys
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ HAB-2401

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

85 90 95
 Asp Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 46
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng HAB-3601

<400> 46
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Thr Phe
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Pro Leu Gly Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 47
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ HAB-3601

<400> 47
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

```
<210> 48
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<400>		48														
Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln	
1				5					10					15		
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	
			20					25					30			
Gly	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	
		35					40					45				
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Trp	Asp	Asp	Val	Ser	Leu	Tyr	Asn	Pro	Ser	
	50					55					60					
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	
65					70					75					80	
Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	
				85					90					95		
Cys	Ala	Arg	Arg	Arg	Ile	Ile	Thr	Val	Val	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	
			100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120									

```
<210> 49
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<221> khu vực
<223> Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ HAB-5101

<400>	49																
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly		
1				5					10					15			
Glu	Pro	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 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Gly
 85 90 95
 Ser Arg Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 50
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng HAB-9001

<400> 50
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Gly Phe His Leu Gly Ser Arg Gly Asp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ HAB-9001

<400> 51
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro 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 Gln 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 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 52
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin HCDR2 HAB-3601, HAB-9001

<400> 52
 His Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
 5 10 15
 1

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin LCDR3 HAB-5101

<400> 53
 Ser Gln Gly Ser Arg Val Pro Pro Thr
 5
 1

<210> 54
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> Gen
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng HAB-2401

<400> 54
 gaggtgcagc tgggtgcagag cgggtgccgag gtgaagaagc cgggagcgag cgtgaaagtg 60
 agctgcaagg tgagcggcta caccctgacc aacacctaca tgcactgggt gaggcaggcc 120
 cctgggaagg gcctggagtg gatgggcagg atcgaccca ccaacggcaa caccaagtac 180
 gcccccaagt tcaaggacag ggtgaccatg accgccgaca ccagcaccga cactgcgtac 240
 atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcgc caggagggtc 300
 tactactacg acagcaccta taactactgg ggtaagggca ccaactgtaac cgtgagctct 360
 gcttcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcggt cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
 ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

```

aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720
ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 780
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaagggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccacgcagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1350

```

<210> 55
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> Gen
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ HAB-2401

```

<400> 55
gacatccaga tgacccaaaag cccagctcc ctgagcgcca gcgtggggga cagggtgact 60
atcacctgca agagcagcca gagcctgctg aactcaggca accagaagaa ctacctgacc 120
tggtatcagc agaagcccgg caaggtgccc aagcttctga tctactgggc cagcaccagg 180
gagagcggcg tgcccagcag gttcagtgcc agcggtagcg gaaccgactt cacccttaca 240
atctcaagcc tgcagcccga ggacgttgcc acctactact gccagaacga ctacaactac 300
cccctcacct tcggcggagg gactaagggt gagatcaagc gtacggtggc tgcaccatct 360
gtcttcatct tcccgcctac tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgcctc 480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 540
ctcagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 660

```

<210> 56
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> Gen
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng HAB-3601

```

<400> 56
caggtgcagc tgggtggagag cggcgggtggc gtgggtgcaac ccggcaggag cctgaggctg 60
agctgcgctg ccagcggctt cgccttcagc accttcggca tgggcgtggg ctgggtgagg 120
caggcaccgg gaaagggcct ggagtggttg gcccatatct ggtgggacga caacaagtac 180
tacaatccag ccctgaagag caggttcacc atcagcaggg acaacagcaa aaacaccctg 240
tacctgcaga tgaataccct gagggccgag gataccgccc tgtactactg cgccaggagg 300
cccctgggct cctacgatta cttcgactac tggggcaagg gaaccaccgt gaccgtgagc 360
agcgttcga ccaagggccc atcgtgtctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

```

tcaggactct	actccctcag	cagcgtggtg	accgtgccct	ccagcagctt	gggcacccag	600
acctacatct	gcaacgtgaa	tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gaaagttgag	660
cccaaactct	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	720
ggaccgtcag	tcttcctctt	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccggaac	780
cctgaggtca	catgcgtggt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	840
tggtagctgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa	agccgcggga	ggagcagtac	900
aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	960
aaggagtaca	agtgcaaggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	1020
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atcccgggat	1080
gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcttggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	1140
atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	1200
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcctc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	1260
tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	1320
acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaa			1353

<210> 57

<211> 657

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Gen

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ HAB-3601

<400> 57

gacatccaga	tgacccagag	ccccagcagt	ctgagcgcca	gcgtggggca	cagggtcacc	60
atcacctgta	ggagcagcca	gagcatcgtg	cacagcaacg	gcaacaccta	cctggagtgg	120
tatcagcaaa	agcccggcaa	ggccccaaag	cttctgatat	acaaggtgag	caacagggtc	180
tcaggcggtc	ccagtagggt	cagcggaagc	ggcagcgggg	ccgacttcac	cctgaccatc	240
agctccctgc	agcccgagga	cttcgccacc	tactactgct	tccagggcag	ccgggtgcct	300
ctgacctttg	gtggggggcac	caaggtggag	attaagcgta	cggtggctgc	accatctgtc	360
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	420
ctgaataaact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtggg	aggtggataa	cgccctccaa	480
tccggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	540
agcagcacc	tgacgctgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtcta	cgctgcgcaa	600
gtcaccatc	agggcctgag	ctcgcccgtc	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgt	657

<210> 58

<211> 1356

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Gen

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng HAB-5101

<400> 58

caggtgaccc	tgaaagaaa	cgccctgct	ctggtgaagc	ccaccagac	cctcacctcg	60
acctgcacct	tcagcggctt	cagcttgagc	accagcggca	tgggcgtgag	ctggatcagg	120
cagcctcccg	gcaaggccct	ggagtggctg	gccacatct	actgggacga	cgtgagcctg	180
tacaacccta	gcctgaagag	ccgcctgaca	atcagcaagg	acaccagcaa	gaaccagggtg	240
gtgctgacca	tgaccaacat	ggaccccggtg	gacaccgcca	cctactactg	cgccaggagg	300
aggatcatca	ccgtggtgga	cgccatggac	tattggggcc	agggcaccac	tgtgaccgtg	360
agcagcgctt	cgaccaaggg	cccatcggtc	ttccccctgg	caccctcctc	caagagcacc	420

tctgggggca	cagcggccct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg	480
gtgtcgtgga	actcaggcgc	cctgaccage	ggcgtgcaca	ccttcccggc	tgtcctacag	540
tcctcaggac	tctactccct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacc	600
cagacctaca	tctgcaacgt	gaatcacaa	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaaagtt	660
gagcccaaat	cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gcccagcacc	tgaactcctg	720
gggggaccgt	cagtcttctt	cttcccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccgg	780
acccctgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	840
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	900
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	960
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc	1020
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccgg	1080
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	1140
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	1200
cccggtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	1260
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	1320
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaa			1356

<210> 59
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> Gen
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ HAB-5101

<400>	59					
gacgtcgtga	tgaccagac	ccccctgagc	ctgcccgtga	cccctggcga	gcccgccagc	60
atcagctgca	ggagcagcca	gagcatcgtg	cacagcaacg	gcaacaccta	cctggagtgg	120
tacctgcaga	agcccgttca	gagccccaag	ctgctgatat	acaaggtgag	caacagggtc	180
agcggcgtgc	ccgacaggtt	ttccggcagc	ggaagcggca	ccgacttcac	cctgaagatc	240
agccgcgtgg	aggccgagga	cgtgggcgtg	tactactgca	gtcaggggaag	ccgagtgcgc	300
cccacctttg	gaggcggaac	taaggtggag	atcaagcgta	cgggtggctgc	accatctgtc	360
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	420
ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtggga	aggtggataa	cgccctccaa	480
tcgggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	540
agcagcacc	tgacgctgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtcta	cgctgcgaa	600
gtcacccatc	agggcctgag	ctcgcgccgc	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgt	657

<210> 60
 <211> 1362
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> Gen
 <223> Trình tự nucleotit chuỗi nặng HAB-9001

<400>	60					
caggtgaccc	tcaaggaatc	tggccctgca	ctggtgaagc	ccaccagac	cctgacgctg	60
acctgcacct	ttagcggctt	cagcttgagc	accttcggca	tgggcgtggg	ctggatcagg	120
cagcctcccc	gaaaggccct	ggagtggctg	gcccacatct	ggtgggacga	caacaagtac	180
tacaacccc	ctctgaagag	cgccctgaca	atcagcaagg	acaccagcaa	gaaccagggtg	240
gtgctgacca	tgaccaacat	ggaccccgtg	gacacogcca	cctactactg	cgccaggagg	300

```

ggcttccacc ttggcagcag gggcgactac ttcgaccact ggggccaagg caccactgtg 360
accgtgagca ggcgttcgac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag 420
agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgctgtgtca aggactactt ccccggaaccg 480
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 540
ctacagtctt caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 660
aaagttgagc ccaaattctt tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 720
ctcctggggg gaccgtcagt ctccctcttc ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgatc 780
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 840
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 900
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 960
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaaag ccctcccagc ccccatcgag 1020
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1080
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gctggtcaa aggccttctat 1140
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1200
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctctt acagcaagct caccgtggac 1260
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1320
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 1362

```

<210> 61

<211> 657

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> Gen

<223> Trình tự nucleotit chuỗi nhẹ HAB-9001

<400> 61

```

gacgtcgtga tgaccagac cccctgagc ctgcccgtga cccagaggaga acccgccagc 60
atcagctgca ggagcagcca gagcatcgtg cacagcaacg gcaacaccta cctggagtgg 120
tacctgcaga agcctggcca aagccccag ctgctgatat acaagggtgag caacaggttc 180
agcggcgtgc ccgatagggt ctctggcagt ggcagcggga ccgacttcac cctgaagatt 240
agcagagtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgct tccaaggcag ccgcgtgccc 300
ctgaccttcg gccagggcac taagctggag atcaagcgta cgggtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgacctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcacco tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

```

<210> 62

<211> 324

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> khu vực

<223> Trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nặng mIgG1

<400> 62

```

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1           5           10          15

```

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
 50 55 60
 Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro
 100 105 110
 Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
 115 120 125
 Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser
 130 135 140
 Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
 145 150 155 160
 Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 165 170 175
 Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn
 180 185 190
 Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
 195 200 205
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln
 210 215 220
 Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
 225 230 235 240
 Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
 245 250 255
 Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
 260 265 270
 Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
 275 280 285
 Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
 290 295 300
 Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
 305 310 315 320
 Ser Pro Gly Lys

<210> 63
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nhẹ mIgG1
 <400> 63

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

```

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

```

```

<210> 64
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<221> khu vực
<223> Trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nặng mIgG2a

```

```

<400> 64
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1              5              10              15
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
      20              25              30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
      35              40              45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
      50              55              60
Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65              70              75              80
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
      85              90              95
Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
      100              105              110
Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
      115              120              125
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
      130              135              140
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145              150              155              160
Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
      165              170              175
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
      180              185              190
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
      195              200              205
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210              215              220
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225              230              235              240
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
      245              250              255

```

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 275 280 285
 Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 305 310 315 320
 Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 325 330

<210> 65
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> Trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nhẹ mIgG2a

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

<210> 66
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-2401 được ghép VH

<400> 66
 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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

<210> 67
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-2401 được ghép VL

<400> 67
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 68
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-3601 được ghép VH

<400> 68
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe
 20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Pro Leu Gly Ser Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-3601 được ghép VL

<400> 69
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 70
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-5101 được ghép VH

<400> 70
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Val Ser Leu Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Arg Ile Ile Thr Val Val Asp Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-5101 được ghép VL

<400> 71
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro 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 Gln 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 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly
 85 90 95
 Ser Arg Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 72
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-9001 được ghép VH

<400> 72
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
 20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Gly Phe His Leu Gly Ser Arg Gly Asp Tyr Phe Asp
 100 105 110
 His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> khu vực
 <223> HAB-9001 được ghép VL

<400> 73
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro 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 Gln 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 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Arg Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

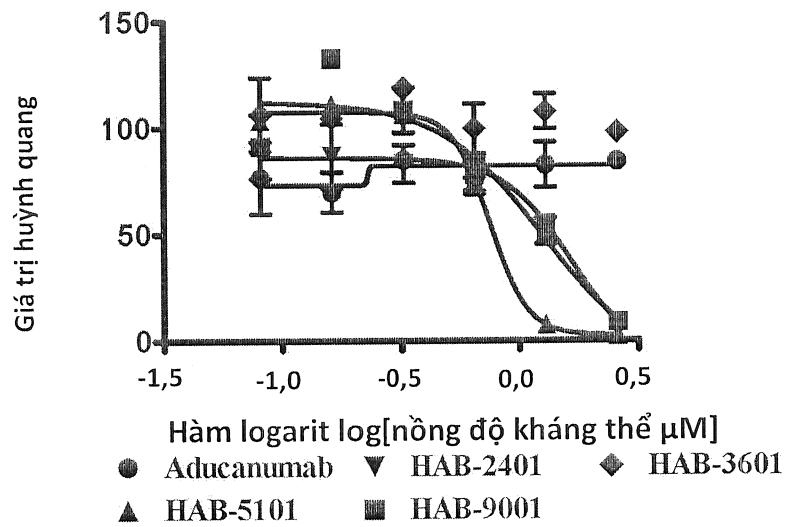


Fig.1

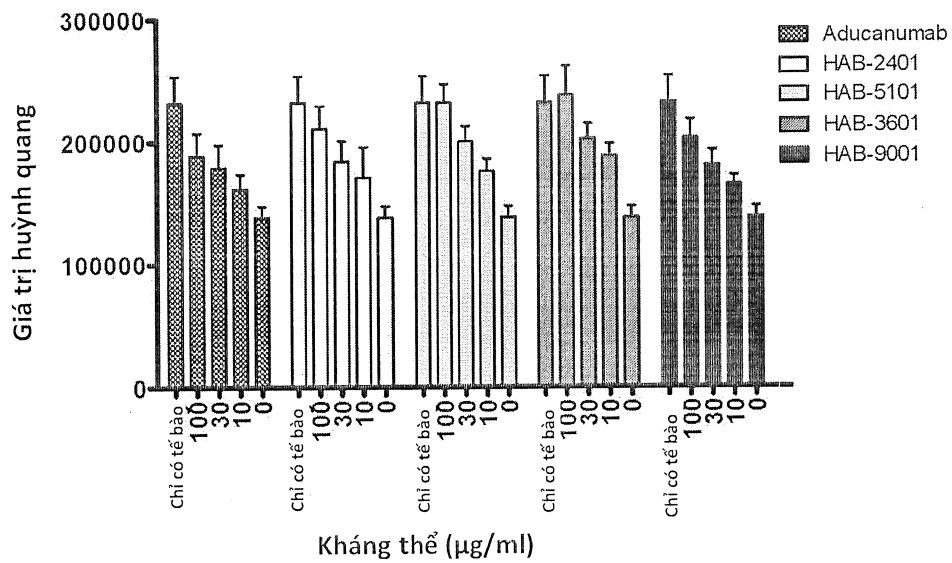
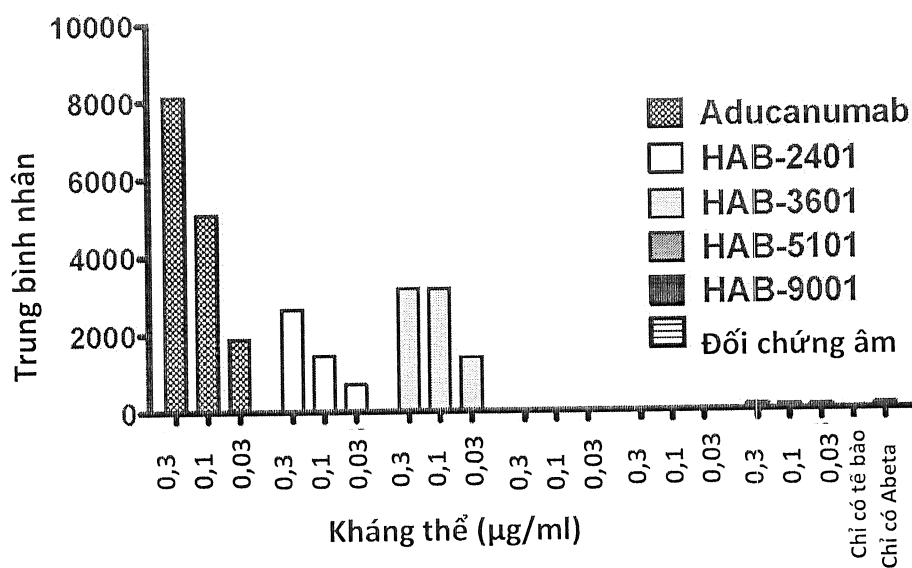
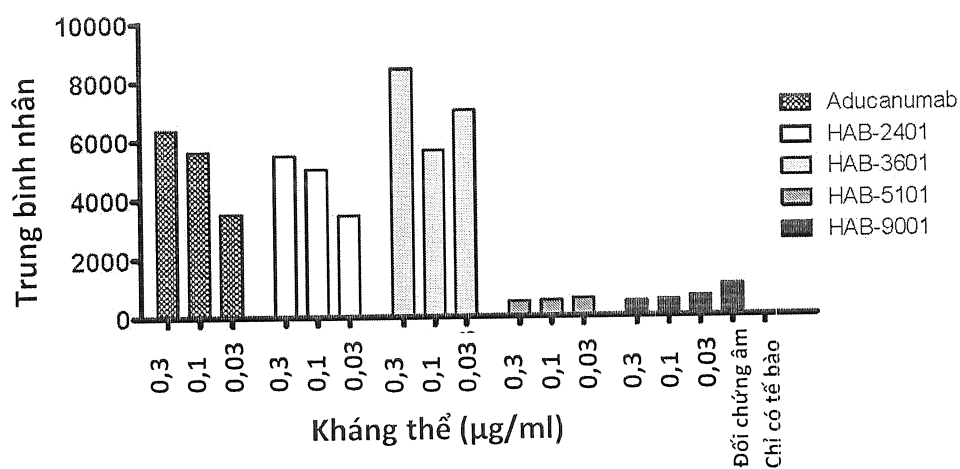


Fig.2



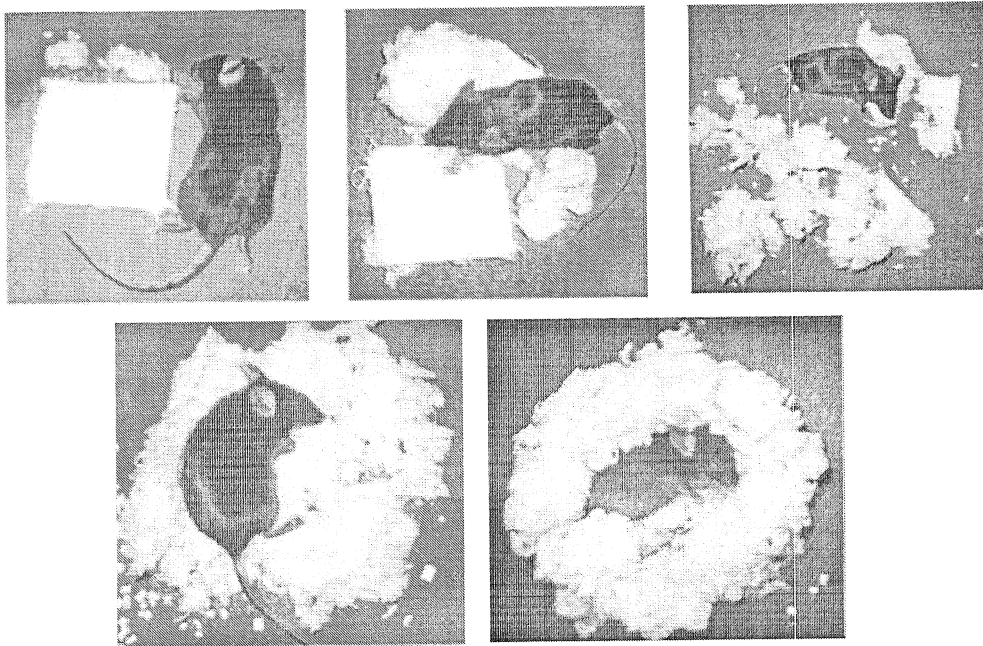


Fig.5

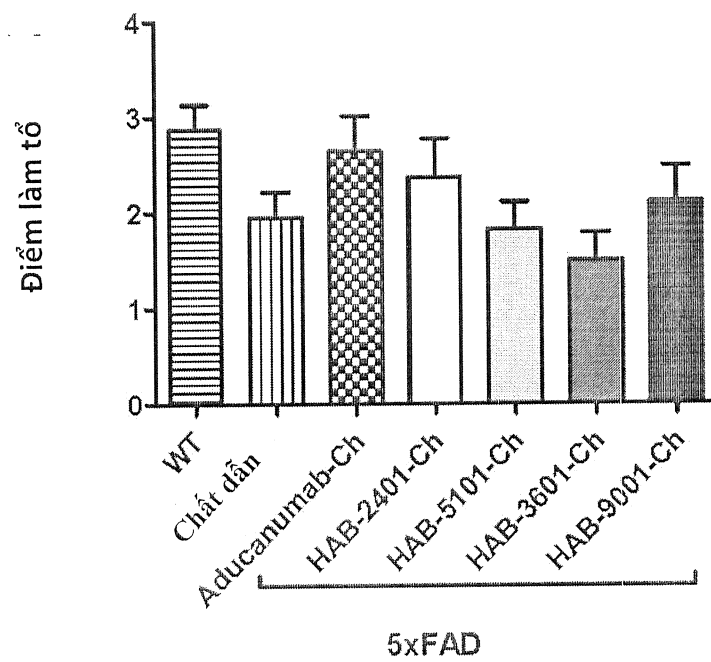


Fig.6

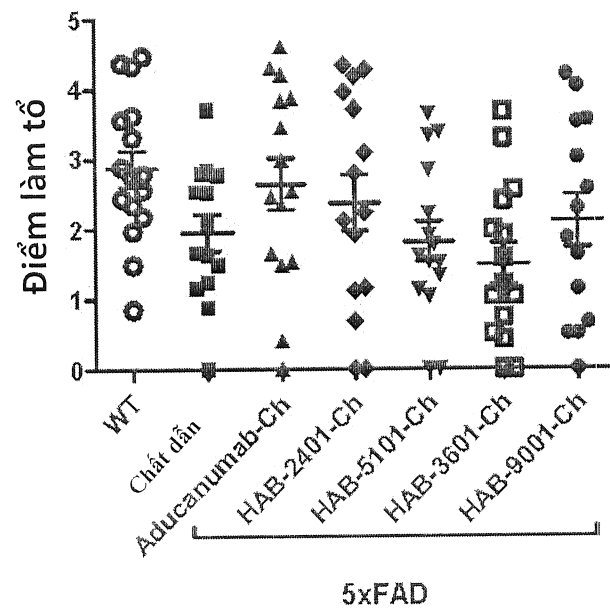


Fig.7

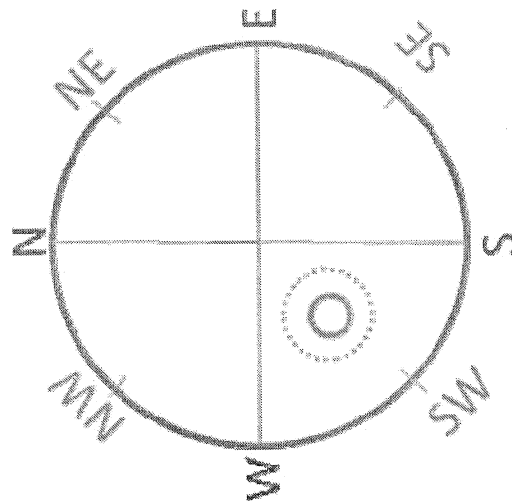


Fig.8

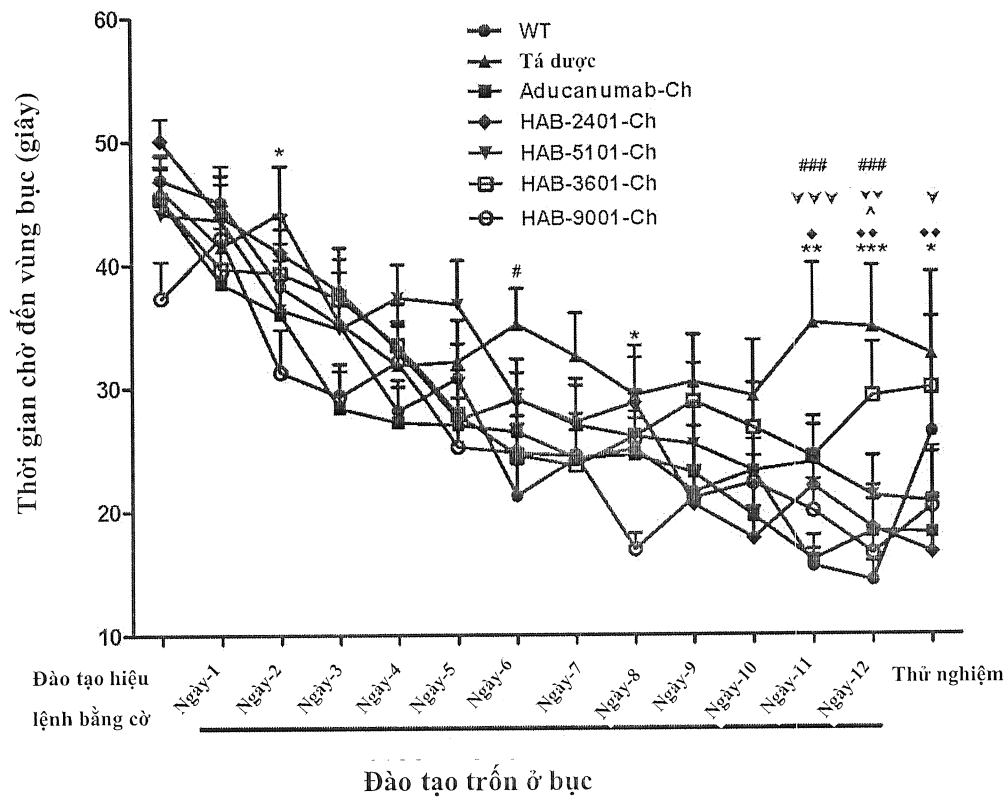


Fig.9

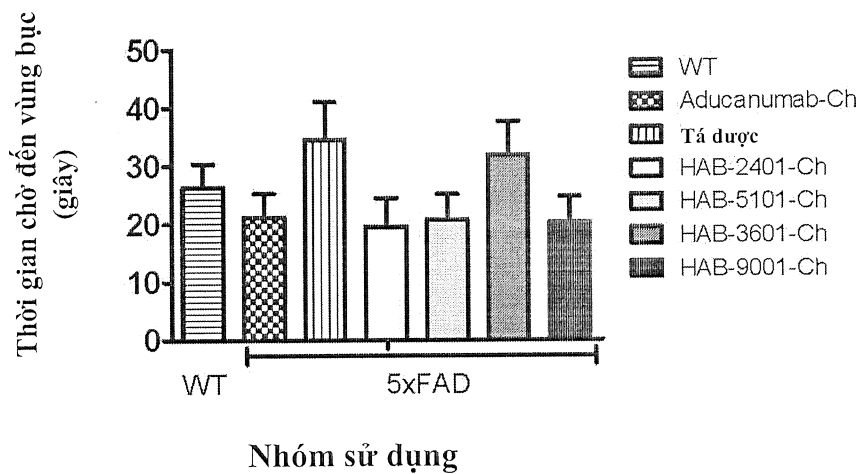


Fig.10A

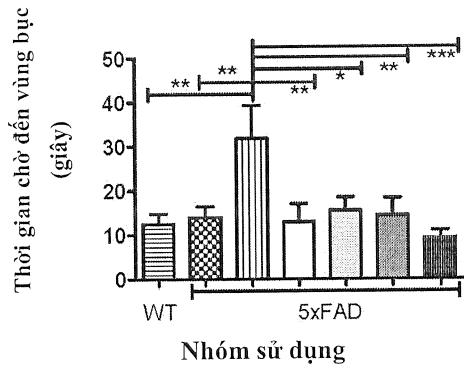


Fig.10B

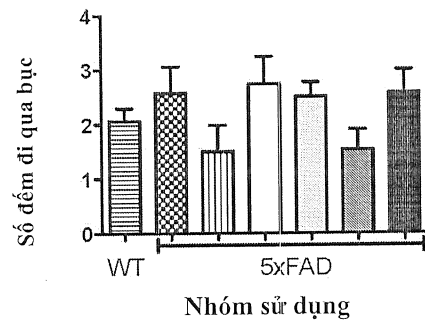


Fig.10C

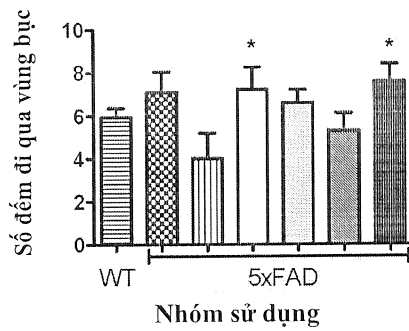


Fig.10D

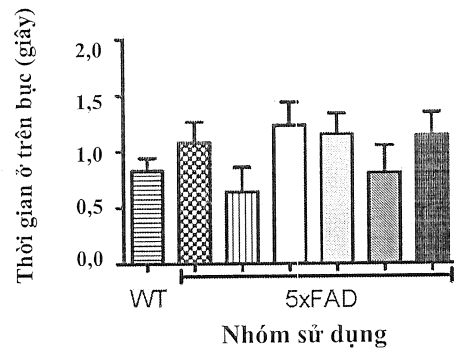


Fig.10E

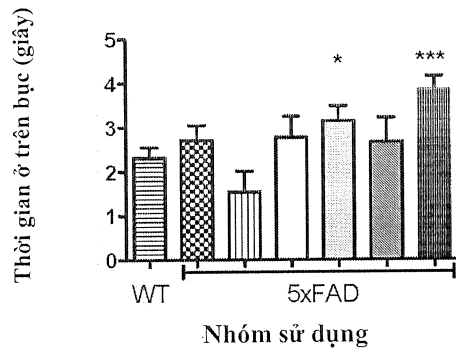


Fig.10F

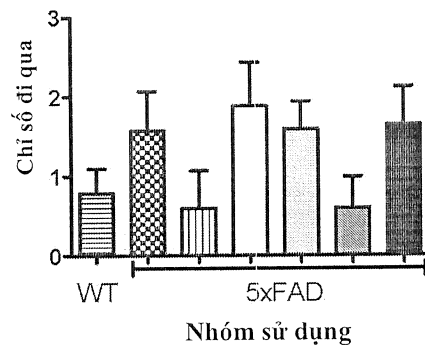


Fig.10G

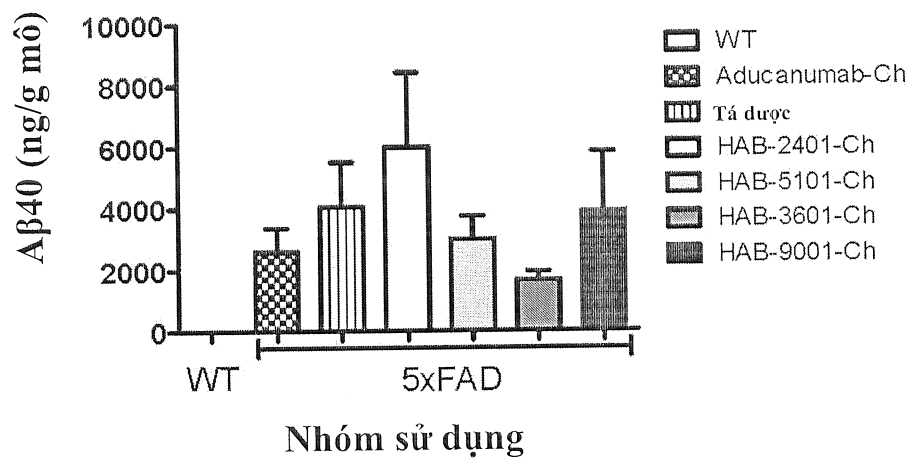


Fig.11A

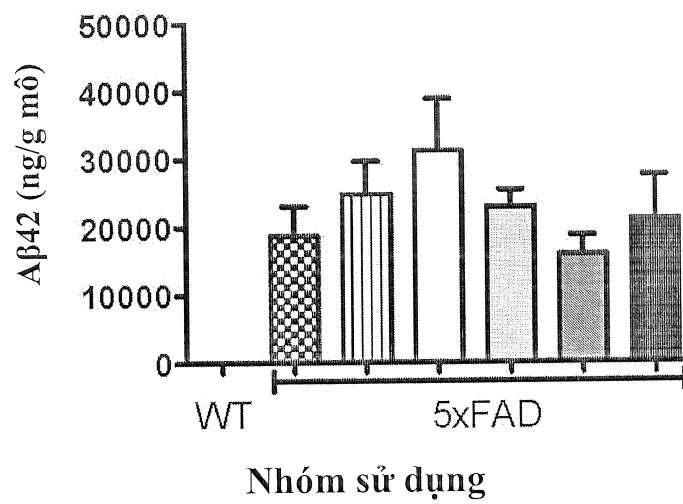


Fig.11B

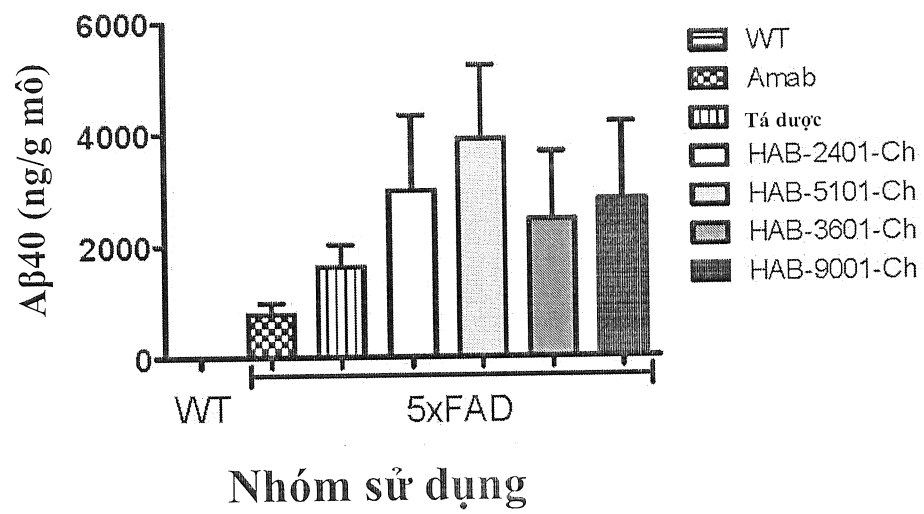


Fig.11C

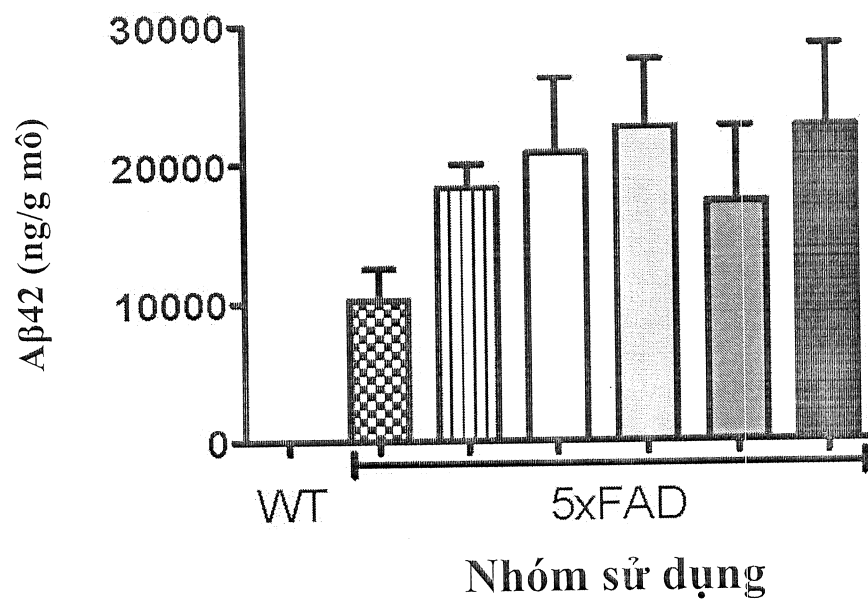


Fig.11D

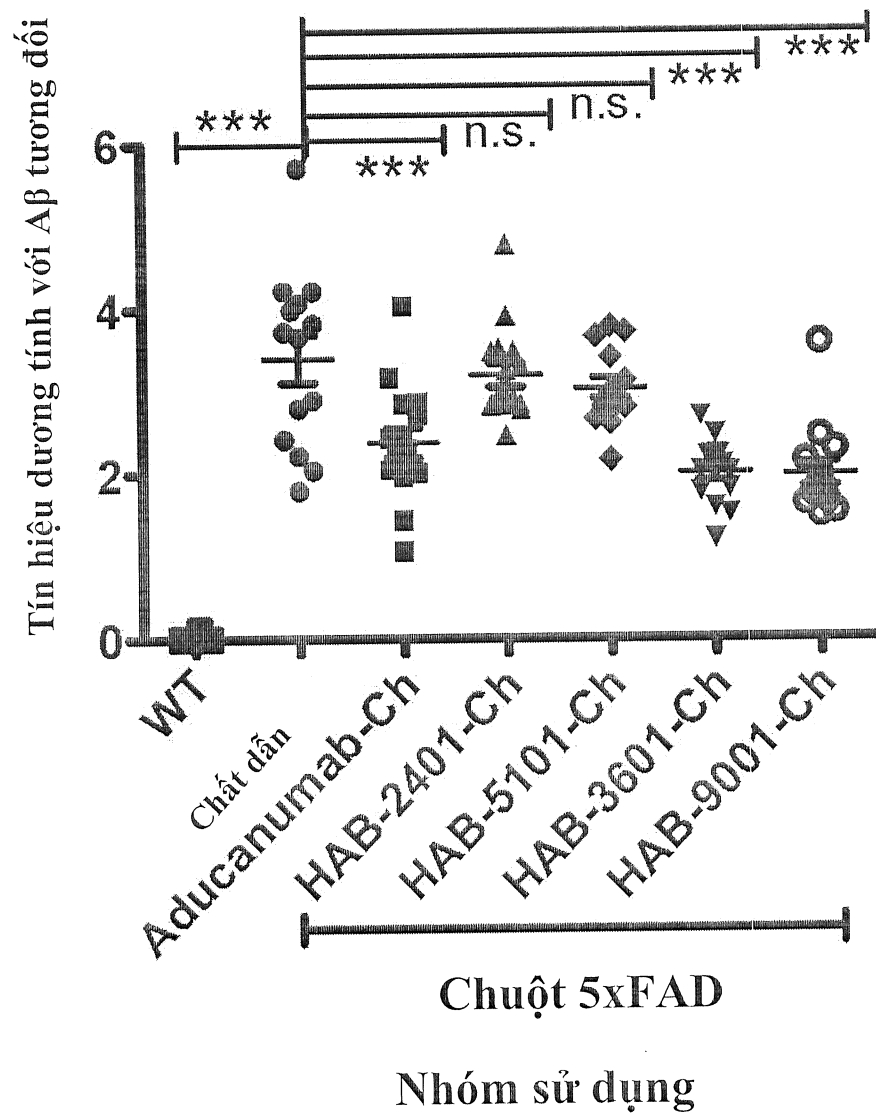


Fig.12

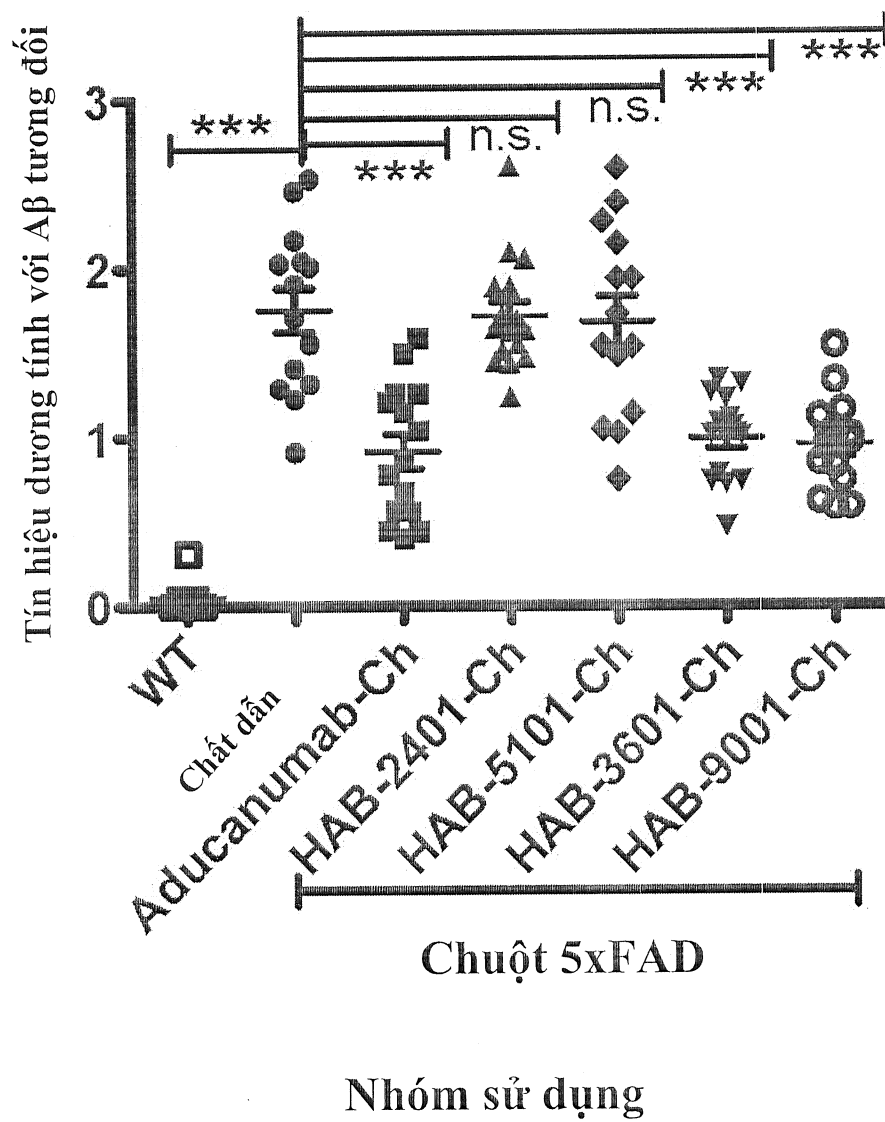


Fig.13

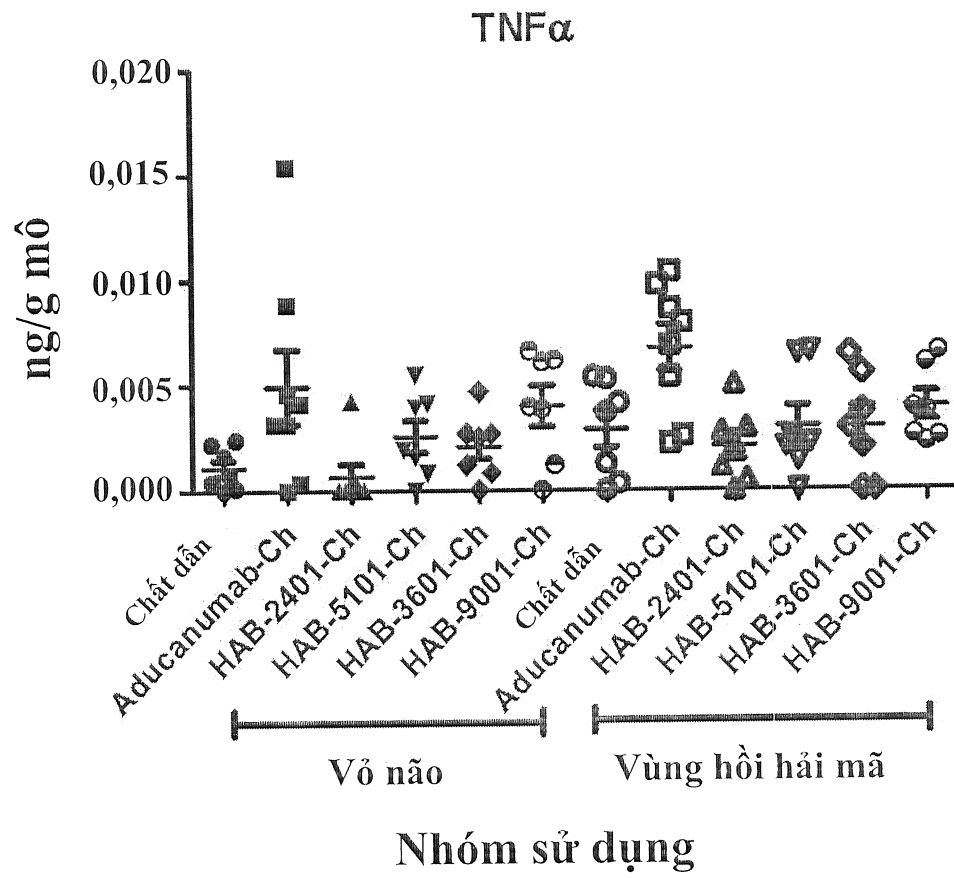


Fig.14A

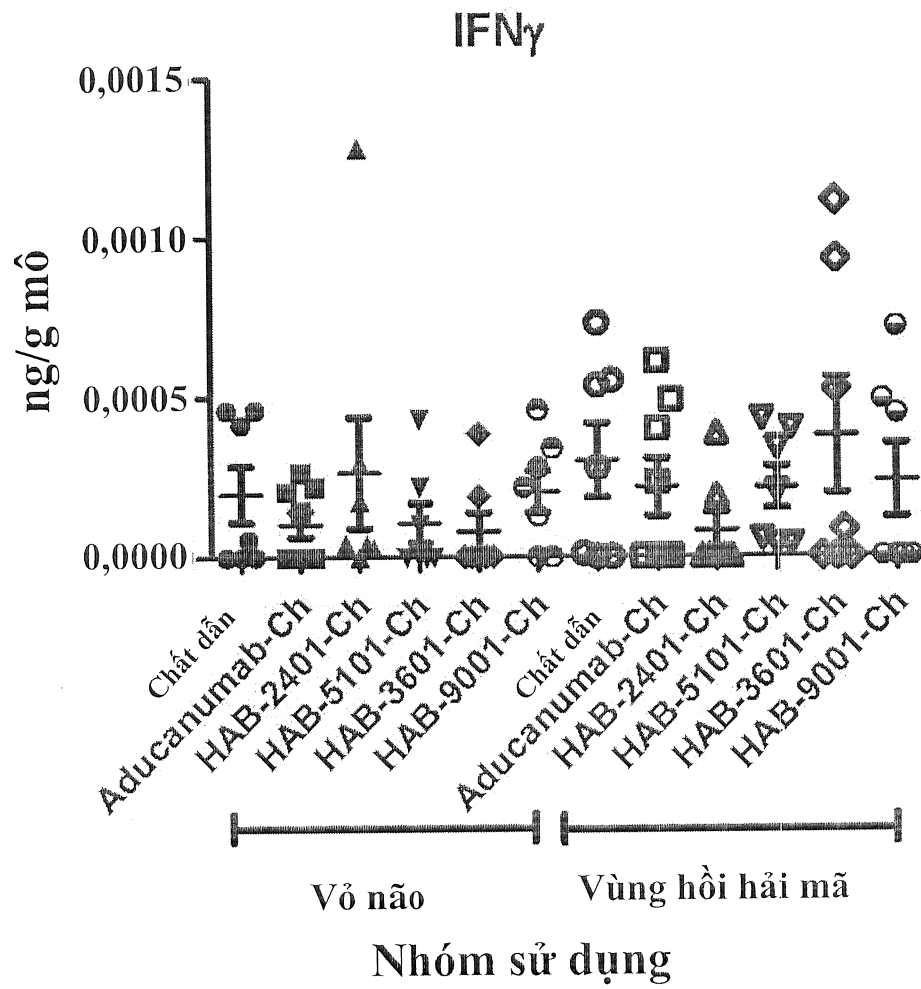


Fig.14B

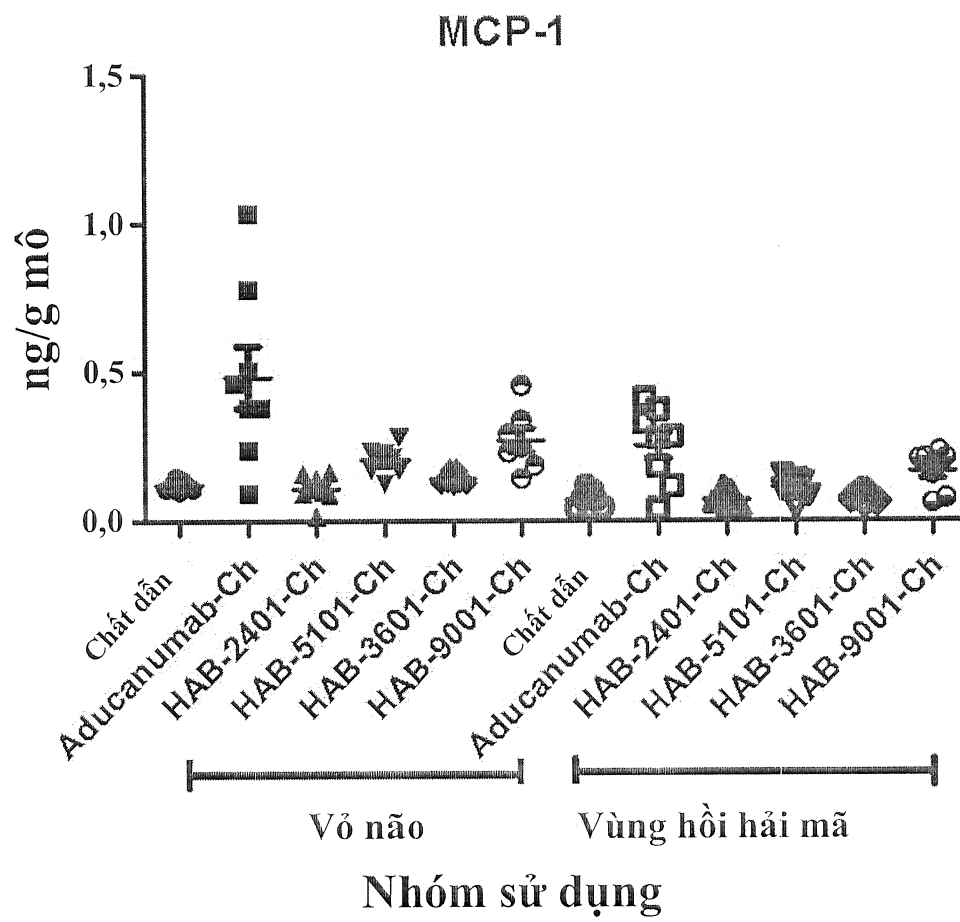


Fig.14C

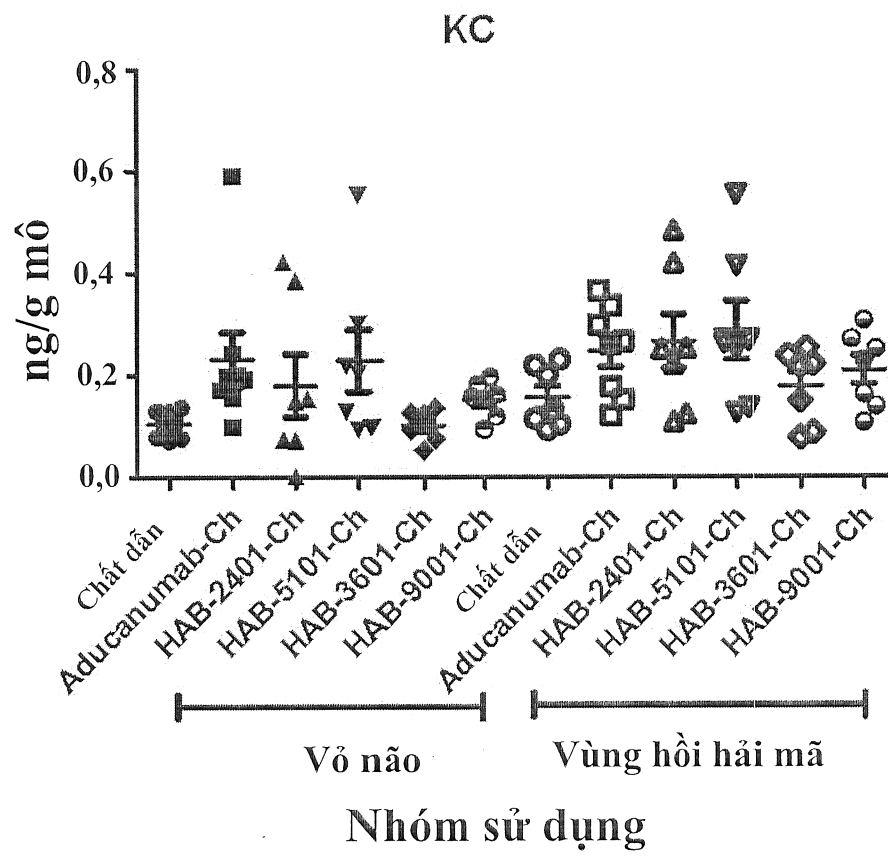


Fig.14D

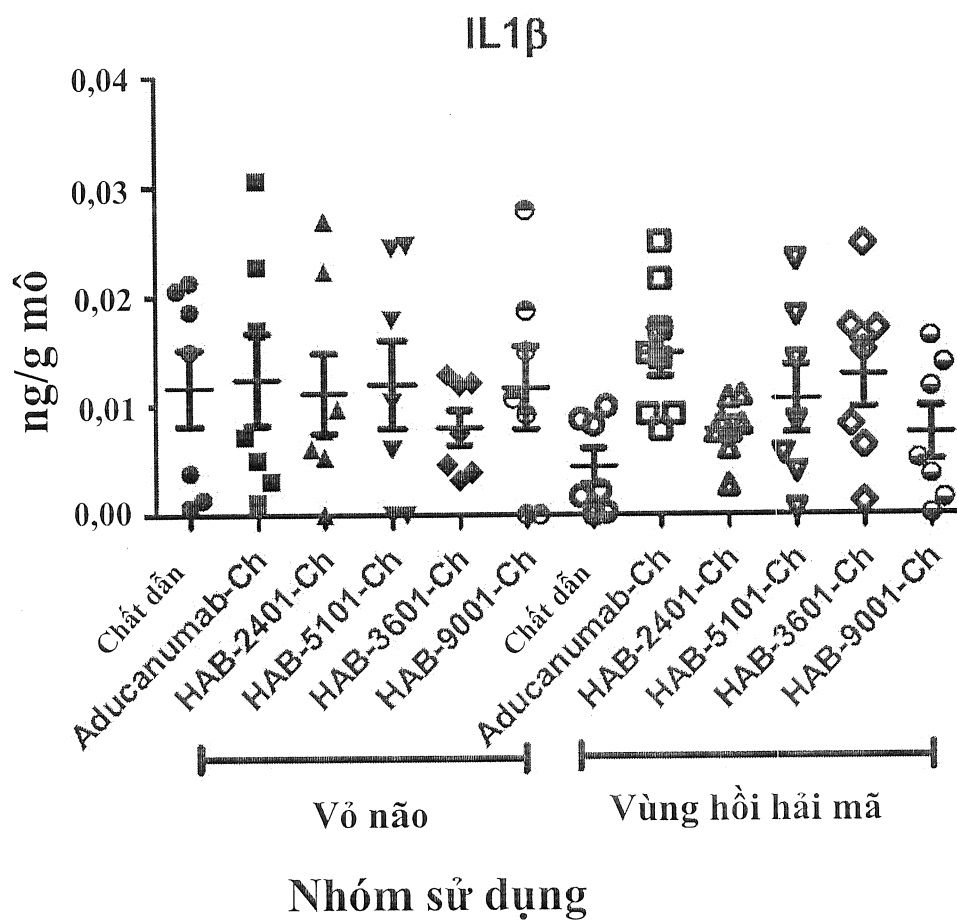


Fig.15A

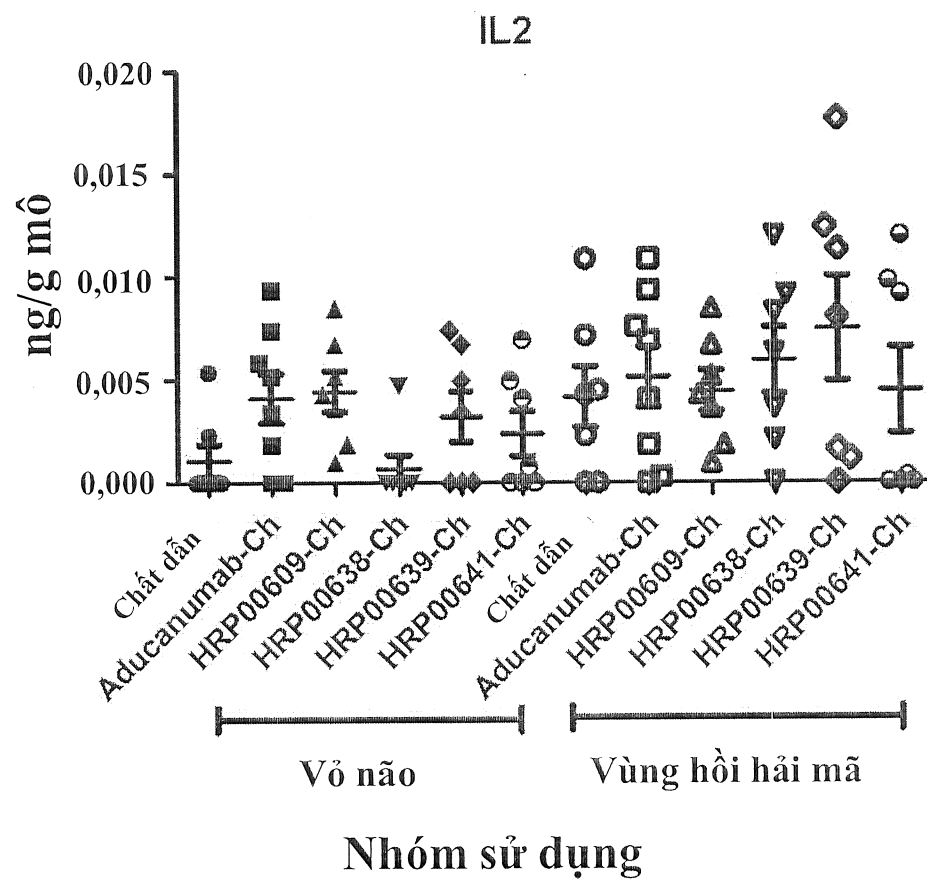


Fig.15B

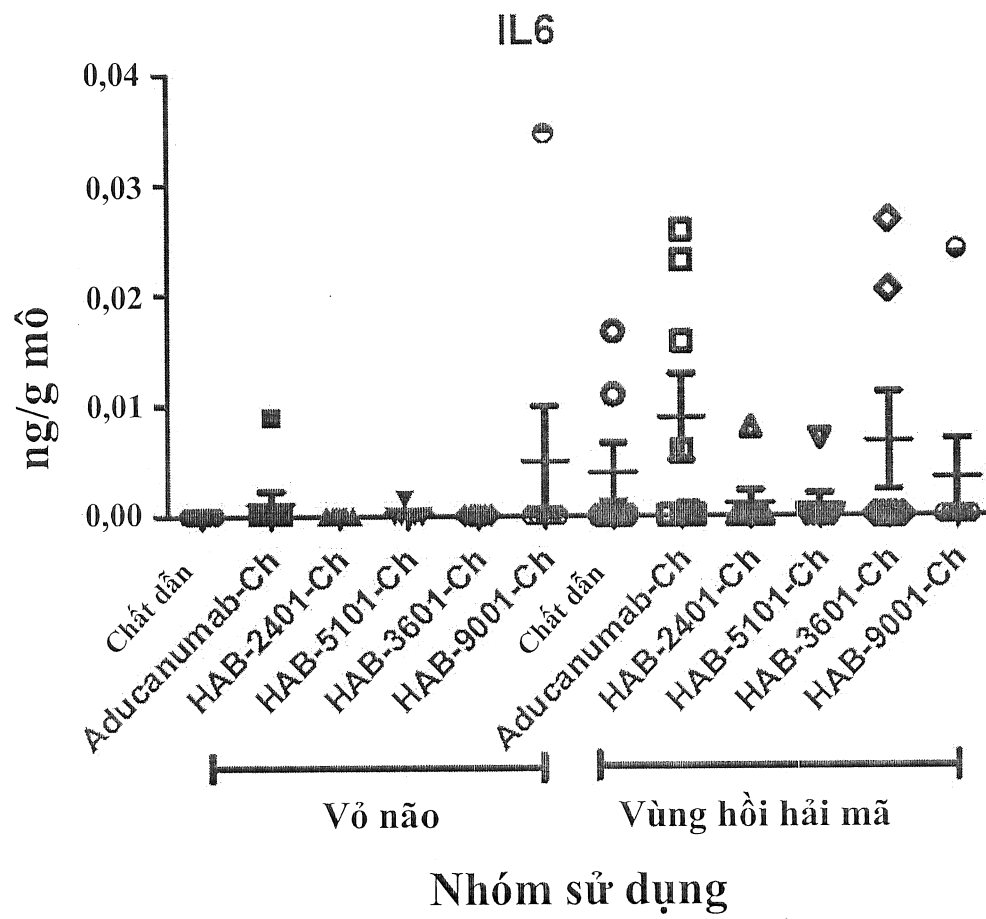


Fig.15C

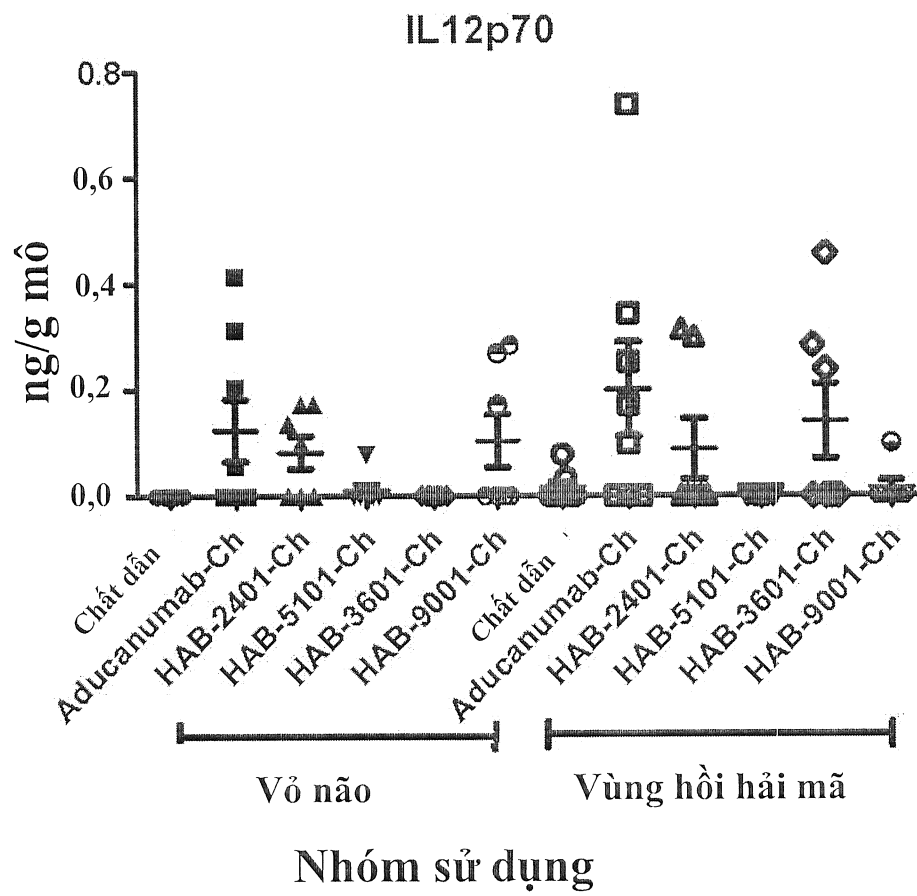


Fig.15D

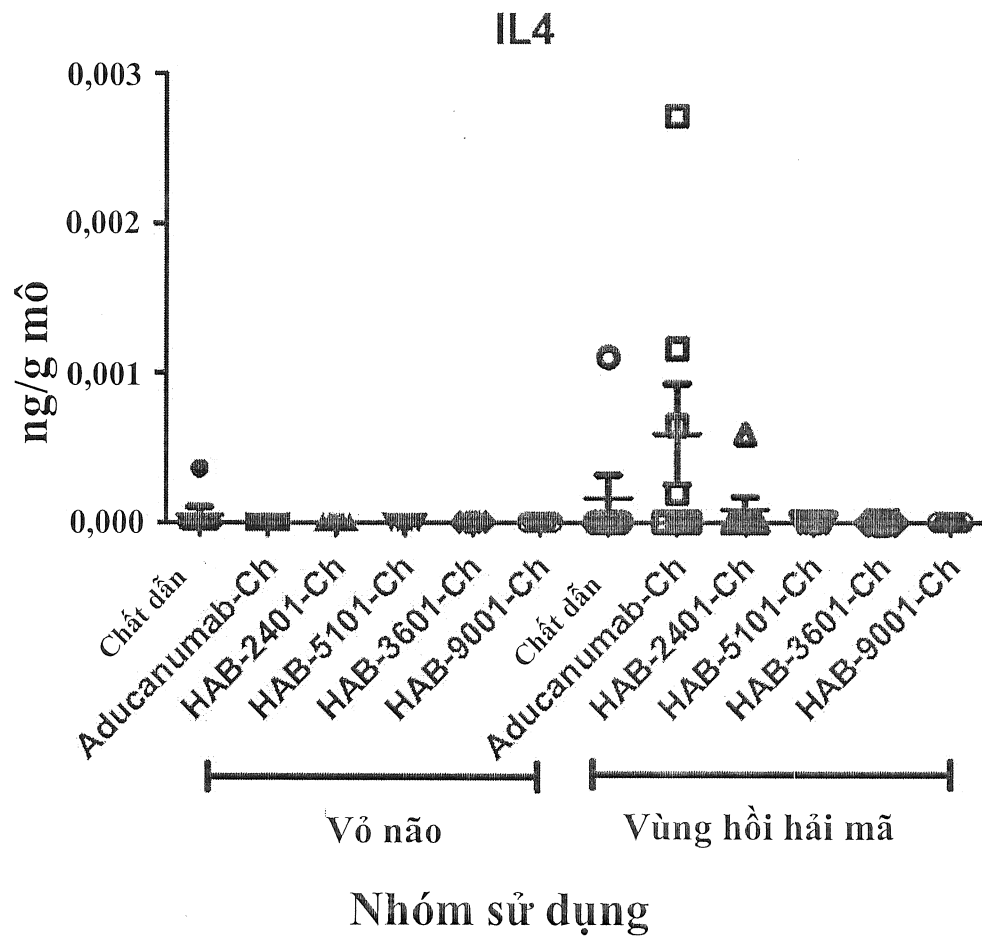


Fig.15E

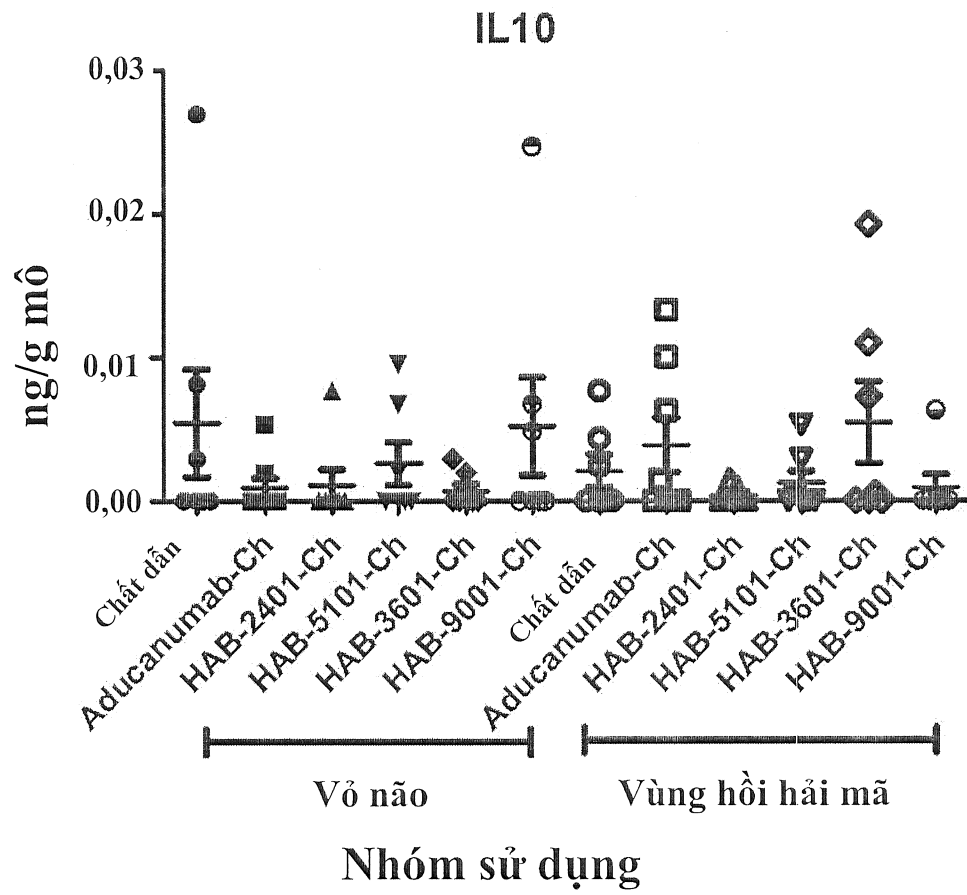


Fig.15F